



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월14일  
(11) 등록번호 10-1317989  
(24) 등록일자 2013년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)  
*C07K 14/435* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7003542(분할)

(22) 출원일자(국제) 2008년07월25일  
심사청구일자 2012년02월09일

(85) 번역문제출일자 2012년02월09일

(65) 공개번호 10-2012-0025014

(43) 공개일자 2012년03월14일

(62) 원출원 특허 10-2010-7001757  
원출원일자(국제) 2008년07월25일  
심사청구일자 2010년03월31일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/006154

(87) 국제공개번호 WO 2009/015843  
국제공개일자 2009년02월05일

(30) 우선권주장  
07014797.0 2007년07월27일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌  
WO2005116051 A1  
US20020146370 A1  
US20030118585 A1  
WO2000075339 A1

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 김지연

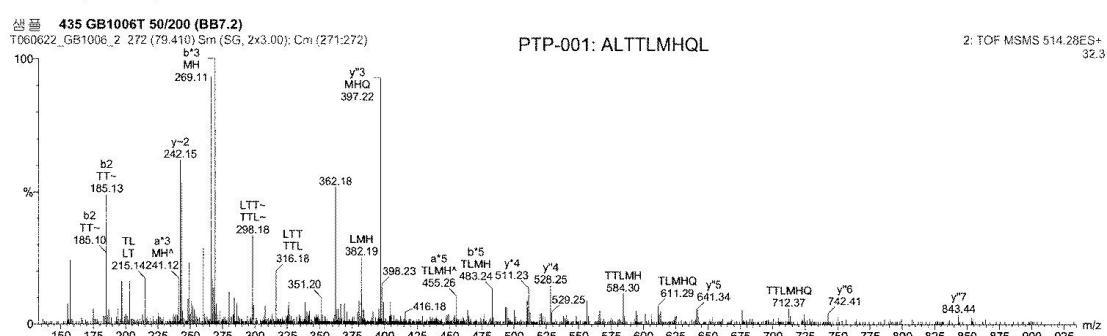
(54) 발명의 명칭 신경 및 뇌 종양에 대한 신규 면역요법

**(57) 요약**

본 발명은 면역 치료법에 사용되는 웨티드, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역 치료법에 관한 것이다. 본 발명은 더 나아가 암 관련 세포독성 T 세포 (CTL) 웨티드의 항원 요소, 홀로 또는 다른 암 관련 웨티드와 결합하여 항암 면역 반응을 유도하는 백신의 구성물인 약학적 활성 성분에 관한 것이다. 본 발명은 인간 암세포의 HLA class I과 II 분자로부터 유도된 11개의 신규 웨티드 및 이의 변이체에 관한 것이며 이는 항암 면역 반응을 유도하기 위해 백신의 구성물로서 사용된다.

**대 표 도**

**PTP-001 (GB1006)**



(72) 발명자

베인센크 토니

독일 73773 아흐발트 임 모르겐라인 15

트라우트베인 클라우디아

독일 42489 불프라쓰 넬켄베그 2

발터 스테펜

독일 72764 레우틀링겐 스테이넨베르그스트라쎄 2

싱 하르프리에트

독일 72072 투빙겐 베이 텐 프페르데스탈렌 9

---

(30) 우선권주장

08005889.4 2008년03월27일

유럽특허청(EPO)(EP)

60/953,161 2007년07월31일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

전장 PTPRZ1(단백질 타이로신 포스파타아제 수용체-타입 제타1) 폴리펩티드가 아닌, 서열번호 5의 서열로 이루어진 웹티드.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

인간 주요 조직 적합 유전자 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자와 결합하는 능력을 유지하며 CD4 또는 CD8 T 세포를 자극할 수 있는 웹티드.

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제1항에 있어서,

-CH<sub>2</sub>-NH, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- 및 -CH<sub>2</sub>SO-로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩티드 결합을 포함하는 웹티드.

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

제1항에 따른 웹티드를 코딩하는 핵산.

### 청구항 8

제7항에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터.

### 청구항 9

제7항에 따른 핵산 또는 제8항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포가 항원 제시 세포인 숙주 세포.

### 청구항 10

펩티드를 제조하는 방법으로서,

제9항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

상기 숙주 세포 또는 이의 배양 배지로부터 상기 웹티드를 단리하는 단계

를 포함하는 방법.

### 청구항 11

시험관 내에서 세포독성 T 립프구(CTL)와, 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면 상에 발현된 항원-적재된 인간 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자를 접촉시키는 단계를 포함하는 활성화된 CTL을 시험관내에서 제조하는 방법으로서, 상기 항원이 제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 웹티드인, 방법.

**청구항 12**

제11항에 따른 방법에 의해 제조된 활성화된 CTL.

**청구항 13**

유효한 수의 제12항에 정의된 CTL 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 암세포를 사멸시키기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 14**

제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 핵산 또는 제8항에 따른 발현 벡터를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

백신으로서 사용되는 약제학적 조성물.

**청구항 16**

제14항에 있어서,

암이 성상세포종, 텔모양 성상세포종, 배아형성장애 신경상피 종양, 희소돌기아교세포종, 뇌실막세포종, 다형성 아교모세포종, 혼합된 신경아교종, 희소돌기성상세포종, 속질모세포종, 망막모세포종, 신경모세포종, 배아종, 기형종, 신경절교종, 신경절세포종, 중추 신경절세포종, 원시 신경 외배엽 종양, 송과체실질 종양, 뇌실막세포 종양, 맥락막망 종양, 기원이 불확실한 신경상피 종양, 신경아교모세포종, 폐암 및 선편평상피 암종으로 구성된 군에서 선택되는, 약제학적 조성물.

**명세서****기술분야**

[0001]

본 발명은 면역 치료법에 사용되는 펩티드, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역 치료법에 관한 것이다. 본 발명은 더 나아가 암 관련 세포독성 T 세포 (CTL) 펩티드의 항원 요소, 홀로 또는 다른 암 관련 펩티드와 결합하여 항암 면역 반응을 유도하는 백신의 구성물인 약학적 활성 성분에 관한 것이다. 본 발명은 인간 암세포의 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스 I 및 클래스 II 분자로부터 유도된 11개의 신규 펩티드 및 이의 변이체에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

신경아교 종은 신경계의 아교세포로부터 발생하는 뇌종양이다. 아교세포는, 흔히 신경아교 또는 단순히 아교라고 불리는 비신경세포로서 세포 지원과 영양을 제공하고, 항상성을 유지하며, 미엘린을 생성하고, 신경계의 신호 전달에 참여한다. 아교세포의 가장 중요한 두 개의 소집단은 종양이 발생하는 세포의 종류에 따라 이름이 불 혀진 성상아교세포에서 발생한 성상아교세포종과 펩지교종세포에서 발생한 펩지신경교종을 포함한다. 성상아교세포종의 소집단에 속하는 다형성 교모 세포종 (앞으로는 교모 세포종이라 함)은 성인에서 가장 많이 발생하는 악성 뇌종양이며 모든 악성 뇌종양의 40% 및 교모 세포종의 50%를 차지한다 (CBTRUS, 2006). 이는 공격적으로 중추 신경계를 침략하고 모든 신경교종 중에서 가장 높은 악성 종양 레벨 (등급 4)로 랭킹되어 있다. 비록 신경 영상, 미세 수술법의 발전과 테모졸로마이드거나 방사선과 같은 다양한 치료의 옵션이 꾸준히 개발되는 데에도 불구하고, 교모 세포종은 여전히 불치병으로 남아 있다 (Macdonald, 2001; Burton and Prados, 2000; Prados and Levin, 2000). 첫 진단 후 평균 수명은 9에서 12개월로 뇌종양의 치사율은 아주 높다. 1986에서 1990년 사이의 5년 생존률은 8.0%였다. 현재까지, 총 종양 절제를 포함한 적극적인 치료 후 5년 생존률은 아직도 10%보다 낮다 (Burton and Prados, 2000; Nieder et al., 2000; Napolitano et al., 1999; Dazzi et al., 2000). 따라서, 대체적인 효과적 치료 방법이 적극 필요하다.

[0003]

교모세포종의 암세포는 뇌종양 중에서 가장 미분화된 종양으로서, 이 암세포들은 이동 및 확산의 높은 잠재력을 가지고 있으며 이는 매우 침투력이 높아 좋지 않은 예후에 기여한다. 교모세포종은 빠르고 침략적이고 침윤적인

뇌에서의 성장으로 인해 죽음을 초래한다. 침윤적인 성장 패턴으로 인해 이 종양들은 수술적 제거가 불가능하다. 교모세포종은 또한 상대적으로 방사선 및 화학 요법에 내성을 가지고 있으며, 따라서 치료 후 재발 생률이 높다. 게다가, 수술적 제거와 방사선 요법 후 모든 종양 세포를 완전 박멸하는 데에 종양 세포에 대한 면역 반응은 효과가 거의 없다 (Roth and Weller, 1999; Dix et al., 1999; Sablotzki et al., 2000).

[0004] 교모세포종은 미분화된 성상아교세포종 또는 전조 신경교 세포의 악성 변화 중의 유전자 메커니즘의 차이에 따라 1차 교모세포종(드 노보)과 2차 교모세포종으로 구분된다. 2차 교모세포종은 45세까지의 젊은 인구에서 발생한다. 평균적으로 4세에서 5세 사이에, 2차 교모세포종은 낮은 등급의 성상아교세포종에서 미분화된 성상아교세포종을 통해 발전한다. 이와 반대로, 1차 교모세포종은 대개 나이가 든 인구에서 발생하며 평균 연령은 55세이다. 대개, 1차 교모세포종은 임상 또는 병리학적으로 아무 이상이 없는 상태에서 3개월 이내에 종양의 진행이 나타나는 것으로 알려진 급격 발병형 교모세포종으로 발생한다 (Pathology and Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, France, 2000)).

[0005] 교모세포종은 미엘린 신경 세포를 따라 이동하여 중추 신경계에 광범위하게 퍼진다. 대부분의 경우, 외과적 치료는 한정 지속적인 치료 효과를 보인다 (Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 34, 91-94, 1994; Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 33, 425-458, 1993; Neuropathology 17, 186-188, 1997)(Macdonald, 2001; Prados and Levin, 2000).

[0006] 악성 교모세포종 세포는 T 세포의 증식을 손상시키고 면역 자극 사이토카인 IL-2의 생산을 막는 면역 억제제의 생산을 통해 숙주의 면역 체계에 의한 발각을 피한다 (Dix et al., 1999).

[0007] 두개 내의 (intracranial) 종양은 뇌, 뇌막, 뇌하수체, 두개골, 및 심지어는 잔여 배아 조직을 포함하는 중추 신경계의 어떠한 구조나 세포의 종류에서부터 발생될 수 있다. 미국에서의 전체 연간 1차 뇌종양의 발생률은 100,000 당 14이다. 가장 흔한 뇌종양은 수막종으로서 전체 1차 뇌종양의 27%를 차지하며, 교모세포종은 전체 1차 뇌종양의 23%를 차지한다(교모세포종은 성인 악성 뇌종양의 40%를 차지한다). 이 종양의 많은 부분이 공격적이거나 높은 등급에 속한다. 1차 뇌종양은 소아 고체 종양 중 가장 흔하고 백혈병 이후 두 번째로 가장 흔한 소아 사망의 원인이다.

[0008] 교모 세포종에 대한 효과적인 치료에 대한 검색은 오늘날에도 계속된다. 이 종양세포와 싸우기 위한 면역치료법, 또는 면역 체계를 이용하는 치료법은 이미 연구된 바 있다. 처음으로 격려적인 결과가 인간에서의 면역 치료 연구에서 얻어진 바 있다. 이 연구에서는 항원 특정 CTL 반응 유도에 의해 기본 치료를 받는 경우에 비교하여 평균 생존 시간이 연장되었고 독성은 최소한으로 나타났다 (Heimberger et al., 2006).

[0009] 본 발명은 심각한 부작용을 일으킬 수 있는 화학요법이나 다른 물질을 사용하지 않고 환자들의 건강을 증진시키는 뇌종양 치료의 새로운 효능이 높고 안전한 새로운 치료 방법에 대한 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목표는 MHC의 두 개 클래스에 모두 결합이 가능한 펩티드의 새로운 아미노산 서열을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 따로 표시되어 있지 않은 경우, 여기에 사용되는 모든 용어는 다음과 같이 정의된다.

[0012] 여기서 사용되는 "펩티드"라는 용어는 일반적으로 알파-아미노 기와 다음 아미노산의 카보닐 기 사이가 펩티드 결합으로 연결되어 있는 아미노산 잔기의 일련을 지정하는 데 사용된다. 펩티드는 9개의 아미노산으로 구성되어 있으나, 8개까지 짧을 수도 있으며, 14개까지 길어질 수도 있다.

[0013] 여기서 사용되는 "올리고펩티드"라는 용어는 일반적으로 알파-아미노 기와 다음 아미노산의 카보닐 기 사이가 펩티드 결합으로 연결되어 있는 아미노 잔기의 일련을 지정하는 데 사용된다. 본 발명에 있어서 맞는 에피토프(epitope)가 유지되는 한 올리고펩티드의 길이는 중요하지 않다. 올리고 펩티드는 길이는 대부분 최소 14개의 아미노산에서 최대 30개의 아미노산까지이다.

[0014] 여기서 사용되는 "폴리펩티드"라는 용어는 일반적으로 알파-아미노 기와 다음 아미노산의 카보닐 기 사이가 펩티드 결합으로 연결되어 있는 아미노 잔기의 일련을 지정하는 데 사용된다. 본 발명에 있어서 적당한 에피토프가 유지되는 한 폴리펩티드의 길이는 중요하지 않다. 올리고펩티드와는 다르게 폴리펩티드라는 용어는 최소 30

개의 아미노산을 가지고 있는 단백질 분자를 일컫는다.

- [0015] 만일 이와 같은 분자를 코딩하는 웨프티드, 올리고웨프티드, 단백질, 또는 폴리핵산염이 면역 반응을 유도할 수 있는 능력이 있다면, "면역원성"이라고 한다 (따라서 본 발명에서 "면역원"이라고 한다). 이 본 발명에 있어서는, 면역원성은 CTL에 의한 반응을 유도하는 것으로 더 특정하게 정의된다. 따라서 "면역원"이란 것은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자를 말하고, 본 발명에 있어서는 CTL 반응을 유도할 수 있는 분자를 말한다.
- [0016] T 세포 "에피토프"는 MHC 문자 클래스 I 또는 클래스 II에 결합하는 짧은 웨프티드 분자를 일컫이고, 이는 곧 T 세포에 의해 인식된다. 클래스 I MHC 문자에 결합하는 T 세포 에피토프는 대부분 8개에서 14개의 아미노산으로 구성되어 있고, 대부분의 경우 9개의 아미노산으로 구성되어 있다. 클래스 II MHC 문자에 결합하는 에피토프는 12개에서 30개의 아미노산의 길이이다. MHC 클래스 II에 결합하는 에피토프의 경우에는 같은 T 세포 에피토프가 같은 공통 핵심 분절을 공유하지만, 카복시- 및 아미노-말단의 측면의 길이는 다를 수도 있다. 이 이유는 이 웨프티드의 끝부분은 클래스 I MHC 문자의 경우에는 웨프티드 결합 구조에 묻혀져 있는데 이와 다르게 이 끝 부분은 클래스 II MHC 문자의 웨프티드 결합 구조에 묻혀져 있지 않기 때문이다.
- [0017] 클래스 I MHC 문자를 코딩하는 세 가지 서로 다른 유전자 좌우가 있다: HLA-A, HLA-B와 HLA-C. HLA-A1, HLA-A2 및 HLA-A11. 이는 좌우에서 발현될 수 있는 다른 클래스 I MHC 문자의 예이다.
- [0018] 여기서 사용되는 DNA 서열은 단일 줄기 DNA와 두줄 줄기 DNA를 포함한다. 따라서, 따로 표시되어 있지 않는 한, 특정한 서열이란 이러한 서열의 단일 줄기 DNA 또는 상보적인 서열과 함께 있는 두줄 줄기 DNA 또는 이러한 서열의 상보적인 서열을 일컫는다. "코딩 영역(coding region)"이란 자연적으로 또는 일반적으로 자연적인 게놈 자연 환경에서 발현되는 유전자를 코딩하는 부분을 일컫는다. 즉, 생체내에서 자연적으로 발현되는 유전자가 있는 부분을 말한다.
- [0019] 코딩 영역은 정상적인 유전자 또는 돌연변이 유전자 심지어는 DNA 합성 기술에 의해 실험실에서 전적으로 만들어진 DNA 염기서열, 또는 유전자일 수도 있다.
- [0020] "뉴클레오티드 배열"이란 디옥시리보뉴클레오티드의 헤테로폴리머를 일컫는다.
- [0021] 특정 웨프티드, 올리고웨프티드 또는 폴리웨프티드를 코딩하는 뉴클레오티드 배열은 자연적으로 생성될 수도 있고 인공적으로 합성될 수도 있다. 보통, 웨프티드, 폴리웨프티드 및 단백질을 코딩하는 DNA 부분들은 cDNA 조각과 짧은 올리고뉴클레오티드 링커 또는 올리고뉴크레오티드의 시리즈 등에서 결합되고 이는 미생물이나 바이러스 오퍼론(operon)으로부터 유도된 조절 요소를 포함한 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 만든다.
- [0022] "발현 결과물(expression product)"란 유전자와 코드 축퇴 (code degeneracy)에 의해서 같은 아미노산을 생산하는 어떤 염기 서열의 자연적인 번역의 결과물인 폴리웨프티드나 단백질을 일컫는다.
- [0023] "조각"이란 코딩 서열에 관한 내용일 때, 완전한 코딩 영역의 발현 결과물과 같은 생물적인 기능이나 활동을 가지고 있는 완전한 코딩 영역의 부분적인 염기서열을 일컫는다.
- [0024] "DNA 부분"이란 적어도 한번은 청정한 형태로 지칭되는, 즉 내생 오염 물질을 포함하지 않은, 및 기본 생화학적인 방법을 이용하여 이 구성 요소 뉴클레오티드 서열의 식별, 조작 및 그 부분의 복구를 예를 들어 복사 벡터를 이용하여 가능하게 하는 양이나 농도를 가지고 있는 DNA 폴리머를 일컫는다. 이런 부분들은 진핵 유전자에 보통 존재하는 번역되지 않는 내분의 서열, 또는 인트론이라고 불리는 서열에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 형태로 제공된다. 비번역 DNA의 서열은 오픈 리딩 프레임의 하류에 존재하여 코딩 영역의 조작 또는 발현에 방해되지 않는다.
- [0025] "프라이머"란 DNA의 한 가닥 줄기와 결합하여 DNA 폴리머라아제가 디옥시리보뉴클레오티드 쇄의 합성을 시작할 수 있는 자유로운 3' OH 끝을 제공하는 짧은 염기 서열을 말한다.
- [0026] "프로모터"란 RNA 폴리머라아제가 전사를 시작하기 위해 결합하는 DNA의 부분을 말한다.
- [0027] "고립된"이란 용어는 원래의 환경에서 물질이 제거됨을 말한다 (만약에 어떤 물질이 자연적으로 생성된다면, 이에서 원래의 환경이란 자연 환경을 말한다). 예를 들어, 자연적으로 생성되는 폴리뉴클레오티드나 폴리웨프티드가 살아 있는 동물에 존재한다면, 이는 고립되지 않은 것이지만, 만약에 같은 폴리뉴클레오티드나 폴리웨프티드가 자연 시스템에서 부분적으로 또는 전체적으로 분리되어 있다면, 이는 고립된 것이다. 이런 폴리뉴클레오티드는 벡터의 한 부분일 수도 있고 또는 이런 폴리뉴클레오티드나 폴리웨프티드는 구성물의 한 부분일 수도 있지만, 이러한 벡터나 구성물이 자연의 일부분이 아닐 경우에는 이 또한 단리된 것이라고 할 수 있다.

