



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월01일
(11) 등록번호 10-1313915
(24) 등록일자 2013년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7015148(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년07월25일
 심사청구일자 2013년06월12일
(85) 번역문제출일자 2013년06월12일
(65) 공개번호 10-2013-0079650
(43) 공개일자 2013년07월10일
(62) 원출원 특허 10-2012-7005723
 원출원일자(국제) 2008년07월25일
 심사청구일자 2013년01월30일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/006153
(87) 국제공개번호 WO 2009/015842
 국제공개일자 2009년02월05일

(30) 우선권주장
07014797.0 2007년07월27일
유럽특허청(EPO)(EP)
60/953,161 2007년07월31일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2005116051 A1

전체 청구항 수 : 총 16 항

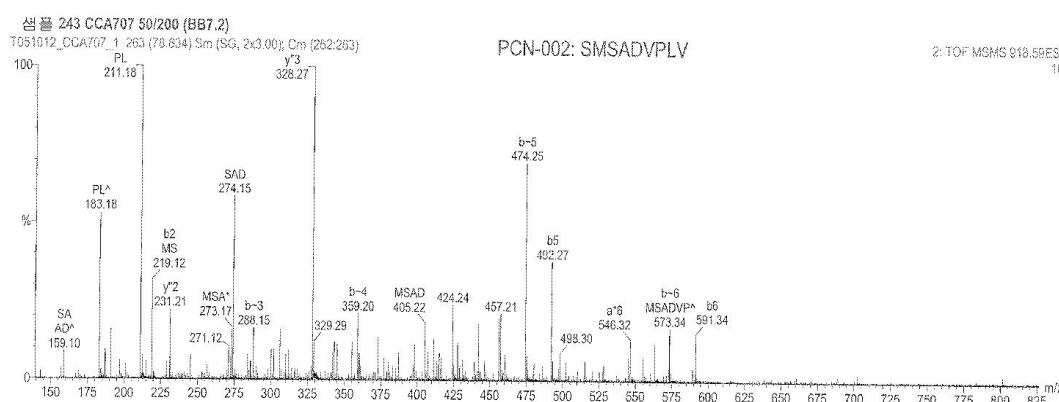
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 면역 치료를 위한 새로운 면역원성 에피톱

(57) 요약

본 발명은 어느 한 유형의 MHC의 복합체에 결합할 수 있고, 면역 반응을 불러 일으킬 수 있는 종양 관련 항원에서 유래된 웹티드의 아미노산 서열, 및 질병의 치료에서 상기 웹티드의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(72) 발명자

트라우트베인 클라우디아
독일 42489 빌프라트 넬켄베그 2
힐프 노르베르트
독일 72138 키르肯텔린스푸르트 임 벤게르태커 17
베인шен크 토니
독일 73773 아이크발트 임 모르겐라인 15

밸터 스테펜

독일 72764 로이틀린겐 스테이넨베르그스트라쎄 2
레반드로브스키 폐터
독일 72070 튜빈겐-운데르예신겐 란드하우스회체 4

특허청구의 범위

청구항 1

서열 식별 번호: 5(KIFDEILVNA)에 따른 아미노산 서열로 이루어진 펩티드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

펩티드가 비펩티드 결합을 포함하는, 펩티드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

펩티드가 HLA-DR 항원-관련 불변 쇄(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질의 일부인, 펩티드.

청구항 4

제 1 항에 따른 펩티드를 암호화하는 핵산.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

핵산이 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인, 핵산.

청구항 6

제 4 항에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터.

청구항 7

제 4 항 또는 제 5 항에 따른 핵산, 또는 제 6 항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

숙주세포가 수지상 세포 또는 항원 제시 세포인, 숙주 세포.

청구항 9

제 4 항 또는 제 5 항에 따른 핵산 또는 제 6 항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 상기 숙주 세포 또는 그의 배양 배지로부터 펩티드를 단리하는 것을 포함하는, 제 1 항에 따른 펩티드의 제조 방법.

청구항 10

시험관내 세포독성 T 림프구(CTL)와, 항원 특이적 방식으로 CTL을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 적합한 항원 제시 세포의 표면에서 발현된 항원 로딩된 인간 유형 I MHC 분자를 접촉시킴을 포함하되, 상기 항원이 제 1 항에 따른 펩티드인, 활성화된 CTL의 시험관내 제조 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

항원이, 충분한 양의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써, 적합한 항원 제시 세포의 표면에서 발현된 유형 I MHC 분자에 로딩되는, 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

항원 제시 세포가 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 함유하는 웨프티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 13

제 1 항에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨프티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제 10 항에 따른 방법에 의해 제조된 활성화된 세포독성 T 림프구(CTL).

청구항 14

제 1 항에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨프티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제 10 항에 따른 방법에 의해 제조된 활성화된 세포독성 T 림프구(CTL)의 유효수를 포함하는, 암의 치료 또는 예방을 위한 약제 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 웨프티드, 제 4 항 또는 제 5 항에 따른 핵산, 또는 제 6 항에 따른 발현 벡터를 포함하는, 암의 치료 또는 예방을 위한 약제 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

암이 직장결장, 췌장, 폐, 신장 또는 위 암 또는 아교모세포종인, 약제 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 어느 한 유형의 MHC의 복합체에 결합할 수 있고, 면역 반응을 불러 일으킬 수 있는 종양 관련 항원에서 유래된 웨프티드의 신규한 아미노산 서열에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역 반응의 자극은 숙주 면역 시스템에 의해 외래종으로서 인식되는 항원의 존재에 의존한다. 종양 관련 항원의 존재의 발견은 숙주의 면역 반응이 종양 성장에 개입하는 가능성을 제시했다. 면역 시스템의 체액성 및 세포성 가지를 이용하는 다양한 메커니즘이 현재 암 면역 치료에서 탐험되고 있다.

[0003] 세포 면역 반응의 일부 요소는 종양 세포를 특이적으로 인식하고 파괴할 수 있다. 종양 침투 세포 집단으로부터 또는 말초 혈액으로부터 세포독성 T 세포(CTL)의 단리는 이런 세포들이 암에 대해 천연 면역 방어로서 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 암시한다(문헌[Cheever et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 1993; 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; J Immunol. 1999, 162(2):989-94; High avidity CLTs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumour efficacy.]). 특히 세포질 효소에 위치한 단백질 또는 결합 리보솜 산물(DRIPS)로부터 유래되는 보통 8 내지 10개의 아미노산 잔기를 갖는 주요 조직 적합성 복합체(MHC)-함유 웨프티드의 유형 I 분자를 인식하는 CD8-양성 T 세포(TCD8⁺)(문헌 [Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; Nature 2000; 404(6779):770-774])가 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 또한, 인간의 MHC-분자는 인간 백혈구-항원(HLA)으로서 지정된다.

[0004] MHC-분자에는 두 가지 유형이 있다: MHC 유형 I 분자는 내인성 단백질, DRIPS 및 보다 큰 웨프티드의 단백질 가수 분해의 분할로부터 발생한 웨프티드가 존재하는 핵을 갖는 대부분의 세포에서 발견될 수 있다. MHC 유형 II 분자는 전문적인 항원 제시 세포(APC)에서 주로 발견될 수 있으며, 세포내이입 과정동안 APC에 의해 흡수되고 이어서 프로세싱되는 외인성 단백질의 웨프티드가 존재한다(문헌[Cresswell P. Annu. Rev. Immunol. 1994; 12:259-93]). 웨프티드 및 MHC 유형 I 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD8-양성 세포독성 T 림프구에 의해

인식되고, 웨티드 및 MHC 유형 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4-양성-조력-T-세포에 의해 인식된다. 따라서, TCR, 웨티드 및 MHC가 1:1:1의 화학량론의 양으로 충분하다는 것은 잘 알려졌다.

- [0005] CD4-양성 조력 T-세포는 항-종양 T 세포 반응의 작동자 기능을 조정하는 중요한 역할을 하고, 이 이유로 종양 관련 항원(TAA)으로부터 유래된 CD4-양성 T-세포 에피톱의 식별은 항-종양 면역 반응을 유도하는 약학 제품의 개발에 대단히 중요할 수 있다(문헌[Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herranz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borras-Cuesta, and E. Celis. 2002. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. Clin. Cancer Res. 8:3219-3225., Gnijatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N.K. Altorki, R.G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y.T. Chen, A. Knuth, and L.J. Old. 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(15):8862-7]). CD4+ T 세포는 국소적으로 증가된 IFN γ 의 수준을 야기할 수 있다(문헌[Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T; A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumour rejection by CD8+ T cells; Cancer Res. 2003 J; 63(14):4095-4100]).
- [0006] 염증의 부재시, MHC 유형 II 분자의 발현은 특히 전문적인 항원 제시 세포(APC) 예를 들면, 단핵세포, 단핵세포-유래된 세포, 대식세포, 수지상 세포 같은 면역 시스템의 세포로 제한된다. 종양 환자에서, 놀랍게도 종양 세포들은 MHC 유형 II 분자를 발현하는 것으로 밝혀졌다(문헌[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.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170]).
- [0007] 예를 들면, 마우스 같은, 포유류의 동물 모델에서 CTL 작동자 세포(즉, CD8-양성 T 림프구)의 부재하에서도, CD4-양성 T 세포는 인테페론-감마(IFN γ)의 분비에 의한 혈관형성의 억제를 통해 종양의 시각화를 억제하기에 충분하다는 것이 보여졌다(문헌[Qin, Z. and T. Blankenstein. 2000. CD4+ T-cell-mediated tumour rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. Immunity. 12:677-686]). 추가적으로, HLA 유형 II 분자에 의해 제시되는 종양 관련 항원으로부터 웨티드를 인식하는 CD4-양성 T-세포가 항체 (Ab) 반응을 유도함으로써 종양 진행을 방해할 수 있다는 것이 밝혀졌다(문헌[Kennedy, R.C., M.H. Shearer, A.M. Watts, and R.K. Bright, 2003. CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumour immunity against simian virus 40 large tumour antigen. Cancer Res. 63:1040-1045]). 반면, HLA 유형 I 분자에 결합하는 종양 관련 웨티드에 비해서, TAA의 유형 II 리간드의 소수만이 지금까지 설명되었다(www.cancerimmunity.org, www.syfpeithi.de).
- [0008] HLA 유형 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 시스템의 세포로 제한되므로(문헌[Mach, B., V. Steinle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. Annu. Rev. Immunol. 14:301-331]), 초기 종양으로부터 직접적으로 유형 II 웨티드를 단리하는 것은 가능하다고 여겨지지 않았다. 그러나, Dengjel 등은 최근에 종양으로부터 직접적으로 MHC 유형 II 에피톱 여러 개를 식별하는데 성공했다(EP 04 023 546.7, EP 05 019 254.1; 문헌[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.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170]).
- [0009] 웨티드는 세포 면역 반응을 유도하기 위해서, MHC-분자에 결합해야 한다. 이 과정은 MHC-분자의 대립 유전자 및 웨티드의 아미노산 서열의 특이적 다양현상에 의존한다. MHC-유형-I-결합 웨티드는 보통 길이가 8 내지 10 개의 아미노산 잔기이며, 일반적으로 MHC-분자의 상응하는 결합 그루브와 상호작용하는 서열에서 2개의 보존된 잔기("앵커")를 함유한다. 이런 식으로, 각각의 MHC 대립 유전자는 어떤 웨티드가 결합 그루브에 특이적으로 결합할 수 있는지를 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다(문헌[Rammensee H. G., Bachmann J. and Stevanovic, S; MHC Ligands and Peptide Motifs, Chapman & Hall 1998]).
- [0010] 면역 반응에 의존하는 MHC 유형 I에서, 웨티드는 특이적 T-세포 수용체(TCR)을 갖는 T 세포에 의해 인식되어야 할 뿐만 아니라 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 유형 I 분자에 결합할 수 있어야 한다.
- [0011] 종양 특이적 세포독성 T-림프구에 의해 인식되는 항원, 즉, 에피톱은 해당하는 종양의 세포에서 상향조절되는 효소, 수용체, 전사 인자 등 같은 모든 단백질 유형으로부터 유래된 분자일 수 있다. 또한, 종양 관련 항원은,