- [0028] 본 발명에서 사용되는 폴리뉴클레오티드 및 재조합된 또는 면역적인 폴리펩트드는 "정화된" 형태일 수도 있다. "정화된"이라는 것은 완벽한 순도를 필요로 하지는 않는다. 오히려, 이 용어는 비교적인 정의로 사용되며, 이는 높은 순도로 수득된 것을 일컬을 수도 있으며 또는 부분적으로만 정화된 것을 말 할 수도 있다. 이는 각각의 과정의 기술에 따른 것이다. 예를 들어, cDNA 라이브러리에서 단리된 각각의 복사본은 전기 영동(electrophoretic)의 동질성을 가지고 있다. 시작 물질 또는 자연 물질의 정화는 적어도 한 차수는 되어야 하며, 더 바람직하게는 두 차수 또는 세 차수가 되어야 하며, 더 바람직하게는 네 차수에서 다섯 차수가 되도록 명시적으로 의도되어 있다. 더 나아가, 가장 바람직하게는 무게 대비 순도가 99.999%, 또는 적어도 99.99% 또는 99.9% 또는 심지어 적어도 99%가 되는 폴리펩티드가 명시적으로 의도되어 있다.
- [0029] 본 발명에 사용되는 핵산과 폴리펩티드 발현 결과물 및 또한 이런 핵산 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 발현 벡터는 "풍부한 형태"일 수도 있다. 여기서 사용되는 "풍부한"이라는 것은 예를 들어 어떤 물질의 농도가 자연에서 생성되는 것의 2, 5, 10, 100 또는 1000배가 되는 것을 말한다. 무게 비교 0.01%, 더 바람직하게는 적어도 무게 비교 0.1%가 되는 것이 좋다. 무게 비교 0.5%, 1%, 10% 및 20%로 된 풍부한 준비물이 사용되었다. 서열, 건조물, 벡터, 복사본 및 본 발명에 사용되는 다른 물질들은 풍부한 또는 단리된 형태로 되어 있을 수 있다.
- [0030] "활성 조각"이란 단독으로 또는 적당한 보조제와 함께 포유류, 예를 들어 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함하는 동물에 주입되었을 때 주입된 인간을 포함한 동물에서 CTL 반응을 포함한 면역 반응을 일으키는 조각을 말한다 (즉, 면역원성을 가지고 있는 것을 말한다). 또는, "활성 조각"이란 CTL 반응을 시험관내에서 일으키는 상황에서도 사용되는 용어이다.
- [0031] 여기서 사용되는, "일부", "부분" 및 "조각"이라는 것은, 폴리펩티드에 관한 내용에서 사용될 때는 계속되는 아미노산 잔기와 같은 잔기의 서열을 말하고 이는 더 큰 서열의 한 부분을 이룬다. 예를 들어, 만약 폴리펩티드가 트립신이나 키도트립신과 같은 엔도펩티다아제에 의해 처리될 때, 이 처리에 의해 결과적으로 얻게 되는 올리코펩티드는 처음 시작할 때 존재하였던 폴리펩티드의 일부, 부분 또는 조각이 되는 것이다. 이는 어떤 조각이라도 자연적으로 생성되는 또는 "부모" 단백질인 서열번호 1 내지 11 중 어느 하나에 대응하거나, 서열번호 1 내지 11 중 어느 하나와 완전히 일치하거나 거의 대부분 일치하는 부분, 조각 또는 일부의 아미노산 서열을 불가피하게 포함하고 있음을 말한다. 폴리뉴클레오티드에 관한 말을 할 경우에는, 이 용어는 보통의 엔도뉴클레아제에 의해 처리된 어떤 폴리뉴클레오티드의 결과물을 말한다.
- [0032] 본 발명에서, 서열에 관해 말을 할 때 "일치율" 또는 "일치하는 백분율"이라는 것은 기재되어 있는 서열에 대해 말을 할 때 이 서열을 비교될 서열과 나란히 정렬하여 비교를 하는 것을 말한다. 이 때 비교될 서열은 ("비교되는 서열")이라고 하고 기재되어 있는 서열은 ("기준 서열")이라고 한다. 일치 백분율은 다음의 수식에 의해 결정된다:
- [0033] 일치 백분율=100[I -(C/R)]
- [0034] 여기서 C는 기준 서열과 비교 서열을 나란히 정렬했을 때 기준 서열과 비교 서열에서 다른 숫자를 말한다.
- [0035] (i) 기준 서열에서 각 염기 또는 아미노산이 대응하는 염기나 아미노산이 비교되는 서열에 있지 않을 때,
- [0036] (ii) 각 기준 서열에서의 빈 칸, 및
- [0037] (iii) 기준 서열에서의 정렬된 염기나 아미노산이 정렬된 비교되는 서열에서 염기나 아미노산이 다를 때.
- [0038] R은 기준 서열과 비교되는 서열이 비교되는 길이 중의 기준 서열에서 염기나 아미노산의 숫자를 말하고, 이 때 기준 서열에 있는 어떤 빈 칸도 하나의 염기나 아미노산으로 세어진다.
- [0039] 계산된 일치 백분율이 특정한 최소의 일치 백분율과 같거나 더 높다면 비교되는 서열은 기준 서열에 대한 특정한 최소의 일치 백분율을 가지고 있는 것이다. 하지만, 계산된 일치 백분율이 특정 일치 백분율보다 작을 경우에도 비교되는 서열과 기준 서열 사이의 정렬은 존재할 수 있다.
- [0040] 원래의 펩티드는 하나의 또는 더 많은 잔기를 펩티드 쇄에서 선택된 다른 곳에서, 따로 명시되어 있지 않은 한, 치환함으로써 변경될 수 있다. 이런 치환은 예를 들어 하나의 아미노산이 다른 아미노산으로 바뀔 때 이 새로운 아미노산이 비슷한 구성이나 특징을 가지고 있을 수도 있고 이는 보수적인 치환이라고 하고, 예를 들어 소수성인 아미노산이 다른 소수성인 아미노산으로 치환될 경우를 말한다. 더 보수적인 치환은 루신(leucine)을 이소루신(isoleucine)으로 바꾸는 경우처럼, 하나의 아미노산을 같은 크기 또는 비슷한 사이즈, 및 비슷한 화학 특징

을 가지고 있는 아미노산과 바꾸는 것을 말한다. 연구에서 보여진 바 있듯이 치환 중에 더 높은 내성이 있는 치환의 경우 크기, 전하, 극성, 소수성 등의 유사 정도가 높은 것으로 나타났다. 이런 내성이 높은 비슷한 아미노산 간의 치환을 "보수적 치환"이라고 한다.

[0041] 보수적인 치환이란 것은 여기에서 다음과 같이 5개의 군 내에서 이루어지는 것으로 정의된다. 군 1 작은 지방성, 무극성의 또는 약간 극성의 잔기 (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 군 2 극성, 음성 잔기 및 그들의 아미드를 포함한다 (Asp, Asn, Glu, Gln); 군 3 극성, 양성 잔기 (His, Arg, Lys) 군 4 크고 지방성이고 무극성인 잔기 (Met, Leu, Ile, Val, Cys); 군 5 크고 방향족인 잔기 (Phe, Tyr, Trp).

[0042] 덜 보수적인 치환의 예는 알라닌을 이소루신으로 치환하는 것으로 이는 하나의 아미노산을 비슷한 성질을 가진 하지만 약간 다른 크기인 다른 아미노산으로 바꾸는 경우를 말한다. 아주 비보수적인 치환은 하나의 아미노산을 극성이 있는 또는 더 심하게는 염기성을 띤 아미노산으로 바꾸는 것일 수 있다. 하지만, 이러한 "과격한" 치환을 잠재적으로 비효과적이라고 가정할 수는 없다. 그 이유는 화학적인 효과는 완전히 예측이 불가능하고 과격한 치환도 어떤 경우에는 단순한 화학 원리에서 예상할 수 없는 뜻 밖에 좋은 효과를 보여 줄 수도 있기 때문이다.

[0043] 물론, 이런 치환은 보통의 L-아미노산 이외의 구조를 포함할 수도 있다. 따라서, D-아미노산이 본 발명에서의 항원 펩티드에서 자주 포함되어 있는 L-아미노산으로 치환될 수도 있고 이는 아직 연구가 진행 중이다. 더 나아가, 비기본 R-기를 포함하는 아미노산 (즉, 자연적으로 발생하는 단백질의 보통 20개의 아미노산에 포함되어 있는 R 기를 제외한 R 기) 또한 본 발명에 따르면 면역원 및 면역원성이 있는 폴리펩티드를 생성하기 위해서는 치환의 목적으로 사용될 수도 있다.

[0044] 만약 하나의 위치보다 더 많은 곳에서의 치환이 아래에 정의된 바와 같이 실질적으로 동등하거나 그 이상의 항원 활동성을 가지고 있는 펩티드를 생성해 낸다면, 이 치환의 결합이 시험되어 이 결합이 첨가적인 또는 시너지 효과를 내는지를 알아볼 것이다. 최대 한 개의 펩티드 중 4개의 위치에서 치환이 가능하다.

[0045] "T 세포 반응"이란 특정한 세포 분열 및 생체내 또는 시험관내에서 유발된 작동체 기능의 활성화를 말한다. MHC 클래스 I에 의해 제한된 세포독성 T 세포 (CTL)의 경우, 작동체의 기능은 펩티드-펩스에 의한, 펩티드 전구체-펩스에 의한 또는 자연적으로 발생하는 펩티드-제시 표적 세포에 의한 세포 용해, 싸이토카인 분비, 바람직하게는 인터페론-감마, TNF-알파, 또는 펩티드에 의해 유도된 IL-2, 또는 탈과립 등이다. MHC 클래스 II에 의해 제한된 헬퍼 T 세포의 경우, 작동체의 기능은 펩티드에 의해 유발된 싸이토카인의 분비, 바람직하게는 IFN-감마, TNF-알파, IL-4, IL5, IL-10, 또는 IL-2, 또는 펩티드에 의해 유도된 탈과립을 들 수 있다. 이 외의 가능한 세포독성 T 세포 및 헬퍼 T 세포에 대한 작동체의 기능은 이 목록에 제한되지 않는다.

[0046] 세포독성 분석에 따르면, 에피토프가 기준 펩티드에 비교하여 적어도 10%의 항원성 활동이 있을 때 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 항원성 활동이란 치환된 펩티드가 기준 펩티드에 비교하였을 때 에피토프의 세포독성 T 세포에 의해 인식되는 능력이다. 따라서, 작동체:표적 커브에서 직선인 구간에서 같은 동일 당량 농도를 가진 기준 펩티드와 치환 펩티드의 세포 용해 활동을 비교할 시, 치환된 펩티드에 인큐베이트된 표적 세포 살해 특정 백분율은 기준 펩티드와 같아야 하고 기준 펩티드 작동체:표적 비율의 10배보다 높지 않아야 한다.

[0047] 바람직하게는, 서열번호 1 내지 11의 펩티드에 특정한 세포독성 T 세포가 시험될 경우, 치환된 펩티드가 바탕과 비교하여 최고 세포 용해 증가의 반절을 성취하는 펩티드 농도는 대략 1mM이고, 바람직하게는 1  $\mu$ M을 넘지 않아야 하며, 더 바람직하게는 1nM를 넘지 않아야 하고, 더 더욱 바람직하게는 100pM을 넘지 않아야 한다. 가장 바람직하게는 10pM을 넘지 않아야 한다. 또한 바람직한 사항은 치환된 펩티드는 적어도 1개의 세포독성 T 세포에 의해 인식되고 더 바람직하게는 적어도 2개의 또는 더 바람직하게는 3개의 세포독성 T 세포에 의해 인식되어야 한다.

[0048] 따라서, 본 발명의 에피토프는 자연적으로 발생하는 암 관련 또는 암 특정 에피토프와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 항원성을 가지고 있는 한 기준의 펩티드로부터 4개까지의 잔유물이 다른 에피토프를 포함할 수도 있다.

[0049] 면역 반응의 유도는 숙주 면역 체계에 의해 이물질로 인식되는 항원의 존재에 따라 결정된다. 암 관련 항원의 존재의 발견에 의해 숙주의 면역 체계를 이용하여 암세포 표면에 발현되는 표적 항원에 대한 특정한 면역 반응을 일으키고 이 메커니즘을 통해 암 성장의 퇴보, 정지 또는 둔화를 유도할 수 있는 가능성성이 두각되었다. 면역 체계의 체액적인 (humoral) 및 세포를 통한 이 두 가지 모두의 방법을 이용하는 여러 가지의 메커니즘이 현재 암 면역치료 방법을 위해 연구되고 있다.

[0050] 특정한 세포 면역 반응의 요소는 특정하게 암세포를 인식하고 파괴하는 능력을 가지고 있다. 암 침투 세포 연구

또는 말초 혈액에서 단리된 세포독성 T 세포의 연구에 따르면 이러한 세포들은 암세포에 대한 자연 면역 방위에 중요한 역할을 한다 (Cheever et al., 1993; Zeh, III et al., 1999). 415개의 대장암 환자에서 추출된 표본의 분석에 의해, 갈론 (Galon) 등은 암 조직의 면역 세포의 유형, 밀도 및 위치가 현재 널리 채용되고 있는 암의 병기 결정 (TNM-staging)보다 환자의 생존율 예측에 더 나은 척도라는 것을 논증하였다 (Galon et al., 2006). 특별히 단백질, 결합 리보솜 생성물(DRIP)로부터 유도된, 보통 8개에서 11개의 아미노산으로 구성되어 있는 MHC를 가지고 있는 웨პ티드를 인식할 수 있는 클래스 I 분자 CD8-양성 T 세포 (TCD8+)는 이러한 반응에 중요한 역할을 한다. 또한 잘라진 단백질로부터 유도된 웨პ티드도 이 논문에 기재되어 있다. 인간 MHC 분자는 또한 지정된 인간 백혈구 항원이다 (HLA).

- [0051] MHC 분자는 두 개의 클래스로 구성되어 있다: MHC 클래스 I 분자는 핵이 있는 거의 모든 세포에서 찾을 수 있다. MHC 분자는 알파 중쇄 및 베타-2-미세글로불린 (MHC 클래스 I 수용체) 또는 알파 및 베타 쇄 (MHC 클래스 II 수용체)으로 각각 이루어져 있다. 이들의 3D 입체적 구조는 웨პ티드와 비공유 산호작용에 사용되는 결합 흄을 만든다. MHC 클래스 I는 대부분 내생 단백질, DRIP 및 더 큰 웨პ티드의 단백질 분해 절단에 의해 생성된 웨პ티드를 제시(present)한다. MHC 클래스 II 분자는 대부분 전문 항원 제시 세포(APC)에서 존재하며, 항원 제시 세포(APC)에 의해 세포 이를 흡수 (endocytosis)를 통해 세포 안으로 들어오고 처리된 웨პ티드를 주로 제시한다 (Cresswell, 1994). 웨პ티드와 MHC 클래스 I 분자의 결합체는 CD8-양성인 적당한 TCR (T 세포 수용체)을 가지고 있는 세포독성 T 림프구에 의해 인식되며 웨პ티드와 MHC 클래스 II 분자의 결합체는 적당한 TCR을 가지고 있는 CD4-양성 헬퍼 T 세포에 의해 인식된다. TCR, 웨პ티드 및 MHC의 화학량적인 관계는 1:1:1인 것으로 잘 알려져 있다.
- [0052] CD4-양성 헬퍼 T 세포는 CD8-양성 세포독성 T 세포에 의한 효과적인 반응 유도와 유지에 중요한 역할을 한다 (Wang and Livingstone, 2003; Sun and Bevan, 2003; Shedlock and Shen, 2003). 이 이유로 인해, 암 관련 항원 (tumor associated antigens (TAA))로부터 유도된 CD4-양성 T-세포 에피토프의 확인은 항암 면역 반응을 유발할 수 있는 의약품 개발에 중요하다 (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003).
- [0053] 염증이 없을 시, MHC 클래스 II 분자의 발현은 면역 체계의 세포로 제한되어 있으며, 특별히 전문 항원 제시 세포 (APC), 예를 들어 단핵 세포 (monocyte), 단핵세포-유도된 세포 (monocyte-derived cells), 대식 세포 (macrophage), 수지상 세포 (dendritic cells)로 제한된다. 암 환자에서 놀랍게도 암세포가 MHC 클래스 II 분자를 발현하는 것으로 보여진 바 있다 (Dengjel et al., 2006).
- [0054] 쥐와 같은 표유류 동물 모델에서 세포독성 T 세포 영향 세포 (즉, CD8-양성 T 림프구)가 없을 경우에도 CD4-양성 T 세포만으로도 인터페론-감마 (IFN $\gamma$ ) 분비를 통해 혈관 신생을 억제하여 암을 억제하는 것에 충분하다는 것이 밝혀졌다 (Qin and Blankenstein, 2000). 또한, HLA 클래스 II 분자에 의해 제시된 암 관련 항원을 인식하는 CD4 양성 T 세포는 항체 (Ab) 반응을 유도함으로써 암의 진행을 막을 수 있는 것으로 보여졌다 (Kennedy et al., 2003). HLA 클래스 I 분자에 결합하는 암 관련 웨პ티드와 반대로, 암 관련 항원 (TAA)의 클래스 II 리간드 중의 작은 숫자만이 현재까지 기재되었다 ([www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org), [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).
- [0055] HLA 클래스 II 분자의 발현이보통 면역 체계의 세포에 제한되어 있는 이유로 (Mach et al., 1996), 1차 암에서 직접 클래스 II 웨პ티드를 단리하는 가능성은 없다고 간주되었다. 하지만, 덩겔 (Dengjel) 등은 MHC 클래스 II 에피토프를 암에서 직접 성공적으로 단리하였다 (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006)).
- [0056] 세포 면역 반응을 웨პ티드가 일으키기 위해서는 (도출하기 위해서는), MHC 분자에 우선 결합을 해야 한다. 이 과정은 MHC 분자의 대립 유전자 및 웨პ티드 아미노산의 동질 이상에 따라 결정된다. MHC 클래스 I 결합 웨პ티드는 보통 8개에서 10개의 아미노산 잔기의 길이로 이루어져 있으며, 보통 그들의 서열에 두 개의 보존 잔기("앵커")을 포함하고 있으며 이는 MHC 분자의 상응하는 결합 흄과 상호 작용을 한다. 이 방법을 통해 각각의 MHC 대립 유전자는 "결합 모티프"를 가지고 있으며, 이는 어떤 웨პ티드가 특별히 결합 흄에 결합 할 수 있는지를 결정한다 (Rammensee et al., 1997).
- [0057] MHC 클래스 I에 따라 결정되는 면역 반응에서는, 웨პ티드는 암세포에 의해 발현되는 특정한 MHC 클래스 I 분자에 결합을 해야 할 뿐 아니라, 특정 T 세포 수용체 (TCR)을 가지고 있는 T 세포에 의해 인식되어야 한다.
- [0058] 암 특정 세포독성 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피토프는 효소, 수용체, 전사 인자 등의 발현된 및 같은 기원에서 출발한 변경되지 않은, 특정 암에 대해 발현이 증가된 모든 단백질 클래스로부터 유도된 어떤 분자가 될 수 있다.
- [0059] 현재 암 관련 항원의 분류는 다음의 군을 포함한다 (Novellino et al., 2005):

- [0060] 1. 암 고환 항원: 최초로 발견된 T 세포에 의해 인식될 수 있는 TAA는 이 클래스에 속한다. 이들은 원래 암 고환 항원 (cancer-testis (CT) antigens)이라고 불렸고 그 이유는 조직적으로 다른 인간 암 및, 보통 조직, 단지 고환의 정모 세포/정원 세포 및 가끔씩 태반에서 발현되는 이유 때문이다. 고환의 세포가 HLA 분자의 클래스 I 및 II를 발현하지 않기 때문에, 이런 항원들은 보통 조직의 T 세포로 인해 인식될 수 없으며 따라서 암 특정 면역성이 있다고 고려된다. CT 항원의 잘 알려진 예로서는 MAGE 패밀리 구성원 또는 NY-ESO-1이 있다.
- [0061] 2. 분화 항원: 이 TAA들은 암이 처음 생성된 암 조직과 정상 조직 사이에 공동으로 분배된다 대부분은 흑 세포종에서 및 정상 멜라닌세포에서 발견된다. 이들 멜라닌세포 혈통-관련 단백질은 멜라닌의 생합성에 관여하고 따라서 이는 종양 특징이라고 할 수 없으나 그럼에도 불구하고 암 면역 치료에 널리 이용되고 있다. 예는 티로시나아제 및 흑세포종의 Melan-A/MART-1 또는 전립선암의 PSA를 포함하지만, 이에 국한되지 않는다.
- [0062] 3. 과잉발현된 TAAs: 널리 발현되는 TAAs를 코딩하는 유전자는 조직학적으로 다른 암의 타입 및 여러 개의 정상 조직에서 발견된 바 있으며, 이는 보통 발현의 정도가 좀 더 낮았다. 처리되고 잠재적으로 정상 조직에 의해 제시되는 많은 에피토프들이 T-세포의 인식을 얻는 한계치에는 다다르지 못하고, 그들이 암세포에서 과잉발현됨에 따라 예전에는 허용되었던 항암 반응을 일으킨다는 것도 가능하다. 이 TAA 클래스의 두드러진 예는 Her-2/neu, 서비빈(Survivin), 텔로머레이즈(Telomerase) 또는 WT1을 포함한다.
- [0063] 4. 암 특정 항원: 이 특이한 TAA는 정상 유전자의 돌연변이에 의해 생성된다 ( $\beta$ -카테닌, CDK4 등). 이 분자 변화의 몇몇은 종양 변환 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양 특정 항원은 보통 정상 조직에 대한 자가 면역 반응을 일으키는 것에 대한 위험 없이 강한 면역 반응을 유도할 수 있다. 이에 반해서, 이 TAA는 대부분의 경우 이들이 발견된 정확한 암에 한해 관련이 있고, 이는 보통 여러 개의 다른 종양 사이에 공동으로 분배되지 않는다.
- [0064] 5. 비정상 면역 후 변경에서 발생하는 TAA: 이런 TAA는 특정하지도 또는 종양에서 과잉발현되지도 않는 단백질로부터 유도된 것일 수도 있으나 종양에서 활성적인 면역 후 프로세스를 통해 종양과 관련이 있게 된다. 이러한 클래스에 대한 예는 MUC1의 경우와 같이 새로운 에피토프를 생성하는 변경된 당화(glycosylation) 패턴 또는 단백질 퇴화 중 일어나는 종양 특정 또는 비특정 스플라이싱을 포함한다 (Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004).
- [0065] 6. 종양유발성바이러스 단백질: 이 TAA는 바이러스 단백질로서 종양 생성 프로세스에서 중요한 역할을 하고 외부 물질이기 때문에 (인간에서의 발생이 아님) T 세포 반응을 일어낼 수 있는 능력을 가지고 있다. 이런 단백질의 예로서는 자궁 경부암에서 발현되는 인간유두종 타입 16 바이러스 단백질, E6와 E7을 들 수 있다.
- [0066] 세포독성 T-림프군에 의해 암 특정 또는 암 관련 항원 단백질로 인식되기 위해서 및 치료에 사용될 수 있기 위해서는 특정 조건이 성립되어야 한다. 항원은 암세포에서만 발현되거나 훨씬 적은 양으로 정상 건강한 조직에서 발현되어야 한다. 더욱이 바람직한 것은 각각의 항원이 한 가지의 종양 타입에서만 발견되는 것이 아니라 높은 농도로 발견되는 것이다 (즉, 세포 당 각각의 웨이트드 사본 숫자). 암 특정 및 암 관련 항원은 종종 기능(예: 세포 주기 조절 또는 세포 파사 억제)에 따라 정상 세포의 종양 세포로서의 변경에 직접적으로 관련된 단백질로부터 유도된다. 추가적으로, 직접적으로 변경을 야기시키는 단백질의 하류의 표적이 상향 조절될 수도 있고 따라서 간접적으로 암과 관련이 있을 수 있다. 이렇게 간접적으로 종양과 관련된 항원은 백신에 대한 접근에 있어 표적이 될 수도 있다 (Singh-Jasuja et al., 2004). 두 개 모두의 케이스에서 항원의 아미노산 서열에 에피토프가 존재하는 것은 필수적인 사항이다. 그 이유는 이런 종양 관련 항원로부터 유도된 웨이트드("면역성 웨이트드")가 시험관내 또는 생체내 T-세포 반응을 불러 일으킬 수 있기 때문이다.
- [0067] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 어떤 웨이트드도 T-세포 에피토프로 작용할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 T-세포 반응을 불러 일으킬 수 있기 위한 조건은 상응하는 TCR이 있고 이 특정 에피토프에 대한 면역 내구력이 없는 것이다.
- [0068] 따라서, TAA는 종양 백신의 개발에 시작점이다. TAA를 식별하고 특성화하는 방법은 환자 또는 건강한 주체에서 단리할 수 있는 CTL 사용의 기반으로 하거나 또는 차별적인 전사 프로필 또는 종양과 건강 조직 사이의 차별적인 웨이트드 발현 패턴을 기반으로 한다 (Lemmel et al., 2004; Weinschenk et al., 2002).
- [0069] 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주 또는 이런 조직이나 세포주에서 선택적으로 과잉 발현된 유전자 식별은 면역 치료에 이런 유전자로부터 전사된 항원에 대한 사용에 대한 정확한 정보를 제공하지 않는다. 이는 이들의 항원의 각각의 에피토프의 소집단만이 이런 용도에 적당하기 때문이고 그 이유는 T-세포에 상응하는 TCR이 있고 이 특정 에피토프에 대한 면역 내구력이 없거나 최소한이어야 하기 때문이다. 과잉 발현된 또는 선택적으

로 발현된 기능성의 T 세포가 있는 MHC 분자와 연결되어 제시된 단백질에서 발생한 펩티드만을 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능성의 T 세포는 특정한 항원에 의해 유도되었을 때 클론성 확장이 가능하고 작동자 기능을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다 ("작동자 T 세포"). 전형적인 T 세포의 작동자 기능은 인터페론-감마, 퍼포린 (perforin) 및 그랜자임 (granzyme)의 분비를 포함한다.

- [0070] T-헬퍼 세포는 항암 면역에서 CTL의 작동자 기능을 총괄하는 중요한 역할을 한다.  $T_{H1}$  타입의 T-헬퍼 세포 반응을 일으키는 T-헬퍼 세포 에피토프는 CD8-양성 킬러 T-세포의 종양 관련 펩티드/MHC 콤플렉스를 세포의 표면에 지니고 있는 종양 세포에 대한 세포독성 기능 등의 작동자 기능을 지지한다. 이렇게 함으로써, 종양 관련 T-헬퍼 세포 펩티드 에피토프 홀로 또는 다른 종양 관련 펩티드와 복합하여 활성적인 항암 면역 반응을 자극하는 백신의 제약 원료로 사용될 수 있다.
- [0071] CD8와 CD4 관련 두 가지의 반응 모두 항암 효과에 공동으로 상승적으로 작용하여 기여를 하기 때문에, CD8 양성 CTL(리간드:MHC 클래스 I 분자 + 펩티드 에피토프) 또는 CD4 양성 T-헬퍼 세포(리간드:MHC 클래스 II 분자 + 펩티드 에피토프)에 의해 인식되는 종양 관련 항원의 식별과 특성부여는 종양 백신의 개발에 중요하다.
- [0072] 따라서, 본 발명의 목표는 MHC의 두 개 클래스에 모두 결합이 가능한 펩티드의 새로운 아미노산 서열을 제공하는 것이다.
- [0073] 본 발명은 교모세포종을 치료하는 데에 유용한 펩티드를 제공한다. 이 펩티드는 질량 스펙트로메트리에 의해 1차 교모세포종 표본에서 HLA 분자에 의해 자연적으로 제시됨이 증명되었다(실시예 1과 도 1 참조). 펩티드 중의 10개가 유도된 근원 유전자인 PTPRZ1은 정상 조직에 비해 높은 레벨로 교모세포종에서 과발현된다고 보여졌고, 이는 이들의 펩티드가 높은 정도의 종양 관련성을 나타내는 것을 보여준다. 즉 이 펩티드는 종양 조직에서 높은 수준으로 제시되는 데에 반해 정상의 세포에서는 그렇지 않다는 것이다. 11번째의 펩티드가 유도된 근원 유전자인 CHI3L2는 원래 연골 세포에서 식별되었다. HLA-결합된 펩티드는 면역 체계에 의해 인식되고, 특별히 T 림프구/T 세포에 의해 인식된다. T 세포는 인식되는 HLA/펩티드 콤플렉스를 제시하는 세포를 파괴할 수 있다. 예를 들면 PTPRZ1- 또는 CHI3L2로부터 유도된 펩티드를 제시하는 교모세포종 세포를 말한다. 본 발명의 몇몇의 펩티드는 T 세포 반응을 자극하는 능력이 있다고 보여졌다 (실시예 3과 도 3 참조). 따라서, 펩티드는 환자의 면역 반응을 일으키는 데에 유용하고 이로 인해 종양 세포를 파괴시킬 수 있다. 환자의 면역 반응은 기재된 펩티드나 적당한 전조 물질 (예: 늘어난 펩티드, 단백질, 또는 이 펩티드를 코딩하는 핵산) 또는 더 바람직하게는 면역원성을 더 강화시킬 수 있는 약제 (즉, 보조약제)과 함께 직접적으로 주입함으로써 유도될 수 있다. 이런 치료 백신으로부터 일어나는 면역 반응은 종양 세포에 대해 높은 수준으로 특정적이다. 이는 본 발명의 표적 펩티드는 정상 조직에서는 제시되지 않고, 이로 인해 환자의 정상적인 세포에 대해 원하지 않는 자가면역 반응을 일으키는 위험이 적어지기 때문이다.
- [0074] 암 치료에 도움이 될 뿐만 아니라, 본 발명의 펩티드는 진단에서도 유용하다. 이 펩티드는 교모세포종에서 생성되었고, 및 이들의 펩티드는 정상 조직에 존재하지 않기 때문에, 이 펩티드는 암을 진단하는 데에 사용될 수 있다.
- [0075] 조직검사에서의 TUMAP가 있다는 것은 암을 진단하는 데에 병리학자에게 도움을 줄 수 있다. 특정한 TUMAP의 감지는 항원 또는 질량 스펙트로메트리 또는 다른 방법은 병리학자들이 특정한 조직이 악성인지 또는 염증이 있는 것인지 또는 일반적으로 병적인 것인지를 병리학자가 결정하는 데에 이용된다. TUMAP의 군들이 존재한다는 것은 병적인 조직의 분리 또는 소분류를 가능하게 한다.
- [0076] 병적인 조직 표본에서 TUMAP가 감지되는 것은 면역 체계를 이용한 치료의 이득에 대해 결정을 하는 데에 도움을 준다. 이는 특별히 T 림프구가 메커니즘에 관련되어 있는 것으로 알려져 있거나 관련되어 있을 것으로 예상될 때는 더욱 그렇다. MHC 발현 상실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 피하는, 잘 공지된 메커니즘이다. 따라서, TUMAP의 존재는 이 메커니즘이 분석되는 세포에 의해 악용되지 않는다는 것을 보여준다.
- [0077] TUMAP는 TUMAP에 대한 또는 TUMAP과 MHC 분자의 결합체에 대한 T 세포 반응 또는 항원 반응 TUMAP에 대한 림프구 반응을 분석하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 림프구 반응들은 추가 치료 단계에 대한 의사 결정을 위한 전조 마커로 사용될 수 있다. 이러한 반응은 단백질, 핵산, 자가 조직의 물질, 림프구의 입양 전송 등의 다른 방법으로 림프구의 반응을 일으키는 데 목적을 둔 면역 치료의 대리모를 마커로 사용될 수도 있다. 유전자 치료의 세팅에서, TUMAP에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려될 수 있다. 림프구 반응의 감시는 예를 들어 이식대편대숙주병과 대숙주대이식병 등의 이식 치료법의 치료 후 정기 검진에서 가치 있는 도구가 될 수 있다.
- [0078] TUMAP는 MHC/TUMAP 복합체에 대한 특정한 항원의 발생과 개발에 사용될 수도 있다. 이는 병적인 조직을 표적으로

로 하여 독소 또는 방사성 물질을 이용하는 치료에 사용될 수도 있다. 이 항원의 또 하나의 사용 용도는 PET 등의 영상 목적으로 방사성 핵종을 병적인 조직으로 표적화하는 것이다. 이 사용 용도는 작은 전이의 감지 또는 병적인 조직의 정확한 위치 확인에 도움을 준다.

[0079] 또한, 이들은 암 조직 검사 샘플을 기반으로 병리학자의 진단을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0080] 표 1은 본 발명의 펩티드, 그들의 상응하는 서열번호, 상응하는 펩티드가 결합하는 HLA 대립 유전자 및 이들의 펩티드가 유도된 근원 단백질을 보여 준다.

표 1

## 본 발명의 펩티드

서열번호	펩티드 코드	서열	HLA 대립 유전자	원조 단백질
1	PTP-001	ALTTLMHQL	A*0205	PTPRZ1
2	PTP-002	FLYKVILSL	A*02	PTPRZ1
3	PTP-003	AIIDGVESV	A*02	PTPRZ1
4	PTP-004	FLLPDTDGL	A*02	PTPRZ1
5	PTP-005	KVFGAPITV	A*02	PTPRZ1
6	PTP-006	QQSDYSAAL	A*02#	PTPRZ1
7	PTP-007	TQDDYVLEV	A*02#	PTPRZ1, PTPRG
8	PTP-008	QHEGTVNIF	B*38	PTPRZ1
9	PTP-009	SVFGDDNKALSK	결정되지 않음	PTPRZ1
10	PTP-010	EIGWSYTGALNQK N	HLA-DR	PTPRZ1
11	CHI-001	SLWAGVVVL	A*02	CHI3L2
# 아마도 서브타입 A*205				

[0081]

[0082] 놀랍게도, 서열번호 2는 1차 선평평상피세포형 암종(폐암의 한 종류)에 의해서도 제시된다고 밝혀졌고 따라서 여기에서 기재된 바에 의하면 이 종류의 암의 치료에 이용될 수도 있다.

[0083] 단백질 타이로신 포스파타아제, 수용체-타입, 제타 1(Zeta 1) (PTPRZ1, PTP- $\zeta$ ) PTPRZ1는 수용체 타입 단백질 타이로신 포스파타아제 패밀리의 구성원 중의 하나이고 두 개의 세포질 타이로신-단백질 포스포타아제 도메인, 알파-탈산탈수 효소 도메인 및 파이프로넥틴 타입-III 도메인을 가지고 있는 단일-관통 타입 I 세포막 단백질을 유방암(Perez-Pinera et al., 2007), 다발성 경화증 손상 부분의 재 유수초화 희소돌기아교세포(Harroch et al., 2002), 그리고 저산소 환경에서의 인간 태생 신장 세포(Wang et al., 2005)에서 코딩한다 (Wu et al., 2006).

[0084] 단백질 및 전사물은 교모세포종에서 모두 과발현되고, 이는 촉각주성(haptotactic) 이동을 촉진시킨다 (Lu et al., 2005). 더욱이, PTPRZ1은 종종 교모세포종에서 계놈의 DNA 레벨에서 확대된다 (Mulholland et al., 2006).

[0085] 카플란 (Kaplan) 등은 PTP- $\gamma$ 를 포함한 3개의 인간 수용체 PTP 유전자를 클론하였다 (Kaplan et al., 1990). 5 개의 신장 세포 및 폐 암세포 계통에서 암세포 계통 중의 3개에서 하나의 PTPG 대립 유전자가 유실됨이 밝혀 졌으나 실험된 몇몇의 조혈 세포주에서는 유실되지 않았다. 따라서, PTP- $\gamma$  유전자는 신장 및 폐암에서 종양 억제 유전자의 역할을 할 수 있음을 제안하는 성질을 가지고 있는 것으로 밝혀 졌다. 겹빙크 (Gebbink) 등은 '새로운' 수용체-유사 단백질-타이로신 포스포타아제의 패밀리 구성원 중의 하나인 5.7 kb 크기의 쥐 cDNA를 단리했으며 이를 RPTP $\mu$ 라고 하였다 (Gebbink et al., 1991). 이 cDNA는 1,432 길이의 아미노산으로 만들어진 (신호 펩티드를 포함하지 않는) 단백질을 예상하였고 이는 계산된 문자 질량이 161,636Da이다. 또한, 그들은 인간 유사체 역시 클론하였으며 이는 쥐 단백질 비교 98.7%의 아미노산 유사성을 보였다. 예상된 쥐 단백질은 722 개의 세포밖 부분 아미노산으로 만들어져 있고, 13개의 가능한 N-당화 위치를 포함하고 있으며, 하나의 막관통 도메인을 가지고 있고, 다른 타이로신 포스포타아제의 촉배 도메인과 상동하는 두 개의 칙렬식 반복을 포함하는 688개의 아미노산으로 구성된 세포 내 부분으로 되어 있다. RNA 블롯 분석은 폐에서 가장 풍부하지만 뇌와 심장에서도 훨씬 적은 양으로 존재하는 하나의 전사물을 보여 주었다. 인간 PTP $\mu$  유전자는 인간/ 쥐 체세포 클론 하이브리드의 서던 분석에 의해 18pter-q11에 할당되었다.

[0086] PTP- $\epsilon$  cDNA는 Krueger 외에 의해 단리되었다 (Krueger et al., 1990). 700개의 아미노산으로 만들어진 단백질

은 짧은 세포외 도메인과 두 개의 직렬식 반복 세포안 PTPase 도메인을 가지고 있다. 높은 레벨의 PTP-e 전사물이 쥐 뇌와 정소에서 발견되었다. 이 2개의 PTP- $\epsilon$ 의 서브타입 막관통, 소용체-타입 서브타입 및 더 짧고, 세포질인 서브타입은 다른 프로모터와 5-프라임 엑손을 사용하여 하나의 유전자를 통해서 발생되는 것으로 밝혀졌다.

- [0087] 바르네아 (Barnea et al., 1993)은 인간 및 쥐의 PTP- $\gamma$ 를 뇌 cDNA 라이브러리에서(이 연구진에 의해 PTP- $\gamma$ 로 지정된) 유전자 cDNA를 클론하였고, 그들의 예상된 폴리펩티드 서열을 분석하였다. 인간 (1,445 아미노산) 및 쥐 (1,442 아미노산) 서열은 아미노산의 레벨에서 95%의 동일함을 가지고 있고, 추정적인 세포외 도메인, 하나의 막관통 도메인, 2개의 직렬성 촉매 타이로신 포스파타아제 도메인을 예상한다. 세포외 도메인은 266개의 아미노산을 가지고 있고 이는 아연이 포함된 탄수 탈수 효소 (MIM 151460)와 비슷하고 이는 PTP- $\gamma$ 와 PTP- $\zeta$  (PTPRZ1)가 25개의 수용체 타이로신 포스파타아제의 소폐밀리를 대표하는 것을 제안한다. PTP- $\gamma$ 의 유전자는 30개의 엑손을 가지고 있으면 이는 약 780kb의 사이즈이다. 이는 다른 수용체 PTP 유전자보다 훨씬 큰 것이다. CD45 유전자 (MIM 151460)은 대략 100kb정도 되고 다른 수용체들은 이보다 더 적다.
- [0088] 다른 수용체-타입 타이로신 포스페타아제, 단백질 타이로신 포스파타아제 zeta (PTPRZ1) [PTP- $\zeta$ , HPTP-ZETA, HPTPZ, RPTP-BETA( $\beta$ ), 또는 RPTPB로도 알려진]은 90년대 초에 두 연구진에 의해 cDNA 서열로 단리되었다. 레비 (Levy) 등은 (Levy et al., 1993) 인간 유아 뇌간 mRNA 발현 라이브러리에서 cDNA 클론을 단리하였고, 2,307 아미노산을 포함하는 큰 수용체-타입 단백질 타이로신 포스페타아제의 완전한 아미노산 서열을 추론하였다.
- [0089] 레비 등은 PTP $\beta$  (PTPRZ1)라고 그들이 지정한 단백질이 두 개의 세포내 PTPase 도메인을 가지고 있고, 1,616 아미노산으로 된 세포외 도메인을 가지고 있는 막관통 단백질이라는 것을 밝혀 냈다. PTP- $\gamma$  (MIM 176886)과 같이, 세포외 도메인의 266 아미노 말단 잔기는 탄산 탈수 효소와 높은 정도의 유사성이 있다 (MIM 114880 참조). PTPRZ1을 코딩하는 인간 유전자는 염색체 원위치 재조합에 의해서 염색체 7q31.3-q32에 위치되었다 (Ariyama et al., 1995). 노던 블롯 분석에 의하면 PTP-제타는 인간 중추신경계에서만 발현된다. 원위치 재조합에 의해, (Levy et al., 1993) 소뇌의 조롱박(Purkinje) 세포층, 덴테이트 짐스(dentate gyms), 측면 뇌실의 앞뿔의 뇌실막밀세포층을 포함한 성인 인간 뇌의 다른 위치에 따른 발현을 위치시켰다. Levy는 이것이 발현이 신경계에서만 일어나는 처음의 포유류 타이로신 포스파타아제라고 서술했다. 또한, 젖과 동물의 배아 뇌에서 높은 레벨로 발현되는 것이 중추 신경계의 개발에 중요한 기능을 한다는 것을 말해준다.
- [0090] 따라서, PTP 수용체 패밀리 단백질은 공통의 PTPase 시토졸 도메인 건축을 가지고 있는 세포막 결합 수용체, 비세포막결합 서브타입을 포함한 상당히 다양한 패밀리라고 특징지어졌다. 태아 및 배아 조직에서의 발현이 이들 단백질의 개발 생물학적인 역할을 제안하였지만, 정상 및 병적 생물학에서의 그들의 완전한 기능은 아직도 완전히 이해되지 않았다.
- [0091] US 6,455,026은 PTP- $\zeta$  (PTPRZ1)을 뇌종양의 치료와 시각화의 목적으로 사용하기 위해 식별하였다. 이 적용성은 치료와 영상화의 목적으로 뇌 종양 세포를 특정적으로 표적으로 하는 방법과 시약을 제공하였다. 뇌종양을 치료하는 데에 유용한 PTP- $\zeta$  친화력 기반 화합물과 구성은 제공되었고, 이들의 구성과 화합물은 대부분 2개의 군으로 나누어질 수 있다: 종양 세포의 성장을 막는 세포독성 일부분을 가지고 있는 PTP- $\zeta$  결합 접합 화합물 및 PTP- $\zeta$  결합 일부분은 PTP- $\zeta$ 의 정상 기능을 변화시키고, 따라서 세포의 성장을 막는 PTP- $\zeta$  결합 화합물 구성.
- [0092] 처음 연구진에서는, PTP- $\zeta$  결합 치료용 접합 화합물이 제공되었다. 이들의 화합물은 일반적으로  $\alpha$ (Pz)C라는 공식을 가지고 있었다. 여기서  $\alpha$ (Pz)는 하나 또는 그 이상의 일부분이었고 이는 특정히 인간 단백질 타이로신 포스파타아제- $\zeta$ 에 결합을 하였으며, 및 C는 하나 또는 그 이상의 세포독성을 가지고 있는 일부분이다. 더 바람직한 구현에서는 (이는 모든 군에게 공개되었다)  $\alpha$ (Pz)가 항원 또는 항원의 일부분이란 것이 공개되었다. 두 번째의 군에서는 뇌 종양 세포에서 PTP- $\zeta$ 의 정상 기능을 바꾸고 뇌 종양 세포의 성장을 막는 PTP- $\zeta$  결합 치료 화합물이 제공되었다. 이 PTPRZ1 결합 치료 화합물은 일반적으로  $\alpha$ (Pz)라는 공식을 가지고 있고, 여기서  $\alpha$ (Pz)는 하나 또는 더 많은 일부분을 말하고, 이는 특정적으로 인간 단백질 타이로신 포스파타아제- $\zeta$ 와 결합을 하며  $\alpha$ (Pz)의 결합은 단백질 타이로신 포스파타아제- $\zeta$ 의 기능을 바꾼다.
- [0093] US 7,060,275 B2는 PTPRZ1의 스플라이싱 변경, 이런 변경을 포함하는 벡터 및 여러 가지의 변경에 대한 항원에 대해 공개한다.
- [0094] 키틴 분해 효소 3-유사 2(CHI3L2)는 원래 연골 세포에서 식별되었다. 이는 자주 류마티즘 관절염의 표적 항원으로 기재된 바 있다. CHI3L2와 암의 관련은 밝혀진 바 없다. 키틴 분해 효소 3-유사 단백질은 섬유아 세포 같은 인간 결합 조직 세포의 증식을 세포 외부 신호로 조절되는 키나아제와 PKB 중재 신호 경로를 활성화시킴으로써