예를 들면, 돌연변이된 유전자의 산물로서 또는 다른 오픈 리딩 프레임(ORF) 또는 단백질 스플라이싱으로부터 종양 세포에 대해 독특할 수 있다(문헌[Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90.]). 또 하나의 중요한 종양 관련 항원의 유형은 CT("암 고환")와 같은 조직-특이적 항원이다, 즉 다양한 종류의 종양 및 건강한 고환 조직에서 발현되는 항원.

[0012] 다양한 종양 관련 항원이 식별되었다. 또한, 많은 연구 노력이 추가적인 종양 관련 항원을 식별하는데 소모되었다. 종양 특정 항원으로서 당해 분야에서 불리는 종양 관련 항원의 몇몇 그룹은 조직 특이적이다. 예는 흑색종에 대한 티로시나아제, 전립선 암에 대한 PSA 및 PSMA, 및 림프종에서의 bcr/abl 같은 염색체 크로스 오버가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러나, 식별된 다수의 종양 관련 항원은 복수개의 종양 유형에서 일어날 수 있고, 형질전환 사건을 실질적으로 유발하는 종양 억제 유전자(종양 억제 유전자는 예를 들면 신장 암에 대해서 검토된다(문헌[Linehan WM, Walther MM, Zbar B, The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol.* 2003 Dec; 170(6 Pt 1):2163-72])) 및/또는 원종양 단백질은 거의 모든 종양 유형에서 일어난다. 예를 들면, p53 (종양 억제 유전자의 예), ras, c-met, myc, pRB, VHL, 및 HER-2/neu 같은 세포 성장 및 분화를 조절하는 정상 세포 단백질은 돌연변이를 누적하여 이런 유전자 산물의 발현의 상향조절을 일으키고, 따라서 그들을 종양 발생적으로 만든다(문헌[McCartey et al. *Cancer Research* 1998 15:58 2601-5; Disis et al. *Ciba Found. Symp.* 1994 187:198-211]). 이러한 돌연변이 단백질은 여러 암 유형에서 종양 특이적 면역 반응의 목적이 될 수 있다.

[0013] 단백질이 세포독성 T-림프구에 의해 종양-특이적 또는 -관련 항원으로서 인식되고, 이들을 치료에 사용하기 위해서 특정 전제 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되고, 정상적인 건강한 조직에 의해서는 작은 양 또는 발현되지 않아야 한다. 더 바람직한 것은, 각각의 항원이 종양의 한 유형에서만 나타나는 것이 아니라, 농도(즉, 세포 마다 각 웨티드의 복사 개수) 또한 높아야 한다. 종양-특이적 및 종양-관련 항원은, 예를 들면 세포 주기 조절 또는 세포자멸사에서와 같은 기능으로 인한 정상 세포의 종양 세포로의 형질전환에 직접적으로 관련되는 단백질로부터 종종 유래된다. 추가적으로, 형질전환에 직접적인 원인인 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있으며 따라서 간접적으로 종양 관련될 수 있다. 이런 간접적 종양-관련 항원도 백신 접근의 표적이 될 수 있다(문헌[Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., *Cancer Immunol. Immunother.* 2004 Mar; 453 (3): 187-95]). 두 가지 경우에서, 종양 관련 항원으로부터 유래된 웨티드("면역 원성 웨티드")가 시험관내 또는 생체내 T-세포-반응으로 이끌어야만 하기 때문에, 항원의 아미노산 서열에 에피톱을 가지는 것이 필수적이다.

[0014] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 어떤 분자라도 T-세포 에피톱으로서 작동할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 T-세포-반응의 유도를 위한 전제조건은 상응하는 TCR을 갖는 T 세포의 존재 및 이 특정 에피톱에 대한 면역원성 내성이 부재이다.

[0015] 그러므로, TAA는 종양 백신의 개발을 위한 시작점이다. TAA의 식별 및 특성화 방법은 환자 또는 건강한 대상으로부터 단리될 수 있는 CTL의 사용을 기반으로 하거나, 종양과 정상 조직 간의 차별적인 전사 프로파일 또는 차별적인 웨티드 발현 패턴의 발생을 기반으로 한다(문헌[(Lemmel C., Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D., Rammensee H. G., Stevanovic S. *Nat. Biotechnol.* 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 62 (20):5818-5827, 2002.]).

[0016] 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현된 유전자, 또는 그러한 조직 또는 세포주에서 선택적으로 발현된 유전자의 식별은 면역 치료시 이런 유전자로부터 전사된 항원의 용도에 대한 정확한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 이런 항원의 에피톱의 개개의 소집단이 유일하게 상기 용도에 적합하기 때문이고 이는 상응하는 TCR을 갖는 T-세포가 존재해야 하고 이 특정 에피톱에 대한 면역원성 내성이 없거나 최소화될 필요가 있기 때문이다. 따라서, 기능적인 T-세포를 발견할 수 있는 MHC 분자와 함께 제시되는 과발현 또는 선택적으로 발현된 단백질로부터의 웨티드만을 선택하는 것이 중요하다. 이런 기능적인 T-세포는 특이적 항원에 의한 자극시에 클론화되어 확장될 수 있고 작동자 기능("작동자 T-세포")을 실행할 수 있는 T 세포로서 정의된다.

[0017] T 조력 세포는 항-종양 면역에서 CTL의 작동자 기능을 조정하는데 중요한 역할을 한다. CD8-양성 살해 T 세포의 T_{H1} 유형 지지 작동자 기능의 T 조력 세포 반응을 유도하고 세포독성 기능을 포함하는 T 조력 세포 에피톱은, 세포 표면에 종양 관련 웨티드/MHC 복합체를 나타내는 종양 세포로 지향한다. 이러한 방식으로, 종양 관련 T

조력 세포 에피톱은 단독으로 또는 다른 종양 관련 펩티드와 조합되어 항-종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 성분으로서 쓰일 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] CD8과 CD4 의존하는 반응 유형 둘 다가 항 종양 효과에 같이 그리고 상승적으로 기여하므로, CD8+ CTL(리간드: MHC 유형 I 분자 + 펩티드 에피톱) 또는 CD4-양성 CTL(리간드: MHC 유형 II 분자 + 펩티드 에피톱)에 의해 인식되는 종양 관련 항원의 식별 및 특성화는 종양 백신의 개발에 있어 중요하다. 따라서, 어느 한 유형의 MHC 복합체에 결합할 수 있는 펩티드에 대한 신규한 아미노산 서열을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 첫 번째 양태는 서열 식별 번호: 1 내지 서열 식별 번호: 29로 이루어진 군 중에서 선택된 서열, 또는 서열 식별 번호: 1 내지 서열 식별 번호: 29와 80% 상동성을 갖는 이들의 변이체를 포함하는 펩티드, 또는 상기 펩티드와 T 세포 교차-반응을 유도하는 펩티드의 변이체를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 "상동성"은 두 아미노산 서열, 즉 펩티드 또는 폴리펩티드 서열의 동일함 정도를 지칭한다. 상술한 "상동성"은 최적의 조건하에 정렬된 두 개의 서열을 비교할 서열에 대해 비교함으로써 결정된다. 본원에서 비교될 서열은 두 개의 서열의 최적 정렬시에 첨가 또는 삭제(예를 들면, 캡 등)가 있을 수 있다. 이런 서열 상동성은, 예를 들면 ClustalW 알고리즘(문헌[Nucleic Acid Res., 22(22): 4673-4680 (1994)])을 사용하는 정렬을 만듬으로써 계산될 수 있다. 통상적으로 이용되는 서열 분석 소프트웨어, 보다 구체적으로, 벡터 NTI, GENETYX 또는 예를 들면 <http://dragon.bio.purdue.edu/bioinfolinks/> 같은 공동 데이터베이스에서 제공되는 분석 도구도 이용될 수 있다.

[0021] 당해 분야의 기술자는 특이적 펩티드의 변이체에 의해 유도된 T 세포가 펩티드 그 자체와 교차 반응할 수 있는지를 평가할 수 있다(문헌[Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, and Engleman, EG; 2001, Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 8809-8814); (Zaremba, S, Barzaga, E, Zhu, M, Soares, N, Tsang, KY, and Schliom, J; Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen, Cancer Res., 1997, 57, 4570-4577; Colombetti, S, Fagerberg, T, Baumgartner, P, Chapatte, L, Speiser, DE, Rufer, N, Michielin, O, and Levy, F; Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity, J Immunol., 2006, 176, 6560-6567; Appay, V, Speiser, DE, Rufer, N, Reynard, S, Barbey, C, Cerottini, JC, Leyvraz, S, Pinilla, C, and Romero, P; Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide, Eur. J Immunol., 2006, 36, 1805-1814]).