촉진한다고 알려졌다 (Recklies AD, White C, Ling H 키틴 분해 효소 3-유사 단백질 인간 연골 당단백 39 (HC-gp39) 인간 결합 조직 세포의 증식을 촉진하고 세포 외부 신호로 조절되는 키나아제와 단백질 키나아제 B-중재 신호 경로를 모두 활성화시킨다 Biochem J. 2002; 365:119-126). 쥐 키틴 분해 효소 3-유사 단백질 헬리코박터 유발 위암 모델에서 강하게 상승조절된다고 보여진 바 있다 (Takaishi S, Wang TC Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer; Cancer Sci. 2007 (3): 284-293)

- [0095] 전에는 아무 데에서도 PTPRZ1 또는 CHI3L1로부터 유도된 MHC-결합 펩티드의 뇌종양의 치료를 위한 약제로서의 사용은 고려된 적이 없다.
- [0096] 따라서 본 발명은 서열번호 1 내지 11로 구성된 군에서 선택된 서열, 또는 서열번호 1 내지 11로 구성된 군에서 선택된 서열과 80% 이상의 상동성을 나타내는 상기 서열의 변이체를 포함하는 펩티드, 또는 T 세포의 교차 반응을 일으킬 수 있는 상기 펩티드의 변이체를 제공한다.
- [0097] 본 발명의 펩티드는 인간 주 조직 적합성 복합체(MHC) 클래스 I이나 II의 분자에 결합할 수 있는 능력이 있다.
- [0098] 본 발명에서, "상응한다"라는 것은 두 개의 아미노산 서열, 즉 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 동일함의 정도를 말한다. 앞서 말한 "일치 관계"는 두 개의 서열을 가장 최적의 상태에서 비교하고자 하는 서열을 정렬하여 비교하여 결정된다. 여기에서 비교될 서열은 두 개 서열 사이의 가장 최적의 정렬 상태에서 추가 또는 삭제가 있을 수도 있다 (예를 들면, 빈 공간이나 비슷한 것). 이런 서열의 일치 관계는 클러스타W(ClustalW) 연산법 등을 이용하여 정렬을 생성함으로써 계산이 가능하다 (Nucleic Acid Res., 1994, 22(22): 4673-4680). 보통 사용 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 정확하게는, 벡터 NTI, GENETYX, BLAST 또는 공용 데이터베이스에서 제공하는 분석 기구, 예를 들면, 웹사이트 (<http://dragon.bio.purdue.edu/bioinfolinks/>) 등에서 찾을 수 있는 것 등이 사용될 수 있다.
- [0099] 이런 예술에 숙련된 사람일 경우, T 세포가 특정한 펩티드의 변경종에 의해 유도되었을 때, 이가 그 펩티드 자체와 교차 반응을 할 수 있을지의 여부를 평가할 수 있을 것이다 (Fong et al., 2001b) (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).
- [0100] 주어진 아미노산 서열의 "변경종"이란 것은, 예를 들면, 하나 또는 두 개의 아미노 잔기의 측쇄가 변경되었을 때 (예를 들면 그들을 다른 자연적으로 일어나는 아미노 잔기의 측쇄와 대체하거나 다른 측쇄와 대체하는 것) 그 펩티드가 여전히 HLA 분자와 서열번호 1에서 11의 주어진 아미노산 서열을 가지고 있는 펩티드와 상당히 비슷한 방법으로 결합을 할 수 있는 것을 말한다. 예를 들면, HLA-A\*02 또는 DR 등과 같은 적당한 MHC 분자의 흠에 상호 작용을 하거나 결합할 수 있는 능력을 향상시키거나 적어도 유지를 할 수 있도록 펩티드가 변경될 수 있고, 이로서 활성화된 CTL의 TCR에 상호 작용을 하거나 결합할 수 있는 능력은 향상되거나 적어도 유지를 할 수 있게 된다. 이런 CTL은 그 결과로 세포와 교차 반응을 할 수 있고 본 발명의 측면에서 정의된 펩티드의 자연 아미노 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 죽일 수 있다. 과학적 문헌 (Rammensee et al., 1997) 및 데이터베이스 (Rammensee et al., 1999)에서 얻을 수 있듯이, 특정 위치의 HLA 결합 펩티드는 보통 HLA 수용체의 결합 모티프에 맞게 되어 있는 핵심 서열을 이루는 앵커 잔기이고, 이는 극성, 전기중립학적, 소수성이고 결합 흠을 이루고 있는 폴리 펩티드 쇄의 공간적 속성을 가지고 있는 것으로 정의된다. 따라서, 이런 예술에 숙달된 사람은 서열번호 1에서 11까지의 아미노 서열을 변화시킬 때, 알려져 있는 앵커 잔기를 유지함으로써 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I과 II 분자에 결합을 할 수 있는 능력을 유지할 것인지를 결정할 수 있다. 본 발명의 변이체들은 활성화된 CTL의 TCR에 결합할 수 있는 능력을 유지하며, 이런 CTL은 그 결과로 세포와 교차 반응을 할 수 있고 본 발명의 측면에서 정의된 펩티드의 자연 아미노 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 죽일 수 있다.
- [0101] T-세포 수용체와의 상응 관계에 많이 기여하지 않는 이들 아미노산 잔기들은 그들의 결합이 T-세포 반응성에 크게 영향을 끼치지 않으며 관련 있는 MHC과의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산으로 대체하여 변경을 할 수 있다. 따라서, 주어져 있는 조건 이외에, 본 발명의 펩티드는 아미노 서열 또는 주어진 변이체의 부분을 포함하고 있는 어떤 펩티드가 될 수도 있다 (여기서 발명가들은 어떤 펩티드가 올리고펩티드 또는 폴리펩트드를 포함한다고 정의한다).

## 표 2

표 2 제목 서열번호 1 내지 10에 따른 펩티드의 변이체 및 모티프

PTP-001		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		A	<b>L</b>	T	T	L	M	H	Q	<b>L</b>
	변이체		V		P	E	V	I	H	Y	
			Y		F	D	L	V	V		
					I	K	I	L			
					M	N		A			
						P					
		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PTP-002	펩티드 코드		F	<b>L</b>	Y	K	V	I	L	S	<b>L</b>
	변이체		M								L
					E						K
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y	S	
			F		F	D	Y	T	H		
			K		P	T	N				
			M		M		G				
			Y		S		F				
			V		R		V				
						K	H				
PTP-003		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		A	<b>I</b>	I	D	G	V	E	S	<b>V</b>
	변이체		M								L
			L								L
					E						K
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
PTP-004		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		F	<b>L</b>	L	P	D	T	D	G	<b>L</b>
	변이체		M								L
					E						K
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	D	K	L	Y	S	
			K		F	T	Y		H		
			M		P		N				

			Y	M	G						
			V	S	F						
				R	V						
					K	H					
PTP-005		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		K	V	F	A	G	I	P	T	V
	변이체			M							L
				L							L
					E				K		
			I	A	G	I		A	E		
			L	Y	P	K	L	Y			
			F	P	T	Y	T	H			
			M	M		N					
			Y	S	F						
PTP-006		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		Q	Q	S	D	Y	S	A	A	L
	변이체			V		P	E	V	I	H	Y
			Y		F	K	L	V	V		
					I	N	I	L			
					M	P		A			
PTP-007		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		T	Q	D	D	Y	V	L	E	V
	변이체			V		P	E	V	I	H	Y
			Y		F	K	L	V	V		
					I	N	I	L			
					M	P		A			
PTP-008		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	펩티드 코드		Q	H	E	G	T	V	N	I	F
	변이체				D						
			I			E	M	V	Y	K	
						P	V	I	V	Y	
						L	A	T	N	N	
						E	R	K		R	
						G	N				
						L	H				
						K					
						S					

[0103]

[0104] 또한 MHC-클래스 II에 의해 제시된 펩티드는 특정한 HLA-대립 유전자-특정 모티프에 맞는 아미노산 서열 및, 선택 사항으로, 핵심 서열의 기능을 방해하지 않는 (즉, 펩티드와 전체 또는 자연적인 상대 파트를 인식하는 T 세포 클론 중의 부분 집합 사이의 상호 작용에 관련이 없는) N- 및/또는 C-말단 확장을 포함하고 있는 "핵심 서열"을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, N- 및 또는 C- 말단 확장은 한 개에서 10개 사이의 아미노산 길이로 구성되어 있을 수 있다. 이런 펩티드는 MHC 클래스 II 문자를 직접적으로 적재하기 위해 사용될 수도 있고 또는 여기 아래에 있는 기재에 따라 서열이 벡터로 클론이 될 수도 있다. 이 펩티드가 세포 안에서 더 큰 펩티드를 프로세스한 결과물로 이루어져 있기 때문에, 더 긴 펩티드도 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드는 어떤 사이즈가 될 수도 있으나, 대부분 문자 질량이 100,000보다 작고, 바람직하게는 50,000보다 작으며, 더 바람직하게는 10,000보다 작으며 전형적으로는 약 5,000 정도이다. 아미노산 잔기의 수의 관점에서, 본 발명의 펩티드는 1,000개 보다 적은 잔기를 가지고 있을 수도 있고, 바람직하게는 500개 보다 적은 잔기를 가지고 있으며, 더욱 바람직하게는 100개 이하의 잔기를 가지고 있으며, 가장 바람직하게는 30개와 8개 사이의 잔기를 가지고 있다. 따라서, 본 발명은 전체 길이가 8에서 100이 되는 펩티드와 변이체를 제공하고, 더 바람직하게는 이는 8에서 30사이이고, 가장 바람직하게는 8에서 16개이며, 이를 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 아미노산이라고 한다. 유사하게, 발명의 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 자연적으로 생성되는 또는 인공적인 변이체들은 종종 길이 변이체이다.

- [0105] 만약 12 아미노산 잔기보다 더 긴 웨პ티드가 MHC 클래스 II 분자에 결합하는 데에 직접 사용되었다면, 핵심 HLA 결합 부분 옆의 잔기가 웨პ티드가 MHC 클래스 II 분자의 결합 홈에 특정하게 결합 할 수 있는 능력에 크게 영향을 주지 않거나 또는 T 세포 (T-헬퍼 세포)에게 웨პ티드를 제시하는 능력에 영향을 주지 않는 잔기가 있는 것이 바람직하다. 그러나, 앞에서 말한 바처럼, 예를 들면 폴리핵산에 의해 코딩되었을 경우, 이렇게 더 큰 사이즈의 웨პ티드는 적당한 항원-제시 세포에 의해 작게 잘리기 때문에 더 큰 웨პ티드도 사용될 수 있다.
- [0106] 또한 8-10개 아미노산 길이 사이의 MHC 클래스 I 에피토프가 거의 대부분 더 긴 그 에피토프를 포함하고 있는 웨პ티드 또는 단백질에서부터의 프로세싱에 의해 생성이 되는 것도 가능하다. 그 에피토프 옆에 있는 잔기는 그 에피토프를 드러내기 위해 필요한 단백 분해에 상당한 영향을 주지 않는 것이 바람직하다.
- [0107] 따라서, 본 발명은 MHC 클래스 I 에피토프의 웨პ티드와 변이체를 제공한다. 여기서 웨პ티드 또는 변이체는 전체 길이가 8개에서 100개 사이이고, 바람직하게는 8개에서 30개 사이이며, 가장 바람직하게는 8개에서 16개 사이이고, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개의 아미노산이다.
- [0108] 물론, 본 발명에 따른 웨პ티드 또는 변이체는 인간 주 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 또는 II의 분자와 결합을 할 수 있는 능력을 가지고 있을 것이다. 웨პ티드 또는 변이체와 MHC 복합체의 결합은 이런 예술에서 잘 알려져 있는, 예를 들면 다른 MHC 클래스 II 대립 유전자에 대한 문헌에 기재되어 있는 방법으로 실험이 가능하다 (예: (Vogt et al., 1994; Malcherek et al., 1994; Manici et al., 1999; Hammer et al., 1995; Tompkins et al., 1993; Boyton et al., 1998)).
- [0109] 특히 바람직한 실험의 제형에서는 웨პ티드는 서열번호 1 내지 11 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열을 포함하거나 상기 아미노산 서열을 본질적으로 포함한다.
- [0110] "상기 아미노산 서열을 본질적으로 포함한다"는 것은 본 발명에 따라 웨პ티드가 서열번호 1 내지 11 중 어느 하나에 따른 서열 또는 이의 변이체 이외에 추가적으로 N- 및/또는 C-말단에 위치한 아미노산이 MHC 분자 에피토프에 대해 에피토프로 작용하는 웨პ티드의 부분이 필수적으로 아닌 서열을 포함한다는 것을 의미한다.
- [0111] 그럼에도 불구하고, 본 발명에 따르면 이 서열은 세포 속으로 효능적으로 웨პ티드를 삽입하는 데에 중요할 수도 있다. 본 발명의 한 제형에서는, 웨პ티드는 예를 들면, NCBI, GenBank 등록번호 X00497로부터 유도된 HLA-DR 항원-관련 불변의 쇄 (p33, 다음의 "Ii") 80 개의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질이다 (Strubin, M. et al 1984).
- [0112] 더 나아가 바람직한 웨პ티드의 예로서는 웨პ티드가 다음의 표 2a에서 보여주는 것과 같이 특정의 앵커 아미노산-모티프를 가지고 있고, 이는 CD8 세포를 유도할 수 있는 능력이 있는 특정 HLA-서브타입을 가지고 있는 웨პ티드 사이에서 선택된 것을 말한다:

[0113]

[표 2a]

바람직한 펩티드의 HLA-서브타입 및 앵커 모티프

펩티드	HLA-서브타입		위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A*0205	펩티드 코드		A	<b>L</b>	T	T	L	M	H	Q	<b>L</b>
		앵커 모티프		x	L	x	x	x	x	x	x	L
2	A*02	펩티드 코드		F	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	I	L	S	<b>L</b>
		앵커 모티프		x	L	x	x	x	x	x	x	L
3	A*02	펩티드 코드		A	<b>I</b>	I	D	G	<b>V</b>	E	S	<b>V</b>
		앵커 모티프		x	I	x	x	x	x	x	x	V
4	A*02	펩티드 코드		F	<b>L</b>	L	P	D	T	D	G	<b>L</b>
		앵커 모티프		x	L	x	x	x	x	x	x	L
5	A*02	펩티드 코드		K	<b>V</b>	F	A	G	I	P	T	<b>V</b>
		앵커 모티프		x	V	x	x	x	x	x	x	V
6	A*02 (아마도 서브타입 A*205)	펩티드 코드		Q	<b>Q</b>	S	D	<b>Y</b>	S	A	A	<b>L</b>
		앵커 모티프		x	Q	x	x	x	x	x	x	L
7	A*02 (아마도 서브타입 A*205)	펩티드 코드		T	<b>Q</b>	D	D	<b>Y</b>	V	L	E	<b>V</b>
		앵커 모티프		x	Q	x	x	x	x	x	x	V
8	B*38	펩티드 코드		Q	<b>H</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	T	V	N	I	<b>F</b>
		앵커 모티프		x	H	E	x	x	x	x	x	F
X	A*02	펩티드에 대한 일반적인 앵커 모티프		x	L/V	x	x	x	x	x	x	L/V

[0114]

[0115] 추가적으로 펩티드 또는 변이체는 더 강한 면역 반응을 일으키기 위해 안정성 및/또는 MHC 문자와의 결합을 향상시키도록 변경될 수 있다. 펩티드 서열을 이렇게 최적화하는 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예로서는 리버스(reverse) 펩티드 결합 또는 비-펩티드 결합을 삽입하는 것을 들 수 있다.

[0116]

리버스 펩티드 결합 아미노산 잔기는 펩티드 (-CO-NH-) 링크에 의해 결합되어 있지 않고 펩티드 결합이 반대로 구성되어 있다. 이런 역-반대의 (retro-inverse) 펩타이드 모방체 물질은 분야에서 알려져 있는 방법을 사용하여 만들 수 있다. 예로서는 여기에 참조로 들어가 있는 Mezierer et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237에 기재되어 있는 것을 들 수 있다. 이 방법은 골격을 포함하지만 측쇄의 방향은 포함하지 않는 변화를 가지고 있는 펩티드 모사체를 만드는 것을 포함한다. Meziere et al (1997) MHC 결합 및 T-헬퍼 세포 반응을 위해서는 이러한 펩티드 모방체가 유용하다는 것을 보여 주었다. CO-NH 대신에 NH-CO 결합을 포함하고 있는 역-반대의 (retro-inverse) 펩티드는 단백 분해에 대한 저항하는 힘이 높다.

[0117]

비-펩티드 결합, 예를 들어  $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ , 및  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ . 미국 특허 (United States Patent) 4,897,445는 표준 절차에 의해 합성된 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 쇄에 있는 비-펩티드 결합( $-\text{CH}_2-\text{NH}$ )와  $\text{NaCNBH}_3$  존재 하에 아미노 알데히드와 아미노산의 반응에 의해 합성된 비-펩티드 결합의 고체상 합성 방법을 제공한다.

[0118]

위에 기재된 펩티드를 포함하고 있는 서열은 예를 들어, 안정성, 생물학적 이용 가능성, 및/또는 펩티드의 친화력이 향상되도록 아미노 및/또는 카복시 말단에 추가적인 화학 기를 가진 상태로 합성될 수도 있다. 예를 들면, 소수성 카보벤족실, 댄실 또는 t-부틸옥시카보닐 기가 펩티드의 아미노 말단에 추가될 수도 있다. 마찬가지로, 아세틸 기 또는 9-플루오레닐메톡시카보닐 기 또한 펩티드의 아미노 말단에 위치할 수 있다. 또한, 소수성, t-부틸옥시카보닐 또는 아미도 기는 펩티드의 카복시 말단에 추가될 수 있다.

[0119]

또한, 본 발명의 펩티드는 원자 구성이 변화되도록 합성될 수 있다. 예를 들면, 보통의 L-이성질체를 대신에 펩티드의 하나 또는 더 많은 아미노산 잔기의 D-이성질체가 사용될 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 펩티드의 적어도 하나의 아미노산 잔기는 잘 알려진 비자연성 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이런 변화에 의하여 본 발명

의 펩티드의 안정성, 생물학적 이용 가능성, 및/또는 결합 활동을 향상시킬 수 있다.