[0022] 표 1은 모 단백질에 대한 정보뿐만 아니라 펩티드와 그들 각각의 서열 식별 번호를 보여준다.

[표 1]

[0024]

본 발명의 펩티드

| 서열 번호 | 펩티드 코 드 | 서열 | HLA 대립 유전 자 | 유전자 |
|----------|------------|--------------------|----------------------|----------------|
| 1 | C20-001 | ALSNLEVTI | A*02 | C20orf42 |
| 2 | NOX-001 | ILAPVILYI | A*02 | NOX1 |
| 3 | PCN-001 | KLMULDVEQL | A*02 | PCNA |
| 4 | PCN-002 | SMSADVPLV | A*02 | PCNA |
| 5 | TOP-001 | KIFDEILVNA | A*02 | TOP2A, TOP2B |
| 6 | TOP-002 | AAFVEELDKV | A*02 | TOP2B |
| 7 | CEA-009 | VLLLVHNLQPQHILFG | class II | CEACAM5 |
| 8 | TGFBI-001 | ALFVRLLALA | A*02, A*02/B*1 3? | TGFBI |
| 9 | TGFBI-006 | GDKLEVSLKNNVVS | 유형 II | TGFBI |
| 10 | TGFBI-007 | GKKLRVFVYRNSLCIENS | 유형 II | TGFBI |
| 11 | TGFBI-008 | LKNVVSVNKEPVAEPD | 유형 II | TGFBI |
| | | KNNVVSVNKEPVAEPD | 유형 II | TGFBI |
| | | KNNVVSVNKEPVA | 유형 II | TGFBI |
| | | LKNVVSVNKEPVA | 유형 II | TGFBI |
| 12 | TGFBI-009 | NGVIHYIDELLIPDS | 유형 II | TGFBI |
| | | GVIHYIDELLIPDSA | 유형 II | TGFBI |
| 13 | TGFBI-010 | LNRILGDPEALRDL | 유형 II | TGFBI |
| 14 | TGFBI-004 | TPPIDAHTRNLLRNH | 유형 II | TGFBI |
| 15 | PTP-001 | ALTTLMHQL | A*02 | PTPRZ1 |
| 16 | GAL-001 | SLDPSSPQV | A*02 | GAL3ST1 |
| 17 | CH1-001 | SLWAGVVVL | A*02 | CHI3L2 |
| 18 | JAK-001 | KLTDIQIEL | A*02 | JAKMIP2 |
| 19 | AKR-001 | YLIHFPVSV | A*02 | AKR1C1, AKR1C2 |
| 20 | FN1-001 | IVDDITYNV | A*02 | FN1 |
| 21 | EGFR-002 | GAVRFSNNPALCNVES | 유형 II | EGFR |
| | | AVRFSNNPALCNVES | 유형 II | EGFR |
| | | AVRFSNNPALCNVE | 유형 II | EGFR |
| 22 | EGFR-005 | NPTYQMDVNPEGKYS | 유형 II | EGFR |
| 23 | EGFR-006 | FKKIKVLGSGAFIG | 유형 II | EGFR |
| 24 | CHI3L1-001 | TTLIKEMKAIFIKEAQPG | 유형 II | CHI3L1 |
| | | TLLIKEMKAIFIKEAQPG | 유형 II | CHI3L1 |
| | | TTLIKEMKAIFIKEA | 유형 II | CHI3L1 |
| | | TLLIKEMKAIFIKEA | 유형 II | CHI3L1 |
| | | IKEEMKAIFIKEAQPG | 유형 II | CHI3L1 |
| | | TTLIKEMKAIFIKE | 유형 II | CHI3L1 |
| 25 | CHI3L1-007 | VKSKVQYLKDRQLAG | 유형 II | CHI3L1 |
| 26 | CHI3L1-008 | SRRTFIKSVPPLRT | 유형 II | CHI3L1 |
| 27 | DCA-001 | KLGDFGLATVV | A*02 | DCAMKL2 |
| 28 | KCN-001 | SLFDQVVKV | A*02 | KCNJ10 |
| 29 | GPM-001 | ALLSEVIQL | A*02 | GPM6B |

[0025]

염색체 20 오픈 리딩 프레임 42

[0026]

C20orf42는 혈장 막에의 액틴 세포 골격의 부착 및 인테그린-매개된 세포 처리와 관련된 초점 접착 단백질이다. 기능 손실 돌연변이의 결과로서 C20orf42의 결핍은 피부 물집, 진행성 피부 위축증, 광감성, 및 때때로 발암을 특징으로 하는 상 염색체 열성 유전 피부병인 친들러(Kindler) 증후군을 야기한다(문헌[Herz, C, Aumailley, M, Schulte, C, Schlotzer-Schrehardt, U, Bruckner-Tuderman, L, and Has, C; Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes, J Biol Chem., 2006, 281, 36082-36090]). 최근에는, 출혈성 대장염에 대한 심각한 위장관의 관여가 기능 손실 돌연변이가 있는 환자에게서 보고되었다(문헌[Sadler, E, Klausegger, A, Muss, W, Deinsberger, U, Pohla-Gubo, G, Laimer, M, Lanschuetzer, C, Bauer, JW, and Hintner, H; Novel KIND1 gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement, Arch. Dermatol., 2006, 142, 1619-1624]).

[0027]

암과 관련하여, C20orf42는 암-관련 환경에서 유전자 발현을 조사하는 연구에서 설명되었다. 그것은 시험된 (n=10) 대장암의 70% 및 폐암의 60%에서 과발현 되는 것으로 밝혀졌다. 노던 블롯(Northern Blot)에 의해 발현된 정상 조직은 신경근육 조직으로 제한된다(문헌[Weinstein, EJ, Bourner, M, Head, R, Zakeri, H, Bauer, C, and Mazzarella, R; URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-

associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1637, 207-216]. 또한, C20orf42는 TGF- β -매개된 세포 이동 및 종양 침입에 관련된 유전자로서 식별되었다(문헌[Kloeker, S, Major, MB, Calderwood, DA, Ginsberg, MH, Jones, DA, and Beckerle, MC; The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 6824-6833]).

[0029] NADPH 산화효소 동족체-1 (NOX1)

[0030] NOX1은 반응성 산소 종 초과산화물(O_2^-) 및 과산화수소(H_2O_2)의 형성을 촉매하는 성장 인자-반응 효소이다. 그 것의 발현은 원래 대장, 전립선, 자궁에서 식별되었고, 혈관 평활근 세포를 증식시켰다(문헌[Suh, Y. A. et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999, 401, 79-82]). 그것의 발현은 세포 증식, 혈관형성, 및 세포 신호 전달 경로의 활성화를 비롯한 여러 생물학적 반응에 연관되어 있다(문헌[Harper, R. W., Xu, C., Soucek, K., Setiadi, H. and Eiserich, J. P. A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants, *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 435, 323-330]).

[0031] NOX1은 대장에서 높이 발현되고 있으나, 대장 생리학 또는 병리학에서 그것의 기능은 제대로 이해되지 않고 있다. 정상 조직에서, NOX1의 발현은 회장에서는 낮았고, 오른쪽 대장에서는 중간이었고, 왼쪽 대장에서는 높았다. 선종, 충분히 분화된 또는 불완전하게 분화된 대장 선암으로부터 유래된 샘플들 간의 NOX1 발현의 통계학적인 차이를 보이지 않았다. NOX1은 장샘 내 및 관강 표면 상의 대장 상피 세포에서 높게 발현되었다. 결론적으로, NOX1은 대장 상피에서 구성적으로 발현되고 종양생성과 직접적으로 관련되지 않은 효소이다(문헌[Szanto, I. et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2005, 207, 164-176]).

[0032] 면역 조직 화학은 NOX1가 표면 점막 세포에서 구성적으로 발현되는 것을 보여준다. 선종 및 충분히 분화된 선암은 NOX1 발현을 상향조절한다. 핵 인자(NF)-kappaB는 주로 풍부한 NOX1을 발현하는 선종 및 선암 세포에서 활성화되었고, 이 것은 NOX1이 대장 종양에서 NF-KappaB에 의존하는 항세포자멸 경로를 자극한다는 것을 암시한다(문헌[Fukuyama, M. et al. Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett.* 2005, 221, 97-104]).

[0033] Wnt3a/베타-카테닌 신호는 NOX1의 발현을 유도하는 것으로 기재된다(문헌[Petropoulos, H. & Skerjanc, I. S. Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem.* 2002, 277, 15393-15399]).

[0034] 최근, 반응성 산소 종은 내피 세포자멸사를 유도하고, 그 이후 종양 세포의 여러 가지 접착 분자의 발현을 유도한다고 시사되었다. 이것은 ROS의 생성과 부딪침으로써 원거리 부위에서 종양 재발이 방지될 수 있음을 나타낸다(문헌[Ten, KM, van der Wal, JB, Sluiter, W, Hofland, LJ, Jeekel, J, Sonneveld, P, and van Eijck, CH; The role of superoxide anions in the development of distant tumour recurrence, *Br.J Cancer*, 2006, 95, 1497-1503]).

세포 핵 항원 증식(PCNA)

[0035] PCNA은 핵에서 발견되며 DNA 중합효소 엘타의 공동인자이다. 암호화된 단백질은 동종삼량체로서 작용하며 DNA 복제 동안 선도 가닥 합성의 진행도를 증가 시키는 것을 도와준다. 따라서, 그것은 모든 증식 세포, 특히 종양 세포에서 발현되며, 증식을 검출하는 마커로서 사용된다.

DNA 위상 이성질화 효소 II

[0036] TOP2A 및 TOP2B는 전사 중 DNA의 위상 상태를 조절하고 변경하는 효소인 DNA 위상 이성질화 효소의 동형을 암호화한다. 이 핵 효소는 DNA 전사 및 복제 중에 일어나는 염색체 응축, 염색분체 분리 및 비틀린 스트레스의 완화와 같은 과정에 관여한다. DNA 위상 이성질화 효소는 이중 DNA의 두 가닥의 일시적인 파괴 및 재결합을 촉진시키고, 이 것은 가닥들을 서로 통과할 수 있게 만드며, 따라서 DNA 위상을 변경한다. 이 효소의 두 개의 동형은 유전자 복제 사건 가능한 산물로서 존재한다. 알파 형태를 암호화하는 유전자는 염색체 17에서 배치되고 베타 유전자는 염색체 3에 배치된다.

[0037] TOP2A는 여러 항암제에 대한 표적이며, 이 유전자의 다양한 돌연변이는 약물 내성의 개발에 관련되어 왔다.

[0038] TOP2A 유전자는 17q12-q21 염색체에서 HER-2 종양 유전자, 유방암에서 가장 자주 증폭되는 종양 유전자에 인접

하게 위치하며, HER-2 증폭된 유방암 종양의 거의 90%에서 같은 빈도로 증폭되거나 삭제된다(문헌[Jarvinen, TA and Liu, ET; Topoisomerase II alpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer-more common than anticipated., Cytopathology, 14, 309-313]). 또한, TOP2A 증폭은 다른 암에서도 보고되었다.

[0041] TOP2A가 없는 DNA 복제 및 세포 분열은 불가능하다. 따라서, 세포를 사멸시키는 정확한 메커니즘은 애매할지라도 많은 항종양 요법의 주요 표적이 되었다(문헌[Kellner, U, Sehested, M, Jensen, PB, Gieseler, F, and Rudolph, P; Culprit and victim -DNA topoisomerase II, Lancet Oncol., 2002, 3, 235-243]). 이 접근법의 성공은 자발적인 내성의 발달에 의해 제한되며, 약물-유발 DNA 손상은 악성도를 증가시킬 수 있다. 최근의 자료는 TOP2A의 증폭 및 삭제는 TOP2A 유전자 좌의 특이적 유전적 결핍에 따라, TOP2A-억제제-화학치료에 대한 민감도 및 내성 둘 다에 대한 원인이 됨을 시사한다.

[0042] 암에서의 TOP2B의 관여가 TOP2A와 비슷한지 또는 두 동형에 주요 차이가 있는지는 명확하지 않다. TOP2B는 TOP2A 활동의 일부에 대해 적어도 보충될 수 있다(문헌[Sakaguchi, A and Kikuchi, A; Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase, J Cell Sci., 2004, 117, 1047-1054]).

암배아 항원-관련 세포 접착 분자 5

[0044] 암배아 항원 (CA=CEACAM5)은 N-말단 Ig V-유사 영역 및 C-말단 영역에 인접한 세 개의 C2 Ig-유사 반복 단위로 구성된 180kDa의 고도로 글리코실화된 막 단백질이고, 글리코포스파티딜리노시톨 연결 영역을 포함한다(문헌[Hegde, P, Qi, R, Gaspard, R, Abernathy, K, Dharap, S, Earle-Hughes, J, Gay, C, Nwokekeh, NU, Chen, T, Saeed, AI, Sharov, V, Lee, NH, Yeatman, TJ, and Quackenbush, J; Identificaiton of tumour markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, Cancer Res., 2001, 61, 7792-7797]).

[0045] 종양 태아성 항원으로서, CEA는 태아의 발달 과정 중에 발현되고, 낮은 수준에서는 또한 성인의 위장 상피에서도 발현된다. 그러나, CEA는 위장, 대장, 췌장암의 90%, 비-소 세포 폐암 세포의 70% 및 유방암의 50%를 비롯하여, 인간 종양에서 높은 비율로 과발현된다(문헌[Thompson, JA, Grunert, F, and Zimmermann, W; Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives, J Clin Lab Anal., 5, 344-366 2005]). 종양 세포의 높은 발현 및 혈청으로의 분비로 인해, CEA는 종양 마커로서(문헌[Sikorska, H, Shuster, J, and Gold, P; Clinical applications of carcinoembryonic antigen, Cancer Detect.Prev., 12, 321-355 1988]) 및 직장결장암 모니터를 위한 표준 혈청 마커(문헌[Locke, GY, Hamilton, S, Harris, J, Jessup, JM, Kemeny, N, Macdonald, JS, Somerfield, MR, Hayes, DF, and Bast, RC, Jr.; ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumour markers in gastrointestinal cancer, J Clin Oncol, 24, 5313-5327, 2006])로서 널리 사용되었다.

[0046] 종양 세포에서 CEA의 과발현에도 불구하고, 일반적으로 암 환자들은 항원에 대한 면역 반응을 보이지 않는다(문헌[Orefice, S, Fossati, G, Pietrojusti, E, and Bonfanti, G; Delayed cutaneous hypersensitivity reaction to carcinoembryonic antigen in cancer patients, Tumouri, 1982, 68, 473-475]). 면역계는 보통은 신체에서 낮은 수준으로 발현되기 때문에 일반적으로 CEA에 내성을 갖는다. 그러나, 여러 가지 임상 백신 시험에서, CEA의 면역원성(문헌[Sarobe, P, Huarte, E, Lasarte, JJ, and Borras-Cuesta, F; Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumour immune responses, Curr. Cancer Drug Targets., 2004, 4, 443-454]), 특히 직장결장암(CRC)에서(문헌[Mosolits, S, Ullenhag, G, and Mellstedt, H; Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results, Ann.Oncol., 2005, 16, 847-862]) 증명되었고, CEA는 이 종양 유형에서 가장 높은 수의 시험된 백신 플랫폼을 갖는 종양 관련 항원(TAA)이다(문헌[von Mehren, M; 대장암 백신: what we know and what we don't yet know, Semin. Oncol., 2005, 32, 76-84]).

[0047] 여러 가지 세포 독성 및 조력 T 세포 에피톱은 CEA에 대해 설명되었고(문헌[Crosti, M, Longhi, R, Consogno, G, Melloni, G, Zannini, P, and Protti, MP; Identification of novel subdominant epitopes on the carcinoembryonic antigen recognized by CD4+ T-cells of lung cancer patients, J Immunol., 2006, 176, 5093-5099; Novellino, L, Castelli, C, and Parmiani, G; A listing of human tumour antigens recognized by T-cell, March 2004 update, Cancer Immunol.Immunother., 2004, 54, 187-207; Ruiz, M, Kobayashi, H, Lasarte, JJ, Prieto, J, Borras-Cuesta, F, Celis, E, and Sarobe, P; Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen, Clin Cancer Res., 2004, 10, 2860-2867]), 이것은

다양한 펩티드를 기반으로 한 CRC 백신 시험을 가능하게 했다(문헌[Babatz, J, Rollig, C, Lobel, B, Folprecht, G, Haack, M, Gunther, H, Kohne, CH, Ehninger, G, Schmitz, M, and Bornhauser, M; Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumours after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells, Cancer Immunol. Immunother., 2006, 55, 268-276; Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, and Engleman, EG; Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumour immunotherapy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2001, 98, 8809-8814; Liu, KJ, Wang, CC, Chen, LT, Cheng, AL, Lin, DT, Wu, YC, Yu, WL, Hung, YM, Yang, HY, Juang, SH, and Whang-Peng, J; Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A*0201 and HLA-A*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides, Clin Cancer Res., 2004, 10, 2645-2651; Matsuda, K, Tsunoda, T, Tanaka, H, Umano, Y, Tanimura, H, Nukaya, I, Takesako, K, and Yamaue, H; Enhancement of cytotoxic T- lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells, Cancer Immunol. Immunother., 2004, 53, 609-616; Ueda, Y, Itoh, T, Nukaya, I, Kawashima, I, Okugawa, K, Yano, Y, Yamamoto, Y, Naitoh, K, Shimizu, K, Imura, K, Fuji, N, Fujiwara, H, Ochiai, T, Itoi, H, Sonoyama, T, Hagiwara, A, Takesako, K, and Yamagishi, H; Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas, Int. J Oncol., 2004, 24, 909-917; Weihrauch, MR, Ansen, S, Jurkiewicz, E, Geisen, C, Xia, Z, Anderson, KS, Gracien, E, Schmidt, M, Wittig, B, Diehl, V, Wolf, J, Bohlen, H, and Nadler, LM; Phase I/II combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2 -restricted CAP-I peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer, Clin Cancer Res., 2005, 11, 5993-6001]). 이 임상 실험들과 지금까지 있었던 다른 임상 실험들에서 CEA 백신에 대한 안정성 및 항원에 대한 면역 반응의 유도에 대한 증거가 증명되었다(문헌[von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, Semin.Oncol., 2005, 32, 76-84]).

[0048] 형질전환 성장 인자, 베타-유도(TGFBI)

[0049] TBFBI는 인간 폐 선암 세포주에서 TFG-베타-유도가능한 유전자로서 최초로 식별되었다. 이것은 세포 접착 및 세포외 매트릭스 조성에 작용하는 것으로 생각되는, 분비된 세포외 매트릭스 단백질에 대해 암호화한다.

[0050] TGFBI는 대장암에서 가장 유의적으로 상승된 유전자 중 하나이고, 선종에서도 높은 수준으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. 정량적 PCR 결과는 비정제된 종양 및 정제된 종양 상피 세포에서 둘 다에서 강한 상승을 증명하였다. 따라서, 제자리 하이브리드화 실험은 TGFBI가 많은 세포 유형, 간질성 및 상피 구획 둘 다에서 발현된다고 밝혔다(문헌[Buckhaults, P, Rago, C, St, CB, Romans, KE, Saha, S, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW; Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumours, Cancer Res., 2001, 61, 6996-7001]).

[0051] 직장결장암에서의 유전자 발현을 조사하는 연구의 메타-분석에서, TGFBI는 반복적으로 상향조절되는 오직 아홉 개의 유전자 중 하나로서 식별되었다(TGFBI를 위한 4개의 연구)(문헌[Shih, W, Chetty, R, and Tsao, MS; Expression profiling by microarrays in colorectal cancer, Oncol. Rep., 2005, 13, 517-524]).

[0052] 인간의 췌장 조직에서, 췌장암의 TGFBI mRNA수준은 정상 대조군 조직에 비해서 32.4배 증가한다. 제자리 하이브리드화 분석에서, TGFBI mRNA가 대부분 췌장 암 덩어리 내의 암 세포에서 발현된다는 것을 밝혀냈다(문헌[(Schneider, D, Kleeff, J, Berberat, PO, Zhu, Z, Korc, M, Friess, H, and Buchler, MW; Induction and expression of betaig-h3 in pancreatic cancer cells, Biochim.Biophys.Acta, 2002, 1588, 1-6]).