- [0120] 비슷하게, 본 발명의 펩티드 또는 변이체는 특정한 아미노산을 펩티드의 합성 전 또는 후에 반응시킴으로써 변경될 수 있다. 이런 변경의 예는 잘 알려져 있으며 이는 예를 들어 여기에 참고문헌으로 기재되어 있는 다음과 같은 문헌에 잘 정리되어 있다. R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005. 아미노산의 화학적 변경은 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 아실화(acylation), amidination, 리신(lysine)의 pyridoxylation, 환원성 알킬화 반응, 2,4,6-트라이니트로벤젠 살포산 (TNBS)과 아미노 기의 트리니트로벤질화, 카복실 기의 아미드의 변경 및 시스테인에서 시스테인산으로의 페포름산 산화에 의한 살프파이드릴(sulphydryl) 변경, 수은 유도체의 형성, 다른 티올 화합물과 혼합 이황화물의 형성, 말레이미드와 반응, 요드 화 아세트산 또는 요오드 아세트 아미드와 카복시메틸화 및 알칼리성 산도에서 시안산염과 카바밀화(carbamoylation). 이런 점에 관해서는, 단백질의 화학적 변경에 관한 더 광범위한 방법에 관해서 숙련된 사람은 문헌(Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000))의 제15장을 참조한다.
- [0121] 간략하게, 예를 들어 단백질의 알지닐(arginyl) 잔기의 변경은 종종 부가 생성물을 생성하기 위한 페닐글리옥살, 2,3-부탄다이온과 같은 비시날(vicinal) 다이카보닐 합성물과 1,2-사이클로헥산다이온의 반응을 기본으로 한다. 또 다른 예로서는, 메틸글리옥살 및 아지닌(arginine) 잔기의 반응을 들 수 있다. 시스테인은 리신과 히스티딘(histidine)과 같은 다른 친핵체 위치에서의 부수적인 변경이 없이도 변경가능하다. 결과적으로, 많은 시약이 시스테인의 변경에 사용가능하다. 특정한 시약에 대한 정보는 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)와 같은 회사의 웹사이트에서 제공한다 (<http://www.sigma-aldrich.com>).
- [0122] 단백질의 이황화 결합의 선택적인 감수분열 또한 일반적이다. 이황화 결합은 생물화학물의 열처리 중에 산화작용에 따라 형성될 수 있다.
- [0123] 글루타민산 잔기의 변경에 우워즈(Woodward's)의 시약 K가 사용될 수 있다. N-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N'-에틸카보다이아미드는 리신 잔기와 글루타민산 잔기 사이의 분자내 교차결합 생성에 이용될 수 있다.
- [0124] 예를 들어, 다이에틸피로카보네이트는 단백질의 히스티딘 잔기를 변경하는 데 사용되는 시약이다. 히스티딘은 또한 4-하이드록시-2-노네날을 이용하여 변경가능하다.
- [0125] 예를 들어, 리신 잔기와 다른 알파-아미노 기의 반응은 펩티드를 표면에 결합하는 데 또는 단백질/펩티드의 교차결합에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜과의 결합 위치이고 또 단백질의 당화의 주요 부위가다.
- [0126] 단백질의 메티오닌 잔기는 예를 들어 요도오아세트아마이드, 브로모에틸아민, 및 클로르아민 T에 의해 변경될 수 있다.
- [0127] 테트라니트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로실 잔기를 변경하는데 사용될 수 있다. 디타이로신(dityrosine)의 형성에 의한 교차 결합은 과산화수소 / 구리 이온을 이용하여 완료될 수 있다.
- [0128] 트립토판의 변경에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모석신이미드, 2-하이드록시-5-니트로벤질브로마이드 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐머캡토)-3H-인돌 (BPNS-스카톨)이 사용되었다.
- [0129] 치료적인 단백질과 펩티드의 PEG와의 성공적인 변경은 종종 순환 반감기를 연장하는 것과 관련이 있고, 단백질과 글루타르알데히드, 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트 및 포름알데히드의 교차 결합은 히드로겔을 준비하는데에 사용된다. 면역치료의 알레르겐의 화학적 변경은 칼륨 시안산염의 카바밀화에 의해 완료된다.
- [0130] 본 발명에서 변경되었거나 비-펩티드 결합을 포함하고 있는 펩티드 또는 변이체가 바람직하다. 대부분, 펩티드와 변이체는 (적어도 아미노산 잔기 사이에 펩티드 결합을 포함하는 것들) 고체형 펩티드 합성의 Fmoc-폴리아마이드 모드에 의해 합성될 수 있으며 이는 문헌 (Lu et al (1981)) 및 이 문헌에 있는 참고문헌에 의해 발표되었다. 임시적인 N-아미노 기의 보호는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐 (Fmoc) 기에 의해 제공된다. 이렇게 매우 염산-불안정한 보호 기의 반복적인 분열은 N,N-다이메틸포름아마이드의 20% 피페리딘을 사용하여 이루어진다. 측쇄 기능은 부틸 에테르 (세린, 쓰레오닌 및 티로신의 경우), 부틸 에스터 (글루탐산 및 아스파르트산의 경우), 부틸옥시카보닐 유도체 (리신 및 히스티딘의 경우), 트리틸 유도체 (시스테인의 경우) 및 4-메톡시-2,3,6-트라이메틸벤젠설포닐 유도체 (아르기닌의 경우)에 의해 보호된다. 글루타민 또는 아스파라진이 C-말단의 잔기일 경우, 측쇄 아미도 기능을 보호하기 위해 4,4'-다이메톡시벤즈하이드릴 기가 사용된다. 고체 단계 지지는 다이메틸아크릴아마이드 (골격-단량체), 비스아크릴옥시에틸렌 다이아민 (교차 결합체) 및 아크릴오일사코신 메틸에스터 (작용 부여 시약)를 포함한 세 개의 단량체로 이루어진 폴리다이메틸-아크릴아마이드 중합체를 기반으로

한다. 사용된 펩티드-대-수지(resin) 절개 가능한 연결된 물질은 산성-불안정한 4-하이드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 역으로, N,N-다이사이클로헥실-카보다이이미드/하이드록시벤조트리아졸에 의한 커플링 절차를 거쳐 추가된 아스파라진과 글루타민을 제외한 모든 아미노산 유도체는 그들의 생성된 대칭의 무수물로서 추가된다. 모든 커플링과 탈보호 반응은 난하이드린, 트라이니트로벤젠 살포산 또는 아이소틴(isotin) 시험 절차를 거쳐 감시된다. 합성이 완성되면, 50 % 스캐빈저 믹스를 포함하는 95% 트라이플루오로아세트산 산에 의한 처리를 통해 부수적인 측쇄 보호 기의 제거와 함께 펩티드는 수지 지지에서 절개된다. 보통으로 사용되는 스캐빈저로는 에탄다이티올, 폐놀, 아니솔 및 물이 있고, 정확하게 이를 중에 선택을 하기 위해서는 합성되고 있는 펩티드의 아미노산의 구성도를 고려해야 한다. 또한 펩티드 합성에 있어 고체 단계와 액체 단계 방법을 결합하는 것도 가능하다 (예를 들면, 문헌(Bruckdorfer et al., 2004) 및 이 문헌에 인용된 다른 문헌 참조).

- [0131] 트라이플루오로아세트산은 진공 하에서 증발시킨 후, 원래 펩티드를 제공하는 다이에틸 에테르에 의한 분쇄를 수행하여 제거한다. 존재하는 스캐빈저는 수성 (aqueous) 단계에서 냉동을 할 때 단순한 추출 절차를 통해 제거되어 스캐빈저가 없는 원래 펩티드를 만든다. 펩티드 합성에 필요한 시약들은 보통 칼바이오켐-노바바이오켐 (유케이) 리미티드(Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd; 영국 노팅엄 엔지7 2큐베이 소재)로부터 입수할 수 있다.
- [0132] 재결정, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피 및 (통상) 역상 크로마토그래피, 예를 들면, 아세토니트릴/물 구배 분리를 이용하는 고성능 역-단계 액체 크로마토그래피 중 하나의 또는 이들의 결합 방법으로 순화 절차를 할 수 있다.
- [0133] 박막 크로마토그래피, 전기 영동법, 특히 모세관 전기 영동법, 고체상 추출법(CSPE), 고성능 역-단계 액체 크로마토그래피, 산성 가수 분해 후 아미노산 분석 또는 고속 원자 폭격 (FAB) 질량 분석으로 펩티드의 분석이 이루어 질 수 있고, MALDI와 ESI-Q-TOF 질량 분석을 이용할 수도 있다.
- [0134] 더 나아가 본 발명은 발명의 펩티드 또는 유도체를 코딩하는 핵산(예를 들어 폴리뉴클레오티드)을 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이것들의 결합될 수도 있고, 한 줄기- 및/또는 두 줄기, 또는 본래의 또는 예를 들어 포스포로티오에이트 골격을 가지고 있는 안정화된 형태의 폴리뉴클레오티드일 수도 있으며, 펩티드를 코딩하는 한 인트론을 가지고 있을 수도, 가지고 있지 않을 수도 있다. 물론, 폴리뉴클레오티드에 의해서 코딩될 수 있는 펩티드는 자연적으로 일어나는 아미노산 잔기와 이들이 자연적으로 일어나는 펩티드 결합으로 결합된 펩티드일 수밖에 없다. 더 나아가 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따르면 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다.
- [0135] 특히, 상호보완적인 응집력 말단을 통해 DNA를 벡터로 연결하는 등의 폴리뉴클레오티드를 연결할 수 있는 여러 가지의 방법이 개발된 바 있다. 예를 들어, 상호보완적인 단일중합체 트랙은 DNA 조각에 추가될 수 있고 이 전체를 벡터 DNA에 삽입할 수 있다. 벡터와 DNA 조각은 상호보완적인 단일중합체 테일(tail) 사이의 수소 결합에 의해 이어지고 이는 재조합된 DNA분자를 생성한다.
- [0136] 한 개 또는 그 이상의 제한 위치를 가지고 있는 합성된 링커는 DNA 조각을 벡터로 붙히는 또 다른 방법 중의 하나이다. 다양한 제한 엔도뉴클라아제 위치를 가지고 있는 합성된 링커는 인터내셔널 바이오테크놀로지스 인코포레이티드 (International Biotechnologies Inc.; 미국 코넥티컷주 뉴 하aven 소재)를 포함하는 몇몇 회사로부터 입수할 수 있다.
- [0137] 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 변경하는 바람직한 방법은 문헌 (Saiki et al(1988))에 의해 발표된 폴리메라아제 연쇄 반응을 이용하는 것이다. 이 방법은 예를 들면 적당한 제한 위치를 도입하는 것을 통해 DNA를 적당한 벡터로 도입하는 데에 사용될 수도 있고, 또는 이 분야에서 잘 알려진 DNA를 유용하게 바꾸는 데에 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용될 경우에는, 폭스(pox)- 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0138] DNA (또는 레트로바이러스 벡터일 경우에는 RNA)는 적당한 숙주에서 발현되어 발명에 사용되는 펩티드 또는 유도체를 포함하는 폴리펩티드를 생성한다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 유도체를 코딩하는 DNA는 알려진 기술을 통해 사용될 수가 있고, 적당한 숙주 세포를 발명에 사용되는 펩티드의 발현과 생성을 할 수 있도록 변환을 시키는 발현 벡터를 만들 수 있도록 적당히 변경될 수 있다. 이런 기술들은 다음 문헌에서 발표된 기술을 포함하고, 이 문헌에 편입되어 있는 참조 문헌을 포함한다. US Patent Nos. 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075, 및 4,810,648.
- [0139] 발명의 합성물을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA (또는 레트로바이러스 벡터일 경우에는 RNA)는 적당한 숙주로 삽입되기 위해 다양한 종류의 다른 DNA 서열과 연결될 수 있다. 동료 DNA는 숙주의 성질, 숙주로 DNA가 도

입되는 방법 및 에피소말 유지 또는 통합이 필요한지에 따라 정해진다.

- [0140] 보통, DNA는 플라스미드 등의 발현 벡터로 제대로된 방향 및 올바른 리딩 프레임(reading frame)에 맞춰 삽입된다. 보통 발현 벡터에서는 사용가능한 컨트롤러이지만, 필요한 경우 DNA는 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 및 번역 조절 컨트롤러 뉴클레오티드 서열과 연결될 수도 있다. 그 후, 벡터는 기준 기술을 통해 숙주로 도입된다. 보통, 전부 다의 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를 선택하는 것이 필요하다. 하나의 선택 기술은 발현 벡터에 DNA 서열을 넣는 것으로 이 DNA 서열은 필요한 컨트롤 성분을 가지고 있고 이는 형질전환된 세포에서 선택이 가능한 특성을 가지고 있다. 예를 들어, 이는 항생 물질에 대한 내성을 포함한다.
- [0141] 다른 방법으로는 선택이 가능한 특성을 가진 유전자가 같이 원하는 숙주 세포를 형질전환하는 데에 사용될 수 있다.
- [0142] 본 발명에서 재조합된 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 충분한 시간에 걸쳐 당업자에게 잘 알려진 적절한 폴리펩티드가 잘 발현되도록 하는 조건 하에 배양되고 이 폴리펩티드는 나중에 회복이 가능하다.
- [0143] 박테리아 (예: 이. 콜라이 (*E. coli*) 및 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)), 효모 (예: 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류 (예: 아스페길러스 (*Aspergillus* 종), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함한 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직한 체계는 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection(ATCC); 미국 메릴랜드주 록빌 파크로운 드라이드 12301 소재)의 셀 바이올로지 콜렉션 (Cell Biology Collection)으로부터 구할 수 있는 CHO 세포 등의 포유류 세포로 된 것이다.
- [0144] 전형적인 지속적 발현을 위한 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 적당한 폴리 A 테일 및 네오마이신과 같은 저항 마커를 포함한 SV40 프로모터 등이다. 하나의 예를 들면 pSVL이고 이는 파마샤 (Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)로부터 입수가능하다. 유도가능한 포유류 발현 벡터의 한 예로는 pMSG를 들 수 있고, 이는 역시 파마샤로부터 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터로는 pRS403-406 및 pRS413-416을 들 수 있고, 이는 보통 스트라타진 클로닝 시스템스 (Stratagene Cloning Systems, 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)로부터 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효모 도입 플라스미드 (Yeast Integrating plasmids (YIp))이며, 이는 효소 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2 및 URA3를 포함한다. 플라스미드 pRS413-416는 효모 센트로미어 플라스미드 (Yeast Centromere plasmids (Ycp))이다. CMV 프로모터-기반 벡터는 (예를 들면 시그마-알드리치로부터 구할 수 있는) 일시적인 또는 안정적인 발현, 세포질적 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT의 다양한 결합의 N-말단 또는 C-말단 태깅을 제공한다. 융합 단백질은 재조합 단백질의 감지, 정화 및 분석을 가능하게 한다. 이중-태깅된 (dual-tagged) 융합은 감지의 유통성을 제공한다.
- [0145] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 COS 세포에서 1mg/L에 다르는 높은 수준의 지속된 단백질 발현 레벨을 성취한다. 좀 덜 강력한 세포주에서는 단백질 레벨이 보통 약 0.1mg/L정도 이다. SV40 복제 기점 (replication origin)이 있는 경우 SV40 복제를 허락하는 COS 세포에서 높은 레벨의 DNA 복제가 나타난다. CMV 벡터는, 예를 들어, 박테리아 세포에서 복제의 기점인 pMB1 (pBR322의 유도체)을 포함할 수 있고, 박테리아 선택에 사용되는 암피실린 저항 b-락타마아제 유전자를 가지고 있을 수도 있으며, hGH 폴리 A 및 f1 기점을 가지고 있을 수도 있다. 프리프로트립신 리더 (preprotrypsin leader (PPT)) 서열을 가지고 있는 벡터는 항-FLAG 항원, 수지, 및 배양판을 이용하여 FLAG 융합 단백질의 분비를 배지로 방향 잡아 순화에 사용할 수 있다. 여러 가지의 다른 숙주 세포와 사용될 수 있는 다른 벡터와 발현 체계는 잘 알려져 있다.
- [0146] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 형질전환된 숙주 세포와도 관련이 있다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 박테리아 세포는 원핵 세포 중의 바람직한 세포일 수 있고, 대부분 이. 콜라이가 사용된다. 예로서는, 베쎄스다 리서치 레이보레이토리스 인코포레이티드 (Bethesda Research Laboratories Inc., 미국 메릴랜드주 베쎄스다 소재)에서 생산하는 이. 콜라이 균주 DH5, 및 ATCC에서 생산하는 RR1 (ATCC 기탁번호 31343)을 들 수 있다. 바람직한 진핵 숙주 세포로는 효소, 곤충 및 포유류 세포들을 들 수 있고, 포유류 중에서는 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아 세포 및 대장 세포주 등의 척추동물 세포가 바람직하다. 효소 숙주 세포는 스트라타진 클로닝 시스템스에서 생산하는 YPH499, YPH500 및 YPH501가 있다. 바람직한 포유류 숙주 세포로는 ATCC에서 생산하고 CCL61로 사용가능한 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, CRL 1658로 사용가능한 ATCC에서 생산을 하는 NIH 스위스 마우스 배아 세포 NIH/3T3, 인간 태아 신장 세포인 CRL 1650과 293으로 사용가능한 ATCC에서 생산하는 원숭이 신장으로부터 유래된 COS-1 세포가 있다. 바람직한 곤충 세포로는 바클로 바이러스 발현 벡터로 형질감염될 수 있는 Sf9가 있다. 사용 가능한 발현을 위한 적당한 숙주 세포에 대한 개요는 예를 들면 하기 문헌 또는 당업자에게 알려진 문헌에서 얻을 수 있다: 문헌 (Paulina Balbas and Argelia

Lorenz "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9).

- [0147] 본 발명에서 DNA 구성을 이용한 적당한 세포 숙주의 형질전환은 보통 벡터의 종류에 따른 잘 알려진 기술로 이루어진다. 원핵 세포의 형질전환에 관해서는, 문헌 (Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, and Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)을 참조한다. 효소 세포의 형질전환에 관한 내용은 문헌 (Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY.)을 참조하고, 문헌 (The method of Beggs (1978) Nature 275, 104-109)도 유용하다. 척추동물 세포에 관해서, 이런 세포들을 형질감염시킬 때 유용하게 사용되는 시약은, 예를 들어 인산칼슘, DEAE-헥스트란 또는 리포좀 배합 등을 스트라타진 클로닝 시스템 또는 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드 (Life Technologies Inc.; 미국 20877 메릴랜드주 가이씨스버그 소재)로부터 입수 가능하다. 전기천공법도 역시 세포를 형질전환시키고/시키거나 형질감염시킬 때에 유용하며 이는 효소 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 및 척추동물 세포들을 형질전환하는 데에 잘 알려져 있다.
- [0148] 성공적으로 형질전환된 세포들은, 즉 본 발명의 DNA 구성을 가지고 있는 세포, 잘 알려진 PCR과 같은 기술을 이용해 식별될 수 있다. 다른 방법으로는, 항체를 이용하여 상청액 (supernatant)에 존재하는 단백질을 감지할 수도 있다.
- [0149] 본 발명의 특정한 숙주 세포(박테리아, 효소 및 곤충 세포)는 본 발명의 웨티드 준비에 유용한 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포들도 특정한 치료 방법에서 중요한 역할을 할 수도 있다. 예를 들면, 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포는 적당한 MHC 분자에 웨티드가 적재되게 하여 본 발명의 웨티드를 발현하는 데에 유용할 수 있다. 따라서 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0150] 바람직한 약제에서는 숙주 세포는 항원 제시 세포이고, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 재조합 융합 단백질로 적재되어 있는 전립선 산성 포스파타제 (PAP)를 포함한 APC는 현재 전립선 암 치료를 위한 연구에서 실험되고 있는 중이다 (Sipuleucel-T) (Small EJ et al 2006; Rini et al 2006).
- [0151] 더 나아가 본 발명은 웨티드나 거의 변이체들을 생성하는 숙주 세포 배양 방법 및 웨티드를 숙주 세포 또는 배지에서 단리하는 방법을 포함한 방법을 제공한다.
- [0152] 또 다른 제형에서는 본 발명의 웨티드, 핵산 또는 발현 벡터가 약제로서 사용된다. 예를 들면, 웨티드 또는 그의 변이체는 정맥 주사(i.v.), 피하 주사(s.c.), 피내 주사(i.d.), 복막내 주사(i.p.), 근육내(i.m.) 주사 등에 사용될 수 있다. 웨티드 주입의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m., 및 i.v이다. DNA 주입의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v이다. 웨티드 또는 DNA의 복용량은 50  $\mu$ g에서 5 mg 사이이며, 바람직하게는 125  $\mu$ g에서 500  $\mu$ g 사이이며 이는 개별 웨티드 또는 DNA에 의해 결정된다. 이러한 범위의 복용량은 성공적으로 이전 실험에서 사용된 바 있다 (Brunsvig et al 2006; Staehler et al 2007).
- [0153] 본 발명의 또 하나의 측면은 활성화된 T 세포를 생성하는 시험관내 방법을 포함하며, 이 방법은 T 세포를 항원 특정 방법으로 활성화시키기에 충분한 시간에 걸쳐 항원으로 적재되어 있는 적당한 항원 제시 세포 표면에 발현되어 있는 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자와 시험관내 T 세포를 접촉하는 것을 포함한다. 여기에서 항원이란 본 발명에 따르면 웨티드를 말한다. 바람직하게는 충분한 양의 항원이 항원 제시 세포에 사용된다.
- [0154] MHC 클래스 II 에피토프가 항원으로 사용되는 경우에는 T 세포는 CD4 양성 헬퍼 세포이고, 바람직하게는 T<sub>H1</sub>-타입이다. MHC 클래스 II 분자는 적당한 어떤 세포의 표면에서도 발현될 수 있다. 바람직하게는 세포는 자연적으로 MHC 클래스 II 분자를 발현하지 않는다 (이 세포는 미리 형질감염되어 이런 분자를 발현하도록 만들어진 경우이다). 다른 방법으로는, 만약 세포가 자연적으로 MHC 클래스 II 분자를 발현하는 경우에는, 이 세포가 항원-프로세싱 또는 항원 제시 경로에서 이가 완전하지 않는 것이 바람직하다. 이렇게 함으로써, T 세포를 활성화하기 전에 모든 MHC 클래스 II 분자가 선택된 웨티드 항원으로 모두 적재되어 있음을 확인할 수 있다.
- [0155] 항원제시 세포(또는 유도 세포)는 전형적으로 MHC 클래스 II 분자를 표면에 가지고 있고 바람직하게는 혼자서는 MHC 클래스 II를 선택한 항원으로 적재할 수 없다. MHC 클래스 II 분자는 선택된 항원으로 쉽게 시험관내에서 적재될 수 있다.
- [0156] 바람직하게는 포유류 세포는 TAP 웨티드 운송기의 기능이 없거나 또는 낮은 레벨로 존재한다. TAP 웨티드 운송기의 기능이 없는 적당한 세포는 T2, RMA-S 및 초파리 세포를 포함한다. TAP는 항원 프로세싱과 관련된 수송자의 약어이다.

- [0157] 인간 웨პ티드 적재 결합 세포주 T2는 ATCC로부터 구입가능하고 카달로그 번호는 CRL 1992이다. ATCC의 카달로그 번호 CRL 19863에서 초파리 세포주 슈네이더(Schneider) 세포주 2가 입수가능하고 쥐 RMA-S 세포주는 문현(Karre et al 1985)에 기재되어 있다.
- [0158] 편리하게, 형질감염 전의 숙주 세포는 MHC 클래스 I 분자를 발현하지 않는다. 유도 세포는 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3와 같은 T 세포에 대한 공동 자극을 제공하는 데에 중요한 분자를 발현한다. 많은 MHC 클래스 II 분자와 공동 자극원 분자의 핵산 서열은 GenBank 및 EMBL 데이터베이스에서 누구에게나 공개된다.
- [0159] 비슷하게, 항원으로 사용되는 MHC 클래스 I 에피토프의 경우에는 T 세포는 CD8 양성인 CTL이다.
- [0160] 만약 항원-체시 세포가 이러한 에피토프를 발현하도록 형질감염되었다면 바람직하게는 세포는 서열번호 1 내지 11의 어느 한 아미노산 서열을 포함하거나 상기 아미노산 서열로부터 유도된 서열을 포함하는 웨პ티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 가지고 있다.
- [0161] 여러 가지의 다른 방법이 CTL을 시험관내에서 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 문현 (Peoples et al. (1995)) 및 문현 (Kawakami et al. (1992))에 기재되어 있듯이 자가조직 종양-침투 램프구를 이용하여 CTL을 생성한다. 문현 (Plebanski et al. (1995))에서는 자가 말초 혈액 램프구 (PLB)를 이용하여 CTL을 준비한다. 문현 (Jochmus et al. (1997))에서는 자가 CTL을 생성하기 위해 수지상 세포를 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드를 이용해 펄스를 주어 생성하거나 재조합 바이러스를 이용하여 감염시킨다. 문현 (Hill et al. (1995)) 및 문현 (Jerome et al. (1993))에서는 B 세포를 이용하여 자가 CTL을 생성한다. 추가적으로, 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드와 함께 펄스된 또는 재조합 바이러스에 의해 감염된 대식세포는 자가 CTL을 생성하는 데에 사용될 수 있다. 문현 (S. Walter et al. (2003))에서는 aAPC를 이용하여 시험관내 T 세포의 프라이밍에 대해 기재하고, 이는 선택된 웨პ티드에 대한 T 세포를 생성하는데 적당한 방법이다. 이 연구에서, aAPC는 바이오텐:스트렙타비딘 생화학을 이용하여 미리 만들어진 MHC-웨პ티드 합성체와 폴리스티렌 분자(마이크로비즈)를 커플링함으로써 만들어진다. 이 체계는 aAPC의 MHC의 정확한 밀도를 컨트롤하게 해 준다. 이는 혈액 샘플에서 높은- 또는 낮은-친화력 항원 특정 T 세포 반응을 효율적으로 이끌어 낸다. MHC:웨პ티드 합성체를 제외하고는, aAPC는 표면에 커플링된 항-CD28 항체와 같은 공동 자극 활동을 가진 다른 단백질을 가지고 있어야 한다. 더 나아가 이러한 aAPC-기반 체계는 종종 적당한 용해 요인의 추가를 필요로 한다. 예. 인터루킨-12와 같은 싸이토카인.
- [0162] 다른 개체의 세포도 T 세포를 준비하는데 사용될 수 있으며 이의 방법은 여기에 참조 문현으로 나와 있는 WO 97/26328에 기재되어 있다. 예를 들어, 초파리 세포와 T2 세포 외에도 CHO 세포, 바클로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효소, 백시니아-감염된 표적 세포 등을 포함한 다른 세포들 또한 항원을 제시하는 데 사용될 수 있다. 또한 식물 바이러스 또한 사용할 수 있으며 (예를 들면, 문현 (Porta et al. (1994)) 참조) 이는 카우피모자이크 (cowpea mosaic) 바이러스를 외부 웨პ티드를 제시하는 고수율 체계로 개발하는 것을 기재한다.
- [0163] 본 발명의 웨პ티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에 사용하기에 유용하다. 따라서, 본 발명은 앞에 기재된 발명의 방법에 의해 활성화된 T 세포를 제공한다.
- [0164] 위의 방법에 의해 생성된 활성화된 T 세포는 서열번호 1 내지 11로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리웨პ티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식할 것이다.
- [0165] 바람직하게는 T 세포는 TCR을 통해 HLA/웨პ티드 합성체 (예를 들어 결합)와 상호 작용을 하는 세포를 인식할 것이다. T 세포는 환자가 효과적인 숫자의 활성화된 T 세포를 주입했을 때, 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨პ티드를 비정상적으로 발현하는 표적 세포를 죽이는 데 유용하다. 환자에게 주입된 T 세포는 환자로부터 유도되었을 수 있고, 이는 위에 기재된 바와 같이 활성화될 수 있다 (즉, 이 T 세포는 자가 조직이다). 대신에, 환자가 아닌 다른 개체로부터 유도된 T 세포일 수도 있다. 물론, 그 개체가 건강한 개체인 것이 바람직하다. 여기서 "건강한 개체"란 개체가 보통 좋은 건강 상태를 가지고 있고, 바람직하게는 항체 반응력이 있는 면역 체계를 가지고 있으며, 더 바람직하게는, 그 개체는 쉽게 시험될 수 있거나 감지되는 어떤 질병도 앓고 있지 않다.
- [0166] 생체내에서, 본 발명에서 CD4-양성 T 세포의 표적 세포는 종양의 세포(이는 종종 MHC 클래스 II를 발현한다) 및 /또는 종양(종양 세포)을 둘러 싸고 있는 기조직 세포이다 (이 또한 종종 MHC 클래스 II를 발현한다 (Dengjiel et., 2006)).
- [0167] 본 발명의 T 세포는 치료 구성의 활성화된 재료로서 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 환자에게 위에서 정의된 바와 같이 효과적인 숫자의 활성화된 T 세포를 주입했을 때, 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨პ티드를 비정상적으로 발현하는 표적 세포를 죽이는 방법을 제공한다.

- [0168] 여기서 "비정상적으로 발현되는"이라는 것은 폴리펩티드가 정상 레벨에 비교했을 때 과발현되거나 유전자가 종양이 유도된 조직에서는 침묵적이지만 (silent) 종양에서는 발현되는 것을 말한다. "과잉발현"이라는 것은 폴리펩티드가 정상 조직에서 존재하는 레벨의 적어도 1.2배 이상으로 존재하는 것을 말하고, 더 바람직하게는 적어도 2배, 더 바람직하게는 적어도 5배 또는 10배 이상으로 존재하는 것을 말한다.
- [0169] T 세포는 예를 들면 위에서 기재된 바와 같은 방법으로 얻어 질 수 있다.
- [0170] T 세포의 입양전송이라 불리는 것은 이 분야에서 잘 알려진 프로토콜로써 예를 들어 다음과 같은 문헌에서 찾아 볼 수 있다. 문헌 (Rosenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1988); 문헌 (Dudley et al., 2002); 문헌 (Yee et al., 2002; Dudley et al., 2005); 문헌 (Gattinoni et al., 2006); 및 문헌 (Morgan et al., 2006)에서 검토되었다.
- [0171] 본 발명의 어떤 문자(즉, 웨პ티드, 핵산, 발현 벡터, 세포, 활성화된 CTL, T-세포 수용체 또는 이를 코딩하는 핵산)는 병을 고치는 데에 있어서 면역 반응을 피할 수 있는 성질을 가진 세포에 포함되어 있는 것은 중요하다. 따라서 본 발명에 포함되어 있는 어떤 문자든지 약제로서 사용되거나 약제를 만드는 데에 사용될 수 있다. 이 문자는 홀로 사용될 수도 있고, 어떤 알려진 문자와 함께 결합하여 사용될 수도 있다.
- [0172] 바람직하게는, 본 발명의 약제는 백신이다. 이는 환자의 영향을 받은 기관에 직접적으로 주입될 수 있거나 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로서 전체적으로 주입되거나 또는 환자에게서 또는 나중에 환자에게 주입될 인간 세포주에 생체외에서 적용될 수도 있거나 또는 나중에 환자에게 다시 주입될 선택된 면역 세포의 부분 집단에 시험관내에서 사용될 수도 있다. 만약 핵산이 시험관내에서 세포에 주입되면, 인터루킨-2와 같은 면역 유도 싸이토카인과 함께 발현되는 것이 유용할 수도 있다. 웨პ티드는 상당히 순도가 높을 수도 있고, 또는 면역-유도 보조제 (아래 참조)와 합성되어 있거나 또는 면역-유도 싸이트카인과 함께 합성체로 사용되거나, 또는 리포좀과 같은 적당한 전달 체계와 함께 주입될 수도 있다. 웨პ티드는 또한 키홀 림펫 해모시아닌 (KLH) 또는 만난 (mannan) (WO 95/18145 및 Longenecker et al (1993) 참조)과 같은 적당한 담체와 함께 복합 단백질을 이룰 수도 있다. 웨პ티드는 또한 태깅될 수도 있고, 융합 단백질일 수도 있으며, 또는 혼성 분자(hybrid molecule)일 수도 있다. 본 발명의 웨პ티드의 서열은 CD4 또는 CD8을 유도하는 것으로 기대될 수 있다. 하지만, CD8 CTL의 유도는 CD4 T-헬퍼 세포가 있는 상태에서 더 효율적이다. 따라서, CD8 CTL을 유도하는 MHC 클래스 I 에피토프에 있어서는 융합 파트너 또는 혼성 분자의 부분이 적당하게 CD4-양성 T 세포를 유도하는 에피토프를 제공한다. CD4-와 CD8-유도 에피토프는 이 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.
- [0173] 백신의 한 부분은 적어도 하나의 웨პ티드를 포함한다. 이 웨პ티드는 바람직하게는 2개에서 50개이고, 더 바람직하게는 2개에서 25개이며, 더 바람직하게는 2개에서 15개이고 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 웨პ티드이다. 웨პ티드는 하나 또는 그 이상의 특정한 TAA로부터 유도되었고 이는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 문자에 결합을 할 수 있다.
- [0174] 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높을 수 있고, 또는 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 결합일 수 있다. 이런 핵산을 디자인하고 도입하는 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있다. 개요는 문헌 (Pascolo S. 2006), 문헌 (Stan R. 2006) 또는 문헌 (Mahdavi 2006)에 의해 제공된다. 폴리뉴클레오티드 백신은 준비하기가 쉽지만, 이를 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 허피스 바이러스, 아데노 관련 바이러스 또는 한 개 또는 그 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 폴리머를 포함하고 이는 이 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자-총"을 통한 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 웨პ티드 또는 핵산에 의해 코딩된 웨პ티드는 융합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 유도하는 에피토프를 들 수 있다.
- [0175] 발명의 약제는 하나 또는 그 이상의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 면역 반응을 비-특정적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질을 말한다(예: CTL과 항원에 대한 헬퍼 T 세포에 의해서 중재된 면역 반응). 따라서 본 발명에서 이는 중요한 약제 구성이라고 할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 1018 ISS, 알루미늄 염, 앰플리백스(Amplivax), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라제린(flagellin) 또는 플라제린으로부터 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드 (Imiquimod) (ALDARA), 이뮤팩트(ImuFact) IMP321, 인터페론-알파 또는 -베타, 또는 이들의 폐질화된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, 주브이뮨(JuvImmune), 리포백 (LipoVac), MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 (Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유증수

및 수중유 에멀전, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, 페프텔 (PepTel) (등록상표) 백터 시스템, PLG 극미립자, 레시퀴모드 (resiquimod), SRL172, 비로좀 (Virosome) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848,  $\beta$ -글루칸, Pam3Cys, 사포닌으로부터 유도된 아퀼라 (Aquila) QS21 스티뮬론 (stimulon), 마이코 박테리아 추출물과 합성 세균의 세포 벽 모방제, 및 다른 비비 테톡스 (Ribi's Detox), 퀄 (Quil) 또는 서퍼포스 (Surferfoss)와 같은 독점 보조제 등이 있다. 프로인트 보강제 (Freund's adjuvant) 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 몇몇의 면역적 보조제 (예: MF59)는 수지상 세포에 특정하고 및 그들의 준비 방법은 이전에 기재된 바 있다 (Dupuis M et al 1998; Allison 1998). 또한, 싸이토카인도 사용될 수 있다. 몇몇의 싸이토카인은 수지상 세포의 램포이드 조직으로의 이동과 직접적으로 연관된 바 있으며 (예: TNF- $\alpha$ ), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T-림프구에 대한 항원 제시 세포로의 성장을 가속시키고 (예: GM-CSF, IL-1 및 IL-4) (U.S. Pat. No. 5,849,589, 본 발명의 참조 문헌으로 들어가 있음) 면역보조제의 역할을 한다 (예: IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) (Gabrilovich et al 1996).

[0176] CpG 면역유도 올리고뉴클레오티드는 백신 세팅에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 논설에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 TLR-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9, 을 통해 천성 (비-적응) 면역 체계를 활성화시킨다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아 있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원-특성 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포의 성장 및 차별화를 향상시키고 이는  $T_{H1}$  세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T-림프구 (CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9의 유도에 의해 일어난 TH1 바이어스는 보통  $T_{H2}$  바이어스를 일으키는 백반 또는 비완성된 프로인트 보강제 (IFA) 백신 보조제가 존재할 때도 유지된다. CpG 올리고뉴클리오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 주입될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 약제로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 전체 복용량이 일으키는 항체 반응 정도를 일으키기 위한 항원의 복용량을 약 두 배 정도 줄일 수 있도록 한다 (Krieg et al 2006). US Pat. No. 6,406,705 B1는 CpG 올리고뉴클레오티드, 비-핵산 보조제 및 항원-특정 면역 반응을 일으키는 항원의 결합 사용에 대해 기재한다. CpG TLR9 길항제는 몰로겐 (Mologen, 독일 베를린 소재)에 의해 만들어진 dSLIM (이중 줄기 루프 면역조절제)이며 이는 본 발명의 약제 구성의 바람직하다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용가능하다.

[0177] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 화학적으로 변경된 CpGs (예: CpR, Idera), 폴리(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 앰플리겐(AmpliGen), 면역활성적인 작은 문자 및 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 사이클로포스포아마이드, 서니티니브(sunitinib), 베바시주마브(bevacizumab), 셀레브렉스 (celebrex), NCX-4016, 실데나필(sildenafil), 타달라필(tadalafil), 바르데나필(vardenafil), 소라페니브 (sorafenib), 테모졸로마이드, 템시롤리마스(temsirolimus), XL-999, CP-547632, 파조파니브(pazopanib), VEGF 트랩(Trap), ZD2171, AZD2171, 항-CTLA4 및 SC58175와 같은 항원을 들 수 있으며 이는 치료적으로 또는 보조제의 역할을 할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는 특별히 다른 실험을 할 필요 없이 당업자에 의해서 쉽게 결정될 수 있다. 바람직한 보조제는 dSLIM, 인터페론- $\alpha$ , 인터페론- $\beta$ , CpG7909, IC31, ALDARA (이미퀴모드), 페비테르(PeviTer), RNA, 타달라필, 테모졸로마이드, 및 주브이뮨이 있다.

[0178] 본 발명은 암, 특히 신경암, 특히 뇌암을 치료하는 데에 유용한 약제를 제공한다. 암은 비전이성 또는 전이성일 수 있고, 특히 성상세포종, 텔모양 성상세포종, 배아형성장애 신경상피 종양, 회소돌기아교세포종, 뇌실막세포종, 다형성아교모세포종, 혼합된 신경아교종, 회소돌기성상세포종, 속질모세포종, 망막모세포종, 신경모세포종, 배아종, 기형종, 신경절교종, 신경절세포종, 중추 신경절세포종, 원시 신경 외배엽 종양 (PNET, 예를 들어, 속질모세포종, 속질상피종, 신경모세포종, 망막모세포종, 뇌실막모세포종), 송과체실질 종양(예를 들어, 송과체종, 송과체모세포종), 뇌실막세포 종양, 맥락막망 종양, 기원이 불확실한 신경상피 종양(예를 들어, 대뇌신경교종증, 성상세포종) 또는 신경아교모세포종, 폐암 또는 선편평상피 암종일 수도 있다.

[0179] 본 발명의 펩티드는 신경아교세포종에서 단리되었고, 서열번호 2의 경우에는 선편평세포암종에서 단리되었기 때문에, 본 발명의 약제는 바람직하게는 신경아교종 또는 선편평상피 암종을 치료하는 데 사용된다.

[0180] 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)를 포함한다: (a) 위에 기재된 바와 같은 약제 구성품을 액체상태 또는 냉동 보관된 형태로 포함하고 있는 컨테이너 (b) 선택사항으로 냉동 보관된 약제를 위한 희석액 또는 재구성 용액을 포함하는 두 번째의 컨테이너 및 (c) 선택사항으로, (i) 용액의 사용 또는 (ii) 냉동보관된 형태의 약제의 재구

성 및/또는 사용에 대한 지침도. 이 키트는 또한 (iii) 베퍼, (iv) 희석액, (v) 필터, (vi) 바늘, 또는 (v) 주사기 중의 하나 또는 그 이상을 포함할 수도 있다. 컨테이너는 바람직하게는 병, 물약병, 주사기 또는 실험관이고 및 다용도 컨테이너일 수도 있다. 약제 구성품은 바람직하게는 동결건조되어 있다.

[0181] 본 발명에 사용되는 키트는 동결건조되어 있는 약제를 적당한 컨테이너와 이들의 재구성 및/또는 사용에 관한 지침서를 함께 포함한다. 적당한 컨테이너는 예를 들면, 병, 물약병 (예: 듀얼 챔버 물약병), 주사기 (듀얼 챔버 주사기 등) 및 실험관을 포함한다. 컨테이너는 유리 또는 플라스틱 등의 여러 가지의 자재로 만들어 질 수 있다. 바람직하게는 키트 및/또는 컨테이너는 재구성 및/또는 사용에 대한 사용법을 포함한 지침서를 포함하고 있다. 예를 들면, 라벨에는 동결건조되어 있는 약제를 위에 기재된 바와 같이 웨티드의 농도를 재구성하는 방법이 기재되어 있을 수도 있다. 라벨은 또한 약제가 피하주입이 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.

[0182] 약제를 포함한 컨테이너는 재구성된 약제의 반복된 주입을 가능하게 하는 다용도 물약병일 수 있다 (예: 약 2 내지 6회 주입). 키트는 또한 적당한 희석제(예: 중탄산 솔루션)를 포함하는 두 번째의 컨테이너를 포함할 수도 있다.