[0053] TGFBI는 시험관내 모델에서 혈관형성 촉진 유전자로서 식별되었다. 또한, 획기적으로 향상된 TGFBI의 발현이 여러 가지 종양에서 검출되었다. 앤티센스 올리고뉴클레오티드 내지 TGFBI는 유전자 발현 및 시험관내 내피관 형성 둘 다를 차단하고, 이것은 TGFBI가 내피 세포 매트릭스 상호작용에서 중요한 역할을 하는 것을 시사한다(문헌[Aitkenhead, M, Wang, SJ, Nakatsu, MN, Mestas, J, Heard, C, and Hughes, CC; Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-I, (beta)ig-h3, and NrCAM, Microvasc. Res., 2002, 63, 159-171]).

[0054] 단백질 타이로신 포스파타아제, 수용체-유형, Zeta 1 (PTPRZ1)

- [0055] PTPRZ1은 단백질 타이로신 포스파타아제 과의 수용체 유형의 일원이며, 단일-통과 유형 I 막 단백질을 2개의 세포질 타이로신-단백질 포스파타아제 도메인, 알파-탄소의 탈수효소 도메인 및 피브로넥틴 유형 III 도메인으로 암호화한다. 이 유전자의 발현은 위암 세포에서(문헌[Wu, CW, Li, AF, Chi, CW, and Lin, WC; Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues, Cancer Lett., 2006, 242, 95-103]), 다발 경화증 병변의 희소돌기아교세포를 제거하는 희소돌기아교세포에서(문헌[Harroch, S, Furtado, GC, Brueck, W, Rosenbluth, J, Lafaille, J, Chao, M, Buxbaum, JD, and Schlessinger, J; A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions, Nat. Genet., 2002, 32, 411-414], 및 저산소성 상태하의 인간 배아 신장 세포에서(문헌[Wang, V, Davis, DA, Haque, M, Huang, LE, and Yarchoan, R; Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in HEK293T-cells, Cancer Res., 2005, 65, 3299-3306]) 유도된다.
- [0056] 단백질 및 전사를 둘 다 아교모세포종 세포에서 과발현되며, 접촉 주성 이동을 촉진시킨다(문헌[Lu, KV, Jong, KA, Kim, GY, Singh, J, Dia, EQ, Yoshimoto, K, Wang, MY, Cloughesy, TF, Nelson, SF, and Mischel, PS; Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin, J Biol Chem., 2005, 280, 26953-26964]).
- [0057] 또한, PTRPZ1은 아교모세포종의 계놈 DNA 수준에서 자주 증폭된다(문헌[Mulholland, PJ, Fiegler, H, Mazzanti, C, Gorman, P, Sasieni, P, Adams, J, Jones, TA, Babbage, JW, Vatcheva, R, Ichimura, K, East, P, Poulikas, C, Collins, VP, Carter, NP, Tomlinson, IP, and Sheer, D; Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme, Cell Cycle, 2006, 5, 783-791]).
- [0058] **야누스 키나아제 및 미세 소관과 상호 작용하는 단백질 2 (JAKMIP2)**
- [0059] JAKMIP2는 알려지거나 추정되는 ARMS(소아과의 횡문근육종, 폐포의 아형)에서 고도로 과발현되는 PAX3-FKHR의 하류 표적 중 하나로서 식별되었다(문헌[Lae, M, Ahn, E, Mercado, G, Chuai, S, Edgar, M, Pawel, B, Olshen, A, Barr, F, and Ladanyi, M; Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas, J Pathol., 2007, 212, 143-151]).
- [0060] **피브로넥틴 1 (FN1)**
- [0061] 피브로넥틴은 인테그린이라고 불리는 세포막을 연결하는 수용체 단백질에 결합되는 약 5%의 탄수화물을 포함하는 고분자량 당단백질이다. 인테그린 외에도, 콜라겐, 피브린 및 혜파린과 같은 세포외 매트릭스 구성요소에도 결합한다. 단일 유전자의 산물인 피브로넥틴의 여러 동형이 있다. FN은 정상 세포 형태의 유지, 세포 접착, 이동, 치혈, 혈전증, 상처 치료, 분화 및 증식에서 중요한 역할을 한다(문헌[Hynes, RO; Fibronectins, Sci. Am., 1987, 254, 42-51]).
- [0062] 중합체성 피브로넥틴, sFN은 피브로넥틴에서 초기 유형 III 반복으로부터 유래되는 76-aa 웨პ티드, III1-C(아나스텔린이라고 불림)로 가용성 피브로넥틴을 처리함으로써 시험관내에서 만들어진다. 종양을 가진 마우스의 생체내 연구는 아나스텔린 또는 sFN의 전신 투여가 종양 성장, 혈관형성 및 전이를 억제함을 보여주었다(문헌[Yi, M and Ruoslahti, E; A fibronectin fragment inhibits tumour growth, angiogenesis, and metastasis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2001, 98, 620-624]). 앤지넥스는 원래 항혈관형성 단백질의 베타-사이트 구조를 재생하기 위해 만들어진 합성 33-아미노산 웨პ티드이다. 앤지넥스는 피브로넥틴 중합을 개시하며, 혈장 피브로넥틴이 없는 마우스에서 비활성화하다는 것이 밝혀졌다(문헌[Akerman, ME, Pilch, J, Peters, D, and Ruoslahti, E; Angiostatic peptides use plasma fibronectin to home to angiogenic vasculature, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2005, 102, 2040-2045]). 한 연구에서, 마우스에서 FN의 D-갈اكتозamin(GalN)/리포다당질(LPS)-유도된 전격성 간경화에 대한 효과를 조사했다. 그 결과, FN은 NF-kappaB 활성화의 억제에 관여된 메커니즘에 의해 GalN/LPS-유도된 간경화에 대해 보호하고, 이는 TNF-알파의 하향조절을 유발하며 IL-10의 상향 조절에 관여되고, Bcl-xL의 상승은 GalN/LPS에 의해 야기된 간세포의 세포자멸사를 억제하는 세포자멸사 신호의 차단을 유도한다는 것을 제시한다(문헌[Qiu, Z, Kwon, AH, Tsuji, K, Kamiyama, Y, Okumura, T, and Hirao, Y; Fibronectin prevents D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced lethal hepatic failure in mice, Shock, 2006, 25, 80-87]). 다른 결과는 FN이 인간 폐암 세포 증식을 자극하고 COX-2 유전자 발현 및 PGE2 생성을 유도함으로써 시험관내 세포자멸사를 감소시키는 것으로 나타났다(문헌[Han, S, Sidell, N, Roser-Page, S, and Roman, J; Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2

(COX-2) expression, Int. J Cancer, 2004, 111, 322-331].

[0063] 피브로넥틴(FN)은 기관 형성 및 종양 형성 동안 배타적으로 다른 스플라이싱을 경험하는 것으로 보여졌다. 이러한 스플라이스 변이체인 외부도메인-B(ED-B) FN은 보통 정상 성인 조직에는 없으며, 종양 혈관형성의 마커인 것으로 제안된다(문헌[Khan, ZA, Caurtero, J, Barbin, YP, Chan, BM, Uniyal, S, and Chakrabarti, S; ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma, Exp.Lung Res., 2005, 31, 701-711]). Mhawech 등은 EDB에 대한 양성 염색이 있는 머리 및 목 종양은 환자의 현저히 낮은 총 생존의 추세를 보였다(문헌[Mhawech, P, Dulguerov, P, Assaly, M, Ares, C, and Allal, AS; EB-D fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck, Oral Oncol., 2005, 41, 82-88]).

[0064] 피브로넥틴 발현은 혈관형성 및 혈관생성을 조절하며, 허혈 및 발작에 대한 뇌 조직 반응에 관여한다. 피브로넥틴 유전자 발현은 SWS(Sturge-Weber 증후군) 정상 피부로부터의 섬유아세포의 것과 비교하여 SWS 섬유아세포에서 유의적으로 증가된다($p < 0.05$)(문헌[Comi, AM, Hunt, P, Vawter, MP, Pardo, CA, Becker, KG, and Pevsner, J; Increased fibronectin expression in sturge-weber syndrome fibroblasts and brain tissue,, Pediatr. Res., 2003, 53, 762-769]). 피브로넥틴 농축은 양성 난소 종양 및 정상 난소에 비해 난소암에서 유의적으로 더 높다. 피브로넥틴 농축은 재발이 없는 난소암 환자에 비해 재발 질병이 있는 난소암 환자에게서 유의적으로 상승된다. 종양 유래된 matriolytic 효소 및 피브로넥틴의 발현은 난소 종양의 성장에 중요하다(문헌[Demeter, A, Szirmai, K, Olah, J, Papp, Z, and Jeney, A; Elevated expression of matrix metalloproteinase-9, and fibronectin concentration in recurrent epithelial ovarian cancer, Orv. Hetil., 2004, 145, 1617-1624]). FN이 연구에서 분석된 1,176개의 유전자 중에서 유의적으로 하향 조절된 두 개의 유전자 중 하나라는 사실은 FN이 유방암에서 중요한 전이 억제 유전자로서 거동할 수 있다는 가정을 강조한다(문헌[Urtreger, AJ, Werbajh, SE, Verrecchia, F, Mauviel, A, Puricelli, LI, Kornblitht, AR, and Bal de Kier Joffe ED; Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential, Oncol. Rep., 2006, 16, 1403-1410]).