[0183] 희석제와 동결 건조된 약제를 섞을 때는, 재구성된 약제의 최종 웨티드 농도가 바람직하게는 적어도 0.15 mg/mL/웨티드 ( $=75\mu\text{g}$ )이고 바람직하게는 3 mg/mL/웨티드 ( $=1500\mu\text{g}$ )을 넘지 않아야 한다. 키트는 다른 베퍼, 희석액, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입 및 사용 설명서 등의 사용자의 입장에서 필요한 것을 더 추가로 포함할 수도 있다.

[0184] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약제 구성품을 포함하는 하나의 컨테이너를 다른 제품과 함께 또는 홀로 포함하거나 (예: 다른 합성물 또는 약제 구성품) 각각의 구성품을 각자 다른 컨테이너에 포함할 수 있다.

[0185] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 다음과 같은 두 번째의 합성물 또는 그들의 구성품과 함께 주입될 수 있는 약제 구성품을 포함한다. 보조제 (예: GM-CSF), 화학요법제, 자연 생산품, 호르몬 또는 길항제, 항-혈관신생 물질 또는 억제제, 괴사유도 물질 또는 퀄레이터. 키트의 구성품은 미리 혼합되어 있을 수도 있고 또는 각각의 구성품이 각각 따로 컨테이너에 담겨 있을 수도 있다. 키트의 구성품은 하나 또는 그 이상의 액체 용액에 제공될 수도 있고, 바람직하게는 수성 솔루션, 더욱 바람직하게는 무균 수성 솔루션에 제공된다. 키트의 구성품은 적당한 용해제를 첨가함으로써 액체로 바뀔 수 있는 고체로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 이는 다른 컨테이너에 담겨 제공된다.

[0186] 치료 키트의 컨테이너는 물약병, 실험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체나 액체를 담을 수 있는 다른 어떤 컨테이너 일 수도 있다. 보통, 하나 이상의 구성물이 있을 경우, 키트는 두 번째의 물약병 또는 다른 컨테이너를 포함하고, 이는 각각의 복용을 가능하게 한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 액체를 포함하고 있는 컨테이너를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 치료 키트는 현재 키트의 구성품인 발명의 물질을 주입할 수 있는 기구를 포함한다 (예: 하나 또는 그 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등).

[0187] 현재 약제 구성은 구강, 비강, 안약 형태의, 피하의, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등 어떠한 주입 형태로든 웨티드 주입에 적당한 약제이다. 바람직한 주입 경로는 피하 경로이고 가장 바람직한 주입 경로는 피내 경로이다. 관주 펌프에 의해서도 주입이 가능하다.

[0188] 본 발명은 이제 다음의 예를 통해 하지만 다음의 예에 국한되지 않게 기재될 것이다. 본 발명을 위해, 모든 참조 문헌은 완전하게 참조 문헌에 포함되어 있다.

### 발명의 효과

[0189] 본 발명의 웨티드, 핵산 및 세포는 항암 면역 반응을 유도하여 암의 치료 또는 예방, 특히 신경 및 뇌 종양의 치료 및 예방에 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0190] [도 1]

도 1a 및 1b는 교모 세포종 표본 GB1006에서 종양 관련 웨티드 (TUMAPs) TP-001을 및 교모 세포종 표본 GB6003에서 PTP-002를 식별하는 ESI-액체 크로마토그래피 질량 스펙트럼을 보여준다.

[도 2]

도 2는 표 1에 나와 있는 교모 세포종 관련 웨티드 유전자 PTPRZ1의 mRNA 발현 프로필을 나타낸 것이다. 이 유

전자의 발현은 정상 조직에서는 완전히 없거나 또는 아주 낮은 데에 비해 교모 세포종 표본에서는 강하게 증가되어 나타난다 (GB1006T에서 GB1011T; NCH359T와 NCH361T).

#### [도 3]

도 3은 유식세포분석에 의해 결정된 PTP-002에 의한 시험관내 자극 후의 건강한 HLA-A\*0201 기증의 PTP-002-특정 CD8 양성 T 세포 대표적인 예를 보여준다. CD8 양성 T 세포는 건강한 기증 인간 PBMC에서 단리되고 시험관내에서 문자적으로 정의된 공동-자극 문자와 A\*0201/PTP-002 (좌측 도면) 또는 비관련 A\*0201 웨티드 (우측 도면)이 적재되어 있는 "인공 항원 제시 세포"(aAPC)를 사용하여 프라임된다 (Walter et al., 2003). 3번의 자극 싸이클을 거친 후, 웨티드-반응 세포의 탐지는 PTP-002-플러스 비관련 웨티드 테트라머로 염색을 하여 이루어진다. 세포는 CD8 양성 럼프구 집단에 게이트되었고 (gated) 비율은 이 집단 중에서 테트라머-양성 세포의 빈도를 나타낸다.

#### [도 4]

도 4는 본 발명의 웨티드와 HLA-A\*2010의 친화력을 나타낸다. HLA 클래스 I 웨티드와 바이러스 마커 웨티드 HBV-001의 해리 상수 ( $K_D$ )는 ELISA 기반 분석에 의해 측정된다 (실시예 4 참조).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0191] [실시예]
- [0192] 실시예 1
- [0193] 세포 표면에 제시된 TUMAP의 식별
- [0194] 조직 샘플
- [0195] 환자의 종양 및 건강한 조직은 기관 (Hopital Cantonal Universitaire de Geneve (Medical Oncology Laboratory of Tumor Immunology)) 및 (Neurochirurgische Universitäts-Klinik Heidelberg (Molekularbiologisches Labor))에 의해 제공되었다. 모든 환자의 성분의 동의서는 수술 전에 얻어졌다. 조직은 수술 직후 액체 질소에 의해 냉동되고 이는 영하 80°C에서 TUMAP가 단리될 때까지 저장되었다.
- [0196] HLA 웨티드의 조직 샘플에서부터의 단리
- [0197] 충격 냉동 조직 샘플에서 HLA 웨티드 풀(pool)이 고체 조직에서 면역 침전법을 통해 약간 변경된 프로토콜에 의해 HLA-A\*02-특정 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특정 항체 W6/32, CNBr-활성화된 세파로스, 산 치료 및 한의 여파기 사용을 통해 얻어졌다 (Falk, K. et al 1991; Seeger, F. H. et al T 1999).
- [0198] ESI-액체 크로마토그래피 질량 스펙트로메트리(ESI-LCMS)에 의한 TUMAP의 감지
- [0199] 방법 1
  - [0200] 얻어진 HLA 웨티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토 그래피를 이용하여 분리되었고(CapLC, Waters) 녹여서 분리하는 웨티드는 ESI 소스를 갖춘 하이브리드 사중극자 오르쏘고날 촉진 비행시간 텐덤 질량 분광계 (hybrid quadrupole orthogonal acceleration time of flight tandem mass spectrometer) (Q-TOF 윌티마 워터스)에 의해 분석되었다. 웨티드 풀은 C18 프리-컬럼에 농도와 탈염을 위해 적재되었다. 적재 후에, 프리-컬럼은 5  $\mu$ m C18 역상 물질 (다이오넥스(Dionex))로 충전되어 있는 훈연된 실리카 미세모세관 컬럼 (75  $\mu$ m i.d. x 250 mm)에 의한 분리를 위해 대기한다. 용매 A는 4 mM 암모늄 아세테이트 / 물이었다. 용매 B는 80% 아세토니트릴 / 물의 2mM 암모늄 아세테이트이었다. 두 개 모두의 용매는 포름산을 사용하여 pH 3.0에 맞추어 졌다. 15% 내지 60%의 이원 구배가 90분 동안 실행되었고, 스플릿-시스템에 의해 유량 5  $\mu$ l/분이 200 nL/분으로 감소되었다. 금이 입혀진 유리 모세관 (피코팁 (PicoTip)(뉴 오브젝트))가 미세-ESI 소스로의 도입에 사용되었다. TOF 분석기의 통합 시간은 1.9s였고, 여기서 스캔 간 지연은 0.1s였다. 이어서, 웨티드 서열은 충돌유도부식 (CID) 질량 스펙트로메트리(ESI-CMS/MS)에 의해 공개되었다. 식별된 TUMAP 서열은 자연적인 TUMAP 조각 패턴을 인공 서열-동일 기준 웨티드의 조각패턴과 비교함으로써 보증되었다.
- [0201] 방법 2
- [0202] 얻어진 HLA 웨티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토 그래피를 이용하여 분리되었고 (액퀴티 UPLC 시스템(분리되었고 (액퀴티 UPLC 시스템 (Acquity UPLC system) (워터스)), 녹여서 분리하는 웨티드는 ESI 소스를

갖춘 LTQ-오비트랩 하이브리드 질량 분광계 (Orbitrap hybrid mass spectrometer) (씨모일렉트론)에 의해 분석되었다. 펩티드 풀은  $1.7 \mu\text{m}$  C18 역상 물질 (워터스)로 충전되어 있는 훈연된 실리카 미세모세관 컬럼 ( $75 \mu\text{m}$  i.d. x  $250 \text{ mm}$ )에 바로 적재된다. 이어서, 펩티드는 두-단계 180분-10%에서 33%까지의 이원 구배를 이용하여 분리되고, 여기서 유량은 분당  $300\text{mL}$ 이다. 구배는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세토니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어져 있다. 금이 입혀진 유리 모세관 (피코팁 (PicoTip)(뉴 오브젝트))가 미세-ESI 소스로의 도입에 사용되었다. LTQ-Orbitrap 질량 스펙트로미터가 TOP5 전략을 이용한 데이터-의존 모드에서 작동되었다. 간략하게, 스캔 싸이클은 오비트랩 (orbitrap)의 높은 질량 정확도 ( $R = 30\,000$ )의 전스캔으로 시작되고, 이후 5개의 가장 많은 이전에 선택한 이온의 동적 배제에 의한 전조 이온에 대한 오비트랩 ( $R = 7500$ )의 MS/MS 스캔이 이어진다. 탄덤 질량 스펙트럼은 SEQUEST과 추가적인 수동 컨트롤에 의해 해석된다. 식별된 TUMAP 서열은 자연적인 TUMAP 조각 패턴을 인공 서열-동일 기준 펩티드의 조각패턴과 비교함으로써 보증되었다. 도 1a 및 1b는 MHC 클래스 1과 관련된 TUMAP의 암 조직에서 얻어진 스펙트럼의 예를 보여준다.

[0203] 실시예 2

[0204] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 프로필

[0205] 암세포의 표면에 MHC 분자에 의해 제시되는 모든 펩티드가 면역 치료에 적당한 것은 아니다. 이는 이 펩티드의 거의 대 부분이 많은 세포 타입에서 발현되는 정상 세포 단백질로부터 유도된 것이기 때문이다. 아주 적은 몇 개의 펩티드가 암과 관련이 있고, 높은 특수성을 가지고 자기가 유도된 암의 T 세포를 유도할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이런 펩티드를 식별하고 백신에 의해서 발생하는 자가면역의 위험을 최소화하기 위해 발명자들은 정상 조직과 비교했을 때 종양 세포에서 현저히 과발현되는 단백질에 초점을 맞추었다.

[0206] 가장 이상적인 펩티드는 암에서만 발견되는 단백질이고 다른 어떠한 조직에서도 찾을 수 없는 것이다. 이러한 발현 프로필과 비슷한 것을 가지고 있는 유전자에 의해서 생성되는 펩티드를 식별하기 위하여 식별된 펩티드는 단백질과 유전자에 할당되었고, 이 유전자들의 발현 프로필이 생성되었다.

[0207] RNA 소스와 준비

[0208] 수술로 제거된 조직 표본은 각각의 환자로부터 성문의 동의서가 주어진 후 두 개의 임상 실험 센터에서 제공되었다 (실시예 1 참조). 암 조직 표본은 액체 질소에 의해 수술 직후 스냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화되었다. 총 RNA는 트라이졸 (TRIzol) (인비트로겐 (Invitrogen), 독일 칼스루헤 소재)을 이용하여 샘플로부터 준비되었고 이는 RNeasy (퀴아젠 (QIAGEN), 독일 헐렌 소재)에 의해 청소되었다 이 두 개의 모든 방법은 제조 업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0209] 건강한 인간 조직의 총 RNA는 상업적으로 얻어졌다 (아비온 (Ambion), 영국 현팅돈 소재; 클론텍 (Clontech), 독일 하에델베르그 소재; 스트라타진 (Stratagene), 네덜란드 암스테르담 소재; 바이오체인 (BioChain), 미국 캘리포니아주 헤이워드 소재). 여러 개체로부터 수득된 RNA (2 내지 123명의 개체)는 각각의 개체에게 균등 가중치를 두어 섞어졌다. 백혈구는 4명의 자원 봉사자의 혈액 샘플에서 단리되었다.

[0210] RNA 샘플의 양 및 질은 아질런트 (Agilent) 2100 바이오어날라이저 (Bioanalyzer) (아질런트, 독일 발트브론 소재)에 의해 RNA 6000 피코 랩칩 키트 (Pico LabChip Kit) (아질런트)를 사용하여 분석되었다.

[0211] 마이크로어레이 실험

[0212] 모든 암과 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 아피메트릭스 (Affymetrix) 인간 게놈 (HG) U133A 또는 HG-U133 플러스 2.0 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 (아피메트릭스, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재))에 의해 실행되었다. 모든 단계는 아피메트릭스의 사용 설명서에 따라 실행되었다 ([http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression\\_manual.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx)). 짧게, 두 줄기 cDNA는 수퍼스크립트 (SuperScript) RTII (인비트로겐) 및 올리고-dT-T7 프라이머 (MWG 바이오텍, 독일 에버스베르그 소재)를 사용하여 사용 설명서에 따라  $58 \mu\text{g}$ 의 총 RNA로부터 합성되었다. 시험관내 전사는 U133A 어레이를 위한 바이오어레이 고수율 RNA 전사체 표지 키트 (ENZO 다이아그노스틱스 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 파밍데일 소재) 또는 U133 플러스 2.0 어레이를 위한 진침 (GeneChip) IVT 표지 키트 (아피메트릭스)를 사용하여 실행되었다. 이는 cRNA 조각내기, 재조합 및 스트렙타비딘-파이코에리쓰린 및 바이오티닐호된 항-스트렙타비딘 항체로의 염색으로 이루어졌다. 이미지는 아질런트 2500A 진어레이 스캐너 (U133A) 또는 아피메트릭스 진침 스캐너 3000 (U133 플러스 2.0)를 이용하여 스캔되었고, 테이터는 기본 세팅을 이용하여 GCOS 소프트웨어 (아피메트릭스)를 통해 분석되었다. 정상화를 위해, 100 아피메트릭스에 의해 제공된 가사 유전자가 사용되었다 ([http://www.affymetrix.com/support/technical/mask\\_files.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx)). 상대적인 발현 가치는 시그널 로그 비율을

통해 계산되었고 정상 샘플의 가치는 임의로 1.0으로 정해졌다.

- [0213] 본 발명의 모든 펩티드의 소스 유전자의 발현 프로필은 교아세포종에서 높은 발현을 나타내고 정상적인 조직에서는 발현되지 않거나 아주 낮은 레벨로 발현된다 (도 2).
- [0214] 실시예 3
- [0215] **MHC 클래스 I 제시된 펩티드의 시험관내 면역원성**
- [0216] **CD8 양성 T 세포의 시험관내 프라이밍**
- [0217] 펩티드-MHC 합성체 (pMHC)와 항-CD28항체로 적재된 인공 항원 제시 세포에 의한 시험관내 자극을 실행하기 위해 발명자들은 우선 HLA-A\*02+ 베피 코트에서 PBMCs(말단 혈액 단핵 세포)를 기본 질량 구배 분리 배지 (PAA, 독일 콜베 소재)을 이용하여 단리했다. 베피 코트는 기관 (Katharinenhospital Stuttgart)에서 얻어졌다. 단리된 PBMCs는 밤새도록 T-세포 배지(TCM)에서 RPMI-글루타맥스 (Glutamax) (인비트로겐, 독일 칼스루헤 소재)를 포함하고 열 비활성화된 인간 AB 혈청 (PAA, 독일 콜베 소재), 100 U/ml 페니실린 / 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신 (캠브렉스 (Cambrex), 벨기에 베르비에르스 소재), 1 mM 피루브산 나트륨 (CC Pro, 독일 뉴네우스타츠 소재) 및 20  $\mu$ g/ml 젠타마이신(캠브렉스)으로 보충되어 있는 인간 시험관내 프라이밍을 위해 배양된다.
- [0218] CD8 양성 림프구는 CD8 양성 MACS 양성 선택 키트 (밀테니, 독일 베르기슈 글라드바흐 소재)를 이용하여 제조 회사의 사용 설명서에 따라 단리되었다. 얻어진 CD8 양성 T 세포는 2.5 ng/ml IL-7 (프로모셀, 독일 하이델베르그 소재) 및 10 U/ml IL-2 (키론 (Chiron), 독일 뮌헨 소재)에 의해 보충된 TCM에 의해서 사용될 때까지 밤새도록 배양된다. pMHC/항-CD28가 입혀진 비즈의 생성, T-세포 자극 및 해독은 전에 기재된 것처럼 작은 변경을 거쳐 실행되었다 (Walter et al., 2003). 간단하게, 바이오틴화된 막관통 도메인이 없는 재조합 HLA-A\*0201 분자와 중쇄의 카복시 말단이 바이오틴화되는 분자는 문헌(Altman et al., 1996)에 의해 설명된 바와 같이 생성되었다. 순화된 동시-자극 쥐 IgG2a 항 인간 CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987)은 제조회사가 제안하는 데로 세포-N-하이드록시석신이미도바이오틴을 사용하여 화학적으로 바이오틴화되었다. 사용된 비즈는 5.60  $\mu$ m 크기의 스트렙타비딘 코팅된 폴리스티렌 입자이다 (방스 레이보레이토리스 (Bangs Laboratories), 미국 일리노이스 소재). 양성 및 음성 대조군으로 사용되는 pMHC는 각각 A\*0201/MLA-001 (변경된 멜란-A/MART-1에서 나온 펩티드 ELAGIGILTV) 및 A\*0201/DDX5-001 (DDX5에서 나온 YLLPAIVHI)이다.
- [0219] 800,000 비즈/200  $\mu$ l가 96 우물 접시에서 600 ng 바이오틴 항-CD28 플러스 200 ng 관련있는 바이오틴-pMHC (높은 밀도의 비즈) 또는 2 ng 관련있는 플러스 200 ng 관련없는 (pMHC 라이브러리) MHC (낮은 밀도의 비즈)가 있는 상태에서 코팅되었다. 96-우물 접시에서 자극은 1x106 CD8+ T 세포를 2x105 씩 코팅된 비즈와 함께 5 ng/ml IL-12 (프로모셀)로 보충된 200  $\mu$ l TCM에 3-4일 동안 37°C에서 같이 배양함으로써 시작되었다. 배지의 반이 80 U/ml IL-2로 보충되어 있는 새로운 TCM으로 교체되고 다시 배양은 3-4일 동안 37°C에서 계속된다. 이 자극 싸이클은 총 3번에 거쳐 이루어진다. 마침내, 테트라머 분석이 형광 MHC 테트라머((Altman et al., 1996)에 의해서 기재된 바대로 준비가 됨)와 항체 CD8-FITC 클론 SK1 (BD, 독일 하이델베르그 소재)과 함께 FACSCalibur 또는 LSR II 유세포분류기 (BD)에서 실행된다. 펩티드 특정 세포는 총 CD8 양성 T 세포에 대한 백분율로 계산된다. 테트라머 분석에 대한 평가는 FCS 익스프레스 소프트웨어를 사용하여 이루어진다 (드 노보 소프트웨어). 특정의 테트라머+ CD8+ 림프구의 시험관내 프라이밍은 적당한 게이팅 (gating)과 음성 대조군과 자극과의 비교를 통해 감지된다. 어떤 주어진 항원에 대한 면역원성은 시험관내 자극 후 적어도 하나의 평가 가능한 시험관내 자극된 하나의 건강한 도너의 우물이 특정한 CD8+ T-세포주를 포함하고 있는 것으로 나타날 시 감지된다 (즉, 이 우물은 CD8+ T 세포 중의 적어도 1%의 특정한 테트라머+를 포함하고 특정 테트라머+ 세포의 백분율이 적어도 음성 대조군의 자극에 비해 10배 이상이어야 한다).
- [0220] 도 3은 PTP-002와 PTP-001에 특정적인 T-세포주 생성의 대표적인 염색을 보여준다. 이 결과는 아래의 표 3에도 정리되어 있으며, CHI-001의 결과도 함께 정리되어 있다.