[0065] 한 보고서에서, 3개의 가용성 피브로넥틴 웹티드(RGD, CS-1, 및 FN-C/H-V)가 폐 섬유아세포에서 세포자멸사를 유도함을 발견하였다. 세포자멸사는 접착의 방해에 의해 일어났다(아노이키스). 섬유아세포 세포자멸사를 촉진시키기 위한 작은 피브로넥틴 웹티드의 용도는 가능한 항 섬유화 치료로서 추가의 연구를 보증한다(문헌[Hadden, HL and Henke, CA; Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides, Am.J Respir.Crit Care Med, 2000, 162, 1553-1560]). 다른 연구는 피브로넥틴(FN)이 인간 비-소 세포 폐암(NSCLC) 세포 증식을 자극한다고 입증하였다. 이것은 FN이 NSCLC 세포에서 MMP-9 단백질, mRNA 발현, 및 젤라틴용해성 활성을 증가시킴을 보였다(문헌[Han, S, Ritzenthaler, JD, Sitaraman, SV, and Roman, J; Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3- kinase pathways in human lung carcinoma cells. J Biol Chem., 2006, 281, 29614-29624]). 한 연구에서, 비타민 D(VD) 화합물의 종양-억제 효과가 세포 접착성을 좌우하는 메커니즘에 의해 또한 매개되는지를 조사했다. FN에 대한 작은 간접 RNA의 도입은 FN 발현의 하향조절을 일으켰고, 콜라겐-유형 I 매트릭스에의 세포 접착성을 감소시켰다. 이러한 발견은 FN의 갑상선암 세포 접착성의 조절 및, 적어도 부분적으로 종양 세포 성장의 VD 작용의 매개에서의 중요성을 강조한다(문헌[Liu, W, Asa, SL, and Ezzat, S; 1alpha,25- Dihydroxyvitamin D3 targets PTEN-dependent fibronectin expression to restore thyroid cancer cell adhesiveness, Mol. Endocrinol., 2005, 19, 2349-2357]).

[0066] 종양-관련 FN 동형의 생성은 치료제의 종양 환경으로의 선택적인 전달을 위해 사용될 수 있는 특이적 리간드(예를 들면, 항체)의 개발을 허용한다. FN은 FN과 인테그린 및 세포 표면 상의 다른 수용체와의 상호 작용을 차단하는 억제 분자의 개발과 리간드를 기반으로한 표적화된 시각화 및 치료적 전략의 개발 둘 다를 위해, 생체분자 생체분자의 중재에 대한 표적으로서 사용된다(문헌[Kaspar, M, Zardi, L, and Neri, D; Fibronectin as target for tumour therapy, Int. J Cancer, 2005, 118, 1331-1339]). 한 연구는 CH50으로서 지정된 FN의 재조합 CBD-HepII의 폴리펩티드의 생체내 발현에 의한 치료가 종양 성장, 종양 침입 및 혈관형성을 강하게 억제했음을 입증하였다. CH50에 의한 유전자 치료는 간에서 간암을 가지고 있는 마우스의 생존을 연장했을 뿐 아니라, 지라에 있는 종양의 성장 및 침투 능력 및 간으로의 전이를 억제했다. 이러한 발견과 함께, 간암의 유전자 치료에서 CH50의 예상되는 유용성을 시사한다(문헌[Liu, Y, Huang, B, Yuan, Y, Gong, W, Xiao, H, Li, D, Yu, ZR, Wu, FH, Zhang, GM, and Feng, ZH; Inhibition of hepatocarcinoma and tumour metastasis to liver by gene therapy with recombinant CBD-HepII polypeptide of fibronectin, Int. J Cancer, 2007 121 (1) 184-92]). 피브로넥틴(FN)은 세포외 매트릭스에 대한 세포 접착에 반대되는 암호 기능적 부위(14번째 유형 III 반복에 있

는 YTIYVIAL 서열)를 갖는다. FNIII14라는 용어를 가진 상기 부위를 포함하는 22-mer FN 팝티드는 인테그린에의 결합없이 베타1 인테그린-매개된 접착을 억제한다. 이 연구는 FNIII14가 림프종 세포 전이를 방해할 수 있는 가능성이 있다고 보여준다(문헌[Kato, R, Ishikawa, T, Kamiya, S, Oguma, F, Ueki, M, Goto, S, Nakamura, H, Katayama, T, and Fukai, F; A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin, Clin Cancer Res., 2002, 8, 2455-2462]).

[0067] 표피 성장 인자 수용체(EGFR)

[0068] EGFR은 정상 세포 증식, 분화 및 생존의 조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 이유로, EGFR 상태는 인간 종양 유형의 범위에서 종종 변경되며, 일반적으로 불량한 진단과 연결된다. 종양 세포에서, 그것은 다양한 다른 경로를 통해 성장 및 생존에 기여한다(문헌[Maehama, T and Dixon, JE; The tumour suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, J Biol Chem., 1998, 273, 13375-13378]). EGFR 이상은 아교모세포종에서 가장 흔한 문자 이상 중 하나이다(문헌[Zawrocki, A and Biernat, W; Epidermal growth factor receptor in glioblastoma, Folia Neuropathol., 2005, 43, 123-132]).

[0069] EGFR 증폭 및 mRNA 과발현은 성상세포 기원의 고 등급 신경교종에서 빈번하며, 항상 증가된 EGFR 단백질 수준과 매우 관련된다(문헌[Wong, AJ, Bigner, SH, Bigner, DD, Kinzler, KW, Hamilton, SR, and Vogelstein, B; Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84, 6899-6903; Chaffanet, M, Chauvin, C, Laine, M, Berger, F, Chedin, M, Rost, N, Nissou, MF, and Benabid, AL; EGF receptor amplification and expression in human brain tumours, 1992, Eur. J Cancer, 28, 11-17]). 유전자 증폭없는 단백질 과발현은 27% 이하의 GBM에서 보고되었으나, 덜 악성인 성상세포종 및 펩 돌기 신경 교종은 우선적인 유전자 증폭없이 EGFR 과발현을 입증하기 위해 또한 보고되었다(문헌[Reifenberger, J, Reifenberger, G, Ichimura, K, Schmidt, EE, Wechsler, W, and Collins, VP; Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumours, Am. J Pathol., 1996, 149, 29-35]).

[0070] 뇌 종양의 EGFR 증폭/과발현의 진단성 암시는 논의의 여지가 있다. 몇몇 저자들은 EGFR 증폭/과발현의 환자의 생존에 대한 어떠한 효과도 찾지 못했지만(문헌[Olson, JJ, Barnett, D, Yang, J, Assietti, R, Cotsonis, G, and James, CD; Gene amplification as a prognostic factor in primary brain tumours, Clin Cancer Res., 1998, 4, 215-222; Newcomb, EW, Cohen, H, Lee, SR, Bhalla, SK, Bloom, J, Hayes, RL, and Miller, DC; Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes, Brain Pathol., 1998, 8, 655-667; Waha, A, Baumann, A, Wolf, HK, Fimmers, R, Neumann, J, Kindermann, D, Astrahantseff, K, Blumcke, I, von, DA, and Schlegel, U; Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas, J Neurosurg., 1996, 85, 634-641]), 다른 저자들은 이 변경이 음성적 진단성 인자라고 결론내렸다(문헌[Etienne, MC, Formento, JL, Lebrun-Frenay, C, Gioanni, J, Chatel, M, Paquis, P, Bernard, C, Courdi, A, Bensadoun, RJ, Pignol, JP, Francoual, M, Grellier, P, Frenay, M, and Milano, G; Epidermal growth factor receptor and labelling index are independent prognostic factors in glial tumour outcome, Clin Cancer Res., 1998, 4, 2383-2390; Jaros, E, Perry, RH, Adam, L, Kelly, PJ, Crawford, PJ, Kalbag, RM, Mendelow, AD, Sengupta, RP, and Pearson, AD; Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours, Br. J Cancer, 1992, 66, 373-385; Schlegel, J, Merdes, A, Stumm, G, Albert, FK, Forsting, M, Hynes, N, and Kiessling, M; Amplification of the epidermal-growth-factor- receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma, Int. J Cancer, 1994, 56, 72-77; Zhu, A, Shaeffer, J, Leslie, S, KoIm, P, and El-Mahdi, AM; Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumours given definitive irradiation, Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1996, 34, 809-815]).

[0071] 암 세포에 대한 EGFR 분자로의 치료 접근 방법이 몇몇 존재한다. 가장 많이 연구된 것은: 무구 항체, 또는 독성, 리포솜 또는 핵종과 결합된 항체에 의한 특이적 항체 치료, 및 수용체 타이로신 키나아제의 억제제의 사용. EGFRwt에 대해 지향하는 몇가지 유형의 단일 클론 항체가 존재한다. 그들의 사용은 리간드(세특 시맙)에 대한 수용체로의 접근 및/또는 수용체(ABX-EGF)의 빠른 내재화를 차단한다(문헌[Sridhar, SS, Seymour, L, and Shepherd, FA; Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer, Lancet Oncol., 2003, 4, 397-406]). 정상 세포의 표면에 EGFRwt가

생김에 따라, 부작용이 그 사용을 제한할 수 있다.