## 표 3

본 발명의 웨티드의 시험관내 면역원성

항원	면역원성 감지되었음	양성 도너/ 테스트된 도너	양성 우물/테스트된 우물
PTP-001	결정됨	6 / 6 (100 %)	33 / 96 (34 %)
PTP-002	결정됨	3 / 4 (50%)	9 / 48 (17 %)
PTP-003	결정됨	2 / 4 (50%)	8 / 48 (17%)
PTP-004	결정됨	2 / 4 (50%)	2 / 48 (4%)
PTP-005	결정됨	4 / 4 (100%)	24 / 48 (50%)
CHI-001	결정됨	4 / 4 (100%)	39 / 62 (63%)

[0221]

[0222] 본 발명자들에 의해 실행된 시험관내 면역원성 실험의 결과와 백분율의 양성 시험된 도너와 우물의 결과가 여기에 정리되어 있다. 여기 보여진 결과는 높은 밀도 비즈에 의해 자극된 CD8+ 세포에 의해 얻어졌다. 다른 인간 혈청이 면역원성 결과에 많은 영향을 줄 수 있기 때문에, 같은 혈청이 사용되는 실험들의 결과만 같이 평가되었다.

[0223] 실시예 4

## HLA 클래스 I-제한 웨티드와 HLA-A\*0201의 결합

[0225] 이 분석의 목적은 HLA 클래스 I 웨티드 PTP-001, PTP-002, PTP-003, PTP-004 및 PTP-005의 HLA-A\*0201 대립유전자에 의해 코딩된 MHC 분자와의 결합의 친화력에 대해 평가하는 것이다. HLA-A\*0201에 대한 모든 웨티드의 친화력은 잘 알려진 HBV-001의 대조군과 비교되었고, 해리 상수( $K_D$ )가 0.02 내지 1.6nM 사이였다.

## 시험의 원리

[0227] 안정적인 HLA/웨티드 합성체는 세 개의 분자로 이루어져 있다: HLA 중쇄, 베타-2 작은 글로불린(b2m) 및 웨티드 리간드. 변성된 재조합 HLA-A\*0201 중쇄 분자의 활동이 보존하여 "빈 HLA-A\*0201 분자"의 기능적 등가로 만들 수 있다. b2m과 적당한 웨티드를 포함하는 수성 버퍼와 함께 희석되었을 때, 이들 분자는 빠르게 및 효율성 있게 전체 웨티드에 의존하는 방식으로 폴딩된다. 이런 분자의 사용 가능한 정도는 ELISA 기반 시험에 사용되고 이는 웨티드와 HLA 클래스 I 분자 사이의 상호작용과 친화력을 측정하는 데에 사용된다 (Sylvester-Hvid et al., 2002).

[0228] 정화된 재조합 HLA-A\*0201 분자는 b2m과 관련된 웨티드의 등급별 복용량과 함께 배양되었다. 드 노도-폴딩된 HLA/웨티드 합성체의 양은 질량적 ELISA에 의해 결정되었다.  $K_D$  값은 HLA/웨티드 합성체의 검량선용 시약의 희석을 이용하여 결정된 표준 커브를 사용하여 계산되었다.

[0229] 결과는 도 4에 보여진다. 낮은  $K_D$  값은 더 높은 HLA-A\*0201에 대한 더 높은 친화력을 나타낸다. HLA-A\*0201에 대한 모든 웨티드의 친화력은 잘 알려진 HBV-001의 대조군과 비교되었고,  $K_D$ 가 0.02 내지 1.6nM 사이였다.

[0230]

## 인용된 참고문헌 목록

- Allison AC 1998; The mode of action of immunological adjuvants; *Dev Biol Stand.*; 92:3-11
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, Heyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
- Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini JC, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P (2006). Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur. J Immunol.* 36, 1805-1814.
- Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K, Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995). Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 52-54.
- Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, Honegger AM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K, . (1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* 13, 1497-1506.
- Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM (1998). Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice. *Int. Immunol.* 10, 1765-1776.
- Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F.(2004) From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future *Curr Pharm Biotechnol.* Feb; 5(1):29-43
- Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsse S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G (2006); Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; *Cancer Immunol Immunother.*; 55(12):1553-1564
- Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol.* 1, 459-468.
- CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006.  
Ref Type: Internet Communication
- Cheever MA, Chen W, Disis ML, Takahashi M, Peace DJ (1993). T-cell immunity to oncogenic proteins including mutated ras and chimeric bcr-abl. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 690, 101-112.

[0231]

Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A (2006). Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol.* 176, 2730-2738.

Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.

Dazzi C, Cariello A, Giannini M, Del DM, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De GU, Marangolo M (2000). A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.

Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S (2006). Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 12, 4163-4170.

Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 2346-2357.

Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM (1998); Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; *Cell Immunol.*; 186(1):18-27

Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G. & Rammensee,H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296 (1991)

Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG (2001a). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J. Immunol.* 166, 4254-4259.

Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001b). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8809-8814.

Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996 (6):414-418

[0232]

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.

Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393.

Gebbink MF, van E, I, Hateboer G, Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA, Moolenaar WH (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.* 290, 123-130.

Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8862-8867.

Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasmini P, Nagy ZA, Sinigaglia F (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp. Med.* 181, 1847-1855.

Hanada K, Yewdell JW, Yang JC (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.

Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002). A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* 32, 411-414.

Heimberger AB, Hussain SF, Aldape K, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, Sampson JH. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529. 6-20-2006.

Hill et al (1995) *J. Exp. Med.* 181, 2221-2228

Jerome et al (1993) *J. Immunol.* 151, 1654-1662

Jochmus et al (1997) *J. Gen. Virol.* 78, 1689-1695

Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.

Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7000-7004.

Karre and Ljunggren (1985) *J. Exp. Med.* 162, 1745

[0233] Kawakami et al (1992) *J. Immunol.* 148, 638-643

Kennedy RC, Shearer MH, Watts AM, Bright RK (2003). CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 63, 1040-1045.

Kobayashi H, Omiya R, Ruiz M, Huarte E, Sarobe P, Lasarte JJ, Herraiz M, Sangro B, Prieto J, Borras-Cuesta F, Celis E (2002). Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 8, 3219-3225.

Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation 2006, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 5, JUNE, 471-484

Krueger NX, Streuli M, Saito H (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 9, 3241-3252.

Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, Stevanovic S (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* 22, 450-454.

Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, . (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol. Chem.* 268, 10573-10581.

Longenecker et al (1993) *Ann. NY Acad. Sci.* 690,276-291

Lu et al (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433

Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J, Dia EQ, Yoshimoto K, Wang MY, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS (2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem.* 280, 26953-26964.

Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.

Mach B, Steinle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.

A Mahdavi and BJ Monk Recent advances in human papillomavirus vaccines *Curr Oncol Rep* 2006, 6, 465-472.

Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A (1994). Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands. *J Immunol.* 153, 1141-1149.

Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Potti MP (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp. Med* 189, 871-876.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*.

[0234]

Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C, Gorman P, Sasienski P, Adams J, Jones TA, Babbage JW, Vatcheva R, Ichimura K, East P, Poulikas C, Collins VP, Carter NP, Tomlinson IP, Sheer D (2006). Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle* 5, 783-791.

Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. (1984) The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity *EMBO J.* 3 (4), 869-872.

Napolitano M, Keime-Guibert F, Monjour A, Lafitte C, Ameri A, Cornu P, Broet P, Delattre JY (1999). Treatment of supratentorial glioblastoma multiforme with radiotherapy and a combination of BCNU and tamoxifen: a phase II study. *J Neurooncol.* 45, 229-235.

Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.

Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 187-207.

Pascolo S. 2006: Vaccination with messenger RNA *Methods Mol Med*, 127; 23-40

Peoples et al (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,432-436

Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O, Menendez-Rodriguez P, Mortimer J, Chang Y, Astudillo A, Deuel TF (2007). The receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) $\beta$ /zeta is expressed in different subtypes of human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 5-10.

Plebanski et al (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 1783-1787

Porta et al (1994) *Virology* 202, 449-955

Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol.* 27, 1-10.

Qin Z, Blankenstein T (2000). CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 12, 677-686.

Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T (2003). A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* 63, 4095-4100.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).

Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ (2006); Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; *Cancer.*; 107(1):67-74

[0235]

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, . (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316, 889-897.

Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 319, 1676-1680.

Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 481-506.

Sablotzki A, Ebel H, Muhling J, Dehne MG, Nopens H, Giesselmann H, Hempelmann G (2000). Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 82-87.

Saiki et al (1988) *Science* 239,487-491

Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM. (2006); Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; *J Clin Oncol.*; 24(19):3089-3094

Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Seeger,F.H. et al. 1999 The HLA-A\*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49, 571-576.

Shedlock DJ, Shen H (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.

Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187-195.

M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief (2008); An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Abstract No 3017

R. Stan, JD Wolchok and AD Cohen DNA vaccines against cancer *Hematol Oncol Clin North Am* 2006, 3; 613-636

Sun JC, Bevan MJ (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.

Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferre H, Lauemoller SL, Wolf XA, Lamberth K, Nissen MH, Pedersen LO, Buus S (2002). Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction. *Tissue Antigens* 59, 251-258.

[0236]

Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE (1993). A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins. *J Immunol. Methods* 163, 209-216.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den EB, Knuth A, Boon T (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.

Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der BP, Boon T, Van Den Eynde BJ (2004). An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 304, 587-590.

Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R (1994). Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol.* 153, 1665-1673.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.

Wang JC, Livingstone AM (2003). Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol.* 171, 6339-6343.

Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R (2005). Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65, 3299-3306.

Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, Rammensee HG (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62, 5818-5827.

Wu CW, !Lost Data, Li AF, Chi CW, Lin WC (2006). Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer Lett.* 242, 95-103.

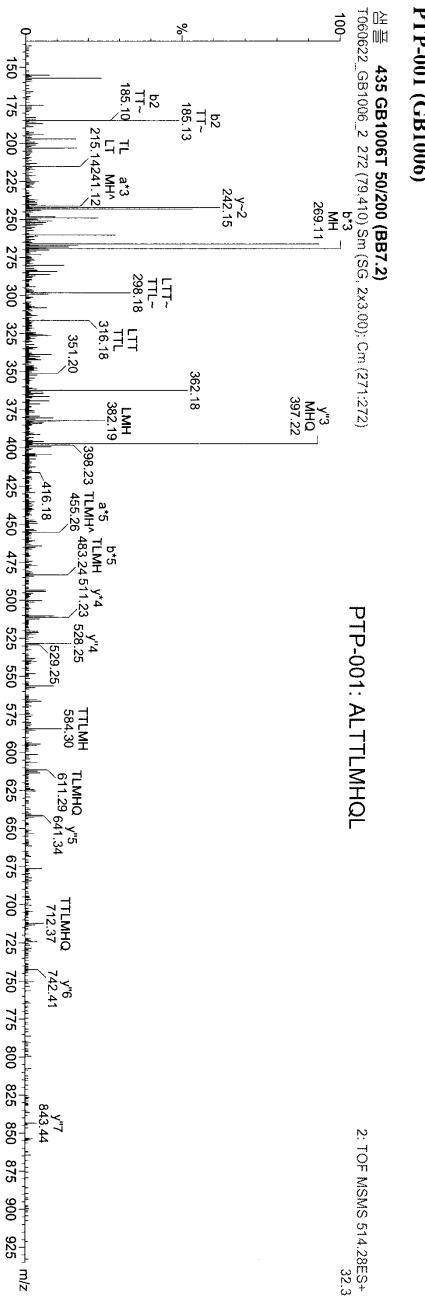
Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16168-16173.

Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J (1997). Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 57, 4570-4577.

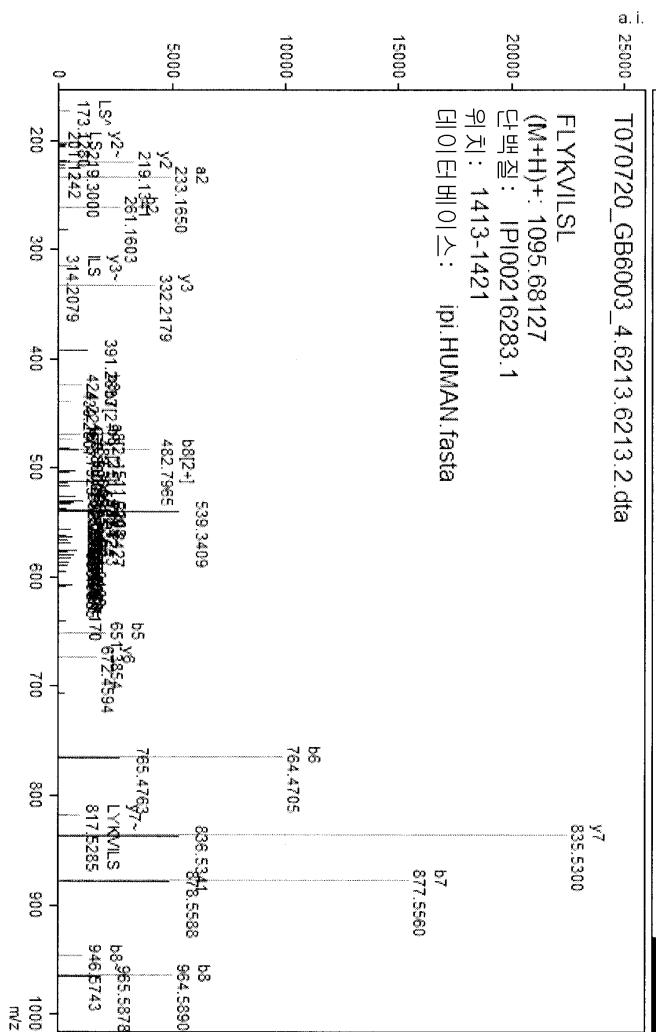
Zeh HJ, III, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC (1999). High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol.* 162, 989-994.

## 도면

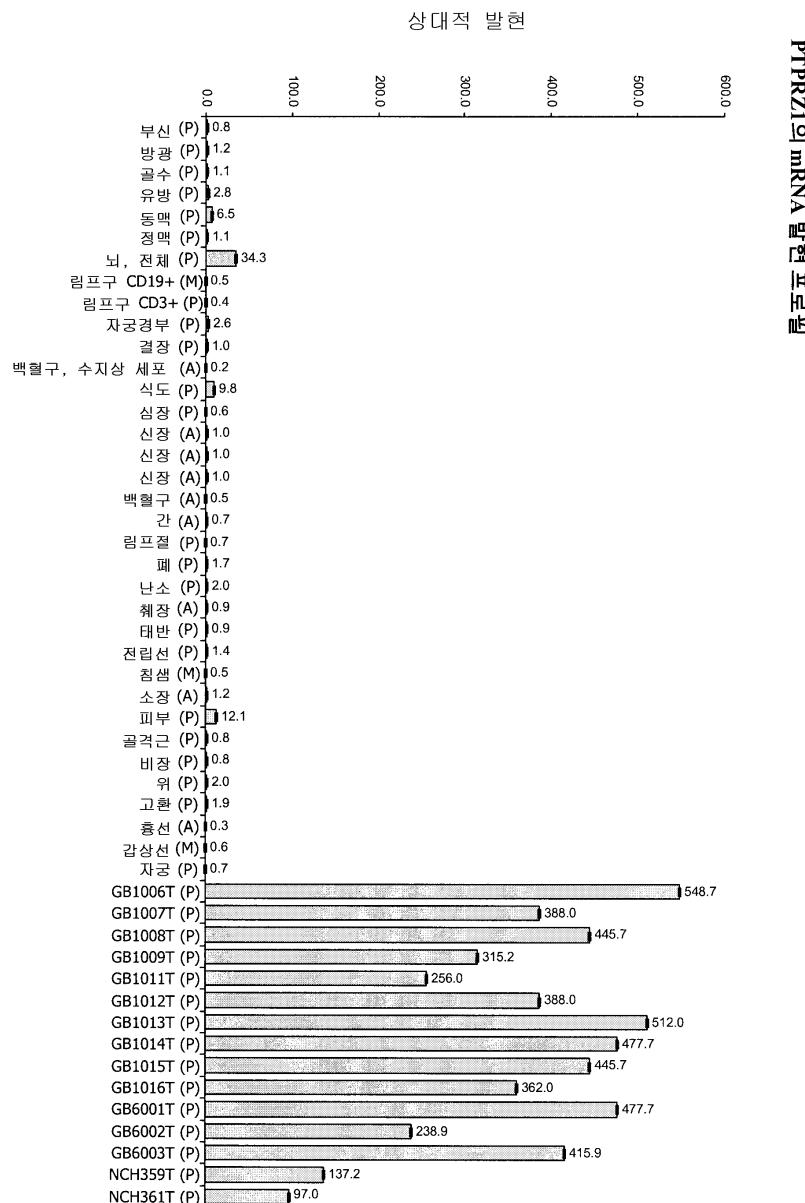
## 도면1a



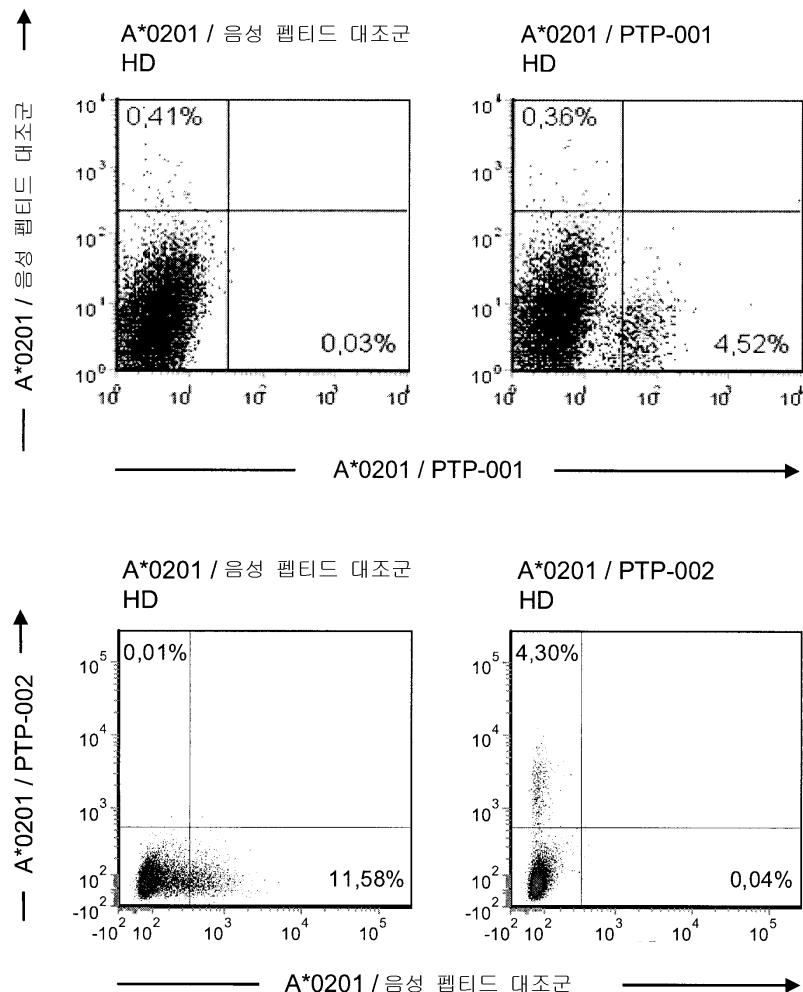
### 도면1b



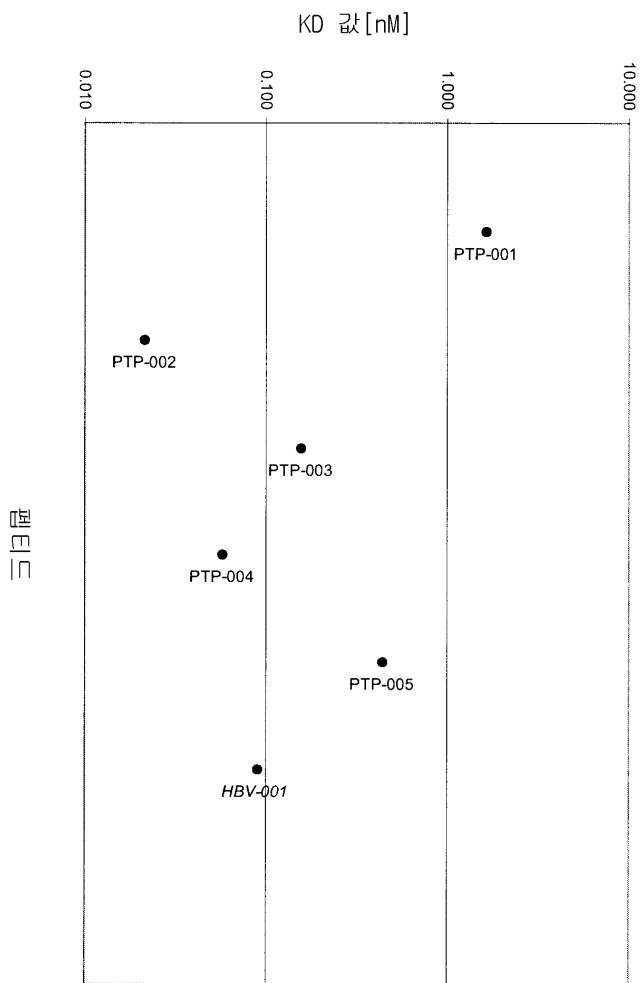
## 도면2



## 도면3



## 도면4



## 서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부