- [0072] EGFR은 발현 수준이 감소된 생존과 관련된 머리 및 목 편평 세포 암종(HNSCC)에서 과발현된다. EGFR을 차단하는 치료는 임상 실험에서 제한된 효율성을 보였고, 표준 치료와 조합되었을 때 기본적이었다. EGFRvIII는 향상된 성장 및 암생형 EGFR의 표적화의 저항에 기여하는 HNSCC에서 발현된다. EGFR 표적화 전략의 항종양 효율성은 EGFRvIII-특이적 차단의 첨가에 의해 향상될 수 있다(문헌[Sok, JC, Cappelli, FM, Thomas, SM, Lango, MN, Xi, S, Hunt, JL, Freilino, ML, Graner, MW, Wikstrand, CJ, Bigner, DD, Gooding, WE, Furnari, FB, and Grandis, JR; Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting, Clin Cancer Res., 2006, 12, 5064-5073]).
- [0073] 다른 전략은 아교모세포종 세포 및 EGF 수용체를 과발현시키는 다른 암세포들의 사멸을 선택적으로 유도하는 것이다. EGF 수용체에 거주하는 비 바이러스성 전달 백터, 합성 항-증식 dsRNA(폴리이노신-시토신[폴리 IC]), 세포자멸사의 강한 활성제를 사용하는 것은 선택적으로 암 세포에 대한 표적이되었다. EGFR-표적화된 폴리 IC는 시험관내 및 생체내 표적 세포들에서 빠른 세포자멸사를 유도했다. EGFR-표적화된 폴리 IC의 종양 전달은 정상 뇌 조직에 대한 명백한 부정적 독성 효과없이 누드 마우스에서 미리획립된 두개내 종양의 완전한 퇴화를 유도했다. 치료 완료 1년 후, 치료된 마우스는 암이 없이 건강하게 살아남았다(문헌[Shir, A, Ogris, M, Wagner, E, and Levitzki, A; EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumours in mice, PLoS. Med, 2006 Jan; 3(1):e6. Epub 2005 Dec 6]).
- [0074] 작은 간섭 RNA(siRNA)의 투여는 유전자 발현을 조정하기 위한 효과적이고 매우 특이적인 도구가 되었고, 광범위한 종양 유전자가 성공적으로 금지되었다. EGFR의 siRNA-매개된 하향 조절은 상이한 EGFR 발현 수준을 갖는 2개의 확립된 신경교종 세포주(U373 MG, LN18)에서 나타났다. EGFR mRNA 및 단백질의 발현은 70 내지 90% 만큼 하향조절되었다. 그러나, siRNA 치료는 세포 증식, 이동 및 EGFR-연결된 신호 단계적 반응의 활성화 상태에 대해 어떠한 억제 효과도 갖지 않았다. 이 결과에 따르면, 마이크로어레이를 사용한 유전자 발현 분석은 비록 특이적지만 단지 작은 발현 패턴의 변화를 밝혀냈다. 결론은, 이러한 자료는 EGFR의 특이적 하향조절은 악성 신경교종의 단독 시약 치료 접근으로 충분하지 않을 수 있음을 가리킨다(문헌[Vollmann, A, Vornlocher, HP, Stempfle, T, Brockhoff, G, Apfel, R, and Bogdahn, U; Effective silencing of EGFR with RNAi demonstrates non-EGFR dependent proliferation of glioma cells, Int. J Oncol., 2006, 28, 1531-1542]).
- [0075] 가능성 있는 결과를 보여주는 여러 임상 연구가 수행되었다. 예를 들면:
- [0076] h-R3은 고 친화성을 갖는 EGFR 외부 도메인을 인식하고 타이로신 키나아제 활성화를 억제하는 인간화된 단일클론의 항체이다. 새로 진단된 고 등급 신경교종 환자들의 h-R3의 안정성, 면역원성 및 예비 효능을 진단하기 위해, 기 I/II 시험이 수행되었다(문헌[(Ramos, TC, Figueiredo, J, Catala, M, Gonzalez, S, Selva, JC, Cruz, TM, Toledo, C, Silva, S, Pestano, Y, Ramos, M, Leonard, I, Torres, O, Marinello, P, Perez, R, and Lage, A; Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial, Cancer Biol Ther., 2006, 5, 375-379]).
- [0077] EKB-569는 항암제로서 개발되고 있는 상피 성장 인자 수용체(EGFR)의 강력하고, 저 분자량이고, 선택적이고, 비가역적인 억제제이다. 기 1, 투여량-증가 연구는 일본 환자에게서 수행되었다. RECIST 기준에 따라, 그들은 안정적인 질병이지만 방사선 종양 퇴행이 발견되었다(문헌[Yoshimura, N, Kudoh, S, Kimura, T, Mitsuoka, S, Matsuura, K, Hirata, K, Matsui, K, Negoro, S, Nakagawa, K, and Fukuoka, M; EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib, Lung Cancer, 2006, 51, 363-368]).
- [0078] 게피티닙, 상피 성장 인자 수용체(EGFR)-관련된 타이로신 키나아제의 특이적 억제제는 전통적인 화학요법에 실패한 비-소 세포 폐암(NSCLC) 환자의 하위 집단에서 효과를 보였다. 이것은 또한 NSCLC로부터의 뇌 전이에서 항종양 효과가 있는 것으로 보고되었다. 또한, EGFR 돌연변이는 NSCLC에 대한 게피티닙 민감성과 매우 관련이 있는 것으로 보여졌다. NSCLC로부터의 뇌 전이에서 게피티닙의 효과는 평가되었고, 이 효과와 EGFR 돌연변이의 관련이 분석되었다. 게피티닙은 환자의 하위 집단에서 뇌 전이를 치료하는데 효과적인 것으로 보인다. 자료는 뇌 전이의 치료에서 게피티닙의 효과와 EGFR 돌연변이에 관계가 있을 수 있다고 시사했다(문헌[Shimato, S, Mitsudomi, T, Kosaka, T, Yatabe, Y, Wakabayashi, T, Mizuno, M, Nakahara, N, Hatano, H, Natsume, A, Ishii, D, and Yoshida, J; 2006, EGFR mutations in patients with brain metastases from lung cancer: association with the efficacy of gefitinib, Neuro. Oncol., 8, 137-144]).

[0079] 키틴 분해 효소 3-유사 2 (CHI3L2)

[0080] CHI3L2는 원래 연골 세포에서 식별되었다. 그것은 류마티스 관절염에서 표적 항원으로서 자주 설명되었다. 암과 CHI3L2의 관계는 확인되지 않았다. 키틴 분해 효소 3-유사 단백질은 섬유아 세포같은 인간 결합 조직 세포의 증식을 세포외 신호-조절된 키나아제 및 PKB-매개된 신호 경로를 활성화시킴으로써 자극하는 것으로 암시했다(문헌[(Recklies AD, White C, Ling H; The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways; Biochem J. 2002; 365:119-126]). 마우스에서 키틴 분해 효소 3-유사 단백질은 헬리코박터-유도된 위암 모델에서 강하게 상향조절되는 것으로 밝혀졌다(문헌[Takaishi S, Wang TC; Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer; Cancer Sci. 2007 (3): 284-293]).

[0081] 더블코르틴과 CaM 키나아제-유사 2(DCAMKL2)

[0082] 미세소관(MT)-결합된 DCX 단백질은 포유류 대뇌 피질의 발달에 필수적인 역할을 한다. DCX와 매우 상동성인 도메인(DC)을 갖는 단백질 키나아제, 더블코르틴 키타아제-2(DCAMKL2)의 식별이 보고되었다. DCAMKL2는 두 개의 도메인이 기능적으로 독립적인 구조로 조작되는, DC 도메인과 관련된 MT 결합 활성 및 키나아제 도메인에 의해 매개된 단백질 키나아제 활성을 갖는다.

[0083] DCAMKL2의 과발현은 MT 세포 골격을 냉-유도된 해중합에 대해 안정화시킨다. DCAMKL2의 자가 인산화는 MT에 대한 친화성을 매우 감소시킨다. DCAMKL2 및 DCX mRNA는 신경 시스템-특이적이고, 대뇌 피질의 적층 기간 동안 발현된다. DCX는 출생 후 하향조절되지만, DCAMKL2는 성인기까지 풍부하게 유지되며, 이는 DC 서열이 성숙한 신경계에서 이전에 인식되지 못했던 기능을 갖는다는 것을 시사한다. 교감 뉴런에서, DCAMKL2는 세포체 및 축삭과 수지상의 말단 분절에 위치한다.

[0084] DCAMKL2는 신경 성장 콘의 주변에서 MT 역학의 가역 조절을 위한 인산화-의존적 스위치를 나타낼 수 있다. DCAMKL2의 발현, 기능적인 활성, 조절 및 국소화의 패턴은 신경 발달에 중요한 사건 및 가능하게는 성숙한 신경계의 특징에서 DC 유전자 과(DC 도메인-암호화 유전자)의 다른 일원과 동시에, 또는 협력하여 작용한다는 것을 시사한다. DCAMKL2는 두 개의 기능적이고 독립적인 도메인, MT-결합 및 -안정화 도메인(DC 서열), 및 단백질 포스포트란스페라아제 활성을 갖는 키나아제 도메인으로 구성되어 있다.

[0085] DC 서열이 세포외 신호 및 세포내 신호를 MT 역학의 변화로 형질도입하는데 중요한 역할을 하는 것으로 제안되었다. 특히, 인산화에 의해 조절되는 방식으로 MT와 상호작용하고, MT가 역학적으로 불안정한 영역인 축삭 및 수지상의 말단 분절에 위치하는 능력을 기반으로, DCAMKL2는 신경 신호 사건에 대해 반응하여 발생하는 급속한 세포 골격 재배열의 잠재적인 후보 매개자로서 간주되어야 한다(문헌[Edelman, AM, Kim, WY, Higgins, D, Goldstein, EG, Oberdoerster, M, and Sigurdson, W; Doublecortin kinase-2, a novel doublecortin-related protein kinase associated with terminal segments of axons and dendrites, J Biol Chem., 2005, 280, 8531-8543]).

[0086] ATP-민감한 내부 정류기 칼륨 채널 10(KCNJ10)

[0087] 내부 정류 칼륨 채널(Kir)의 주요 기능은 신경교세포의 특징적인 생리학적 성질인, 선택적 신경교세포 막 및 강한 음성 휴면 막 전위(RMP)의 고 칼륨 (K^+) 선택성을 확립하는 것이다. Kir의 고전적인 성질은 K^+ 가 RMP가 K^+ ($E(K)$)에 대한 평형 전위에 대해 음성인 경우 내부로 흐르지만, 더 양성인 전위에서는 외부 전류가 억제된다는 것이다. CNS 신경교세포의 특징은 신경교세포 막에서의 주요 K^+ 전도성이며 신경교세포 RMP를 설정하는데 중요한 역할을 하는 KCNJ10 아형의 특이적 발현이다. 따라서, Kir 및 특히 KCNJ10은 신경 흥분 및 축삭 전도를 결정하는 신경교세포 기능의 주요 조절이다(문헌[Butt, AM and Kalsi, A; Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions, J Cell Mol. Med, 2006, 10, 33-44]).

[0088] 성상 세포의 감소된 칼륨 및 글루타민산염 완충 능력은 신경의 과민성 및 비정상 시냅스 전송을 야기한다. KCNJ10 채널은 피질 성상 세포의 상당한 과분극화에 주로 책임이 있으며, 칼륨 완충에서 중요한 역할을 할 수도 있다. KCNJ10이 녹다운된 성상 세포에서 글루타민산염 제거의 상당한 억제는 이 과정에서의 막 과분극화의 역할을 강조한다(문헌[Kucheryavykh, YV, Kucheryavykh, LY, Nichols, CG, Maldonado, HM, Baksi, K, Reichenbach, A, Skatchkov, SN, and Eaton, MJ; Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical

astrocytes, Glia 2006, 55 (3), 274 – 281]).

- [0089] 중주신경계에서의 세포외 K(+)의 KCNJ10의 공간적 완충은 KCNJ10가 신경교 세포의 표면에 일정하지 않게 분포되어 있기 때문에 단지 수행될 수 있다. 다양한 인간 뇌 종양(낮은 등급 및 높은 등급의 성상 세포종 및 웨들러 신경 교종)에서 KCNJ10의 비정상적 위치가 관찰되었으며, 이는 신경교 세포의 완충 능력이 손상되어, 물 유입을 초래한다(세포독성 부종)(문헌[Warth, A, Mittelbronn, M, and Wolburg, H; Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumours, Acta Neuropathol. (Ber), 2005, 109, 418-426]). KCNJ10은 또한 손상된 뇌에서의 성상 세포에서 상향조절된다. 다음의 가설이 제안되었다: 성상 세포에서는, 정상적인 조건하에, AQP4가 물 수송을 KCNJ10 매개된 K⁺ 흡수와 결합시키지만, 병리적인 상태에서는 AQP4가 뇌 부종 유체의 흐름을 촉진하며 KCNJ10은 증가된 세포외 K⁺를 완충한다(문헌[Saadoun, S, Papadopoulos, MC, and Krishna, S; Water transport becomes uncoupled from K⁺ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review, J Clin Pathol., 2003, 56, 972-975]).
- [0090] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"는 예를 들면 웨티드가 주어진 아미노산 서열로 구성된 웨티드와 실질적으로 동일한 방식으로 HLA 분자에 결합할 수 있도록 1 또는 2개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변형된다(예를 들면, 다른 천연 아미노산 잔기의 측쇄 또는 다른 측쇄로 대체시킴으로써) 것을 의미한다. 예를 들면, 웨티드는 HLA-A 또는 -DR과 같은 적당한 MHC 분자와 상호작용하고 결합할 수 있는 능력을 적어도 유지하거나 그렇지 않으면 개선시키고, 본 발명의 양태에서 정의된 아미노산 서열을 함유하는 폴리웨티드를 발현하는 세포를 인식하고 살해할 수 있는 활성화된 CTL을 생성할 수 있는 능력을 적어도 유지하거나 그렇지 않으면 개선시키도록 변형될 수 있다. 데이터베이스로부터 알 수 있듯이, HLA-A 결합 웨티드의 특정 위치는 보통 HLA 결합 그루브의 결합 모티프에 맞춰진 코어 서열을 형성하는 잔기를 고정시킨다.
- [0091] T 세포 수용체와 상호작용하는데 필수적이지 않은 아미노산 잔기는 다른 아미노산에 의해 교체되어 변형될 수 있으며, 그의 혼입은 실질적으로 T 세포 반응성에 영향을 끼치지 않으며 관련된 MHC에의 결합을 제거하지 않는다. 따라서, 주어진 조건 외에, 본 발명의 웨티드는 주어진 아미노산 서열 또는 그의 일부 또는 변이체를 포함하는 임의의 웨티드일 수 있다(이 용어는 올리고웨티드 또는 폴리웨티드를 포함함).
- [0092] MHC 유형 II로 제시된 웨티드에 대해서, 이 웨티드는 특정 HLA-특이적 아미노산 모티프를 갖는 "코어 서열", 및 선택적으로, 코어 서열의 기능을 방해하지 않는(즉, 웨티드 및 천연 대응물을 인식하는 T 세포 클론의 세트 모두 또는 그 일부의 상호작용에 무관한 것으로 여겨짐) N- 및/또는 C-말단 연장부로 구성되어 있다고 알려져 있다. N- 및/또는 C-말단 연장부는, 예를 들면 길이가 각각 1 내지 10개의 아미노산일 수 있다. 이 웨티드들은 MHC 유형 II 분자에 직접적으로 로딩되거나, 서열은 본원의 설명에 따라 벡터로 클로닝될 수 있다. 이 웨티드들이 세포 내 더 큰 웨티드의 처리의 최종적 산물을 구성함에 따라, 더 긴 웨티드들도 사용될 수 있다. 본 발명의 웨티드는 임의의 크기일 수 있으나, 보통 100,000 미만의 분자량, 바람직하게는 50,000 미만, 더욱 바람직하게는 10,000 미만, 전형적으로 약 5,000일 수 있다. 아미노산 잔기의 개수에 대해서, 본 발명의 웨티드는 1000개 미만의 잔기, 바람직하게는 500개 미만의 잔기, 보다 바람직하게는 100개 미만의 잔기를 가질 수 있다. 따라서, 본 발명은 웨티드 또는 변이체의 전체 길이가 8 내지 100개의 아미노산, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 16개, 즉, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 아미노산인 웨티드 및 변이체를 제공한다.
- [0093] 유사하게, 본 발명의 웨티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 천연 또는 인공적인 변이체들은 종종 길이 변이체이다. 이러한 천연 길이 변이체에 대한 예는 각각 서열 식별 번호: 11 및 12, 및 21 및 24로서 표 1에 주어져 있다.
- [0094] 약 12개 아미노산 잔기보다 더 긴 웨티드가 MHC 유형 II 분자에 결합하는 데에 직접 사용되는 경우, 코어 HLA 결합 영역에 인접한 잔기는 웨티드가 MHC 유형 II 분자의 결합 그루브에 특이적으로 결합하거나 CTL에 제시되는 능력에 실질적으로 영향을 주지 않는 것이 바람직하다. 그러나, 앞에서 말한 바처럼, 예를 들면 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 경우, 보다 긴 웨티드가 적당한 항원-제시 세포에 의해 분절될 수 있기 때문에 보다 긴 웨티드가 사용될 수 있는 것으로 인식된다.
- [0095] 또한, 일반적으로 8 내지 10개의 아미노산 길이인 MHC 유형 I 에피톱이 실제 에피톱을 포함하는 보다 긴 웨티드 또는 단백질로부터의 웨티드 프로세싱에 의해 생성되는 것도 가능하다. MHC 유형 II 에피톱과 유사하게, 결합 영역에 인접한 잔기는 웨티드가 MHC 유형 I 분자의 결합 그루브에 특이적으로 결합하거나 CTL에 제시되는 능력에 실질적으로 영향을 주지 않거나, 프로세싱 동안 실제 에피톱을 노출하는데 필요한 단백질 분해 분열을 위한

부위를 가리지 않는 것이 바람직하다.

- [0096] 따라서, 본 발명은 또한 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 16개, 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개의 아미노산의 전체 길이를 갖는 MHC 유형 I 에피톱의 펩티드 및 변이체를 제공한다.
- [0097] 물론, 본 발명에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 주 조직 적합성 복합체(MHC) 유형 I 또는 II의 분자에 결합할 수 있는 능력을 가질 것이다. 펩티드 또는 변이체의 MCH 복합체로의 결합은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면 본 발명의 실시예 4에 기재되어 있는 것들 또는 상이한 MHC 유형 II 대립 유전자에 대한 문헌에 기재되어 있는 방법에 의해 시험될 수 있다(예: 문헌[Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R; Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides; J Immunol. 1994; 153(4):1665-1673; Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A; Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands; J Immunol. 1994; 153(3):1141-1149; Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP; Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11; J Exp Med. 1999; 189(5): 871-876; Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F; Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association; J Exp Med. 1995 181(5):1847-1855; Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE; A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins; J Immunol Methods. 1993; 163(2): 209-216; Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM; 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. 1998 (12):1765-1776]).
- [0098] 특히 바람직한 실험의 실시양태에서, 펩티드는 서열 식별 번호: 1 내지 서열 식별 번호: 29에 따른 아미노산 서열로 이루어지거나 본질적으로 이루어진다.
- [0099] "본질적으로 이루어진다"는 본 발명에 따른 펩티드가 서열 식별 번호: 1 내지 서열 식별 번호: 29에 따른 서열 또는 그의 변이체 이외에 추가적으로 MHC 분자 에피톱에 대한 에피톱으로서 작용하는 펩티드의 형성 부분을 반드시 필요로 하지 않는 N- 및/또는 C-말단에 위치한 아미노산의 스트레치를 함유한다는 것을 의미한다.
- [0100] 그럼에도 불구하고, 이러한 스트레치는 본 발명에 따른 펩티드의 세포로의 효율적인 도입을 제공하기 위해 중요 할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 펩티드는 예를 들면, NCBI, GenBank Accession-number X00497에서 유래된 HLA-DR 항원-결합 불변 쇄(p33, 이하에서는 "Ii")의 80개의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질이다(문헌[Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity EMBO J. 1984, 3 (4), 869-872]).
- [0101] 또한, 펩티드 또는 그의 변이체는 추가로 변형되어 안정성 및/또는 MHC 분자와의 결합성을 향상시킬 수 있고 이는 더 강한 면역 반응을 일으키게 한다. 이렇게 펩티드 서열을 최적화하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 이 방법의 예로서는 역 펩티드 결합 또는 비펩티드 결합의 도입을 들 수 있다.
- [0102] 역 펩티드 결합에서 아미노산 잔기는 펩티드 (-CO-NH-) 연결기에 의해 결합되지 않지만 펩티드 결합이 역전된다. 이런 역-반대(retro-inverse) 펩티드 모방체 물질은 당해 분야에서 알려져 있는 방법, 예를 들면 본 원에서 참고로서 인용되는 문헌[Mezierer et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237]에 기재되어 있는 방법을 사용하여 만들 수 있다. 이 방법은 측쇄의 배향이 아닌 주쇄를 포함한 변화를 함유하는 슈도펩티드를 제조하는 것을 포함한다. Meziere 등(1997)은 MHC 및 T-조력 세포 반응을 위해서 이러한 슈도펩티드가 유용하다는 것을 보여 주었다. CO-NH 펩티드 결합 대신에 NH-CO 결합을 함유하는 역-반대(retro-inverse) 펩티드는 단백 분해에 대한 저항하는 힘이 높다.
- [0103] 비펩티드 결합은, 예를 들면 -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, 및 -CH₂SO-가 있다. 미국 특허 제 4,897,445 호는 표준 절차에 의해 합성된 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 쇄 중의 비펩티드 결합(-CH₂-NH) 및 NaCNBH₃ 존재하에 아미노 알데히드와 아미노산의 반응에 의해 합성된 비펩티드 결합의 고체상 합성 방법을 제공한다.

- [0104] 상기 기재된 서열을 포함하는 웨티드는, 예를 들어 웨티드의 안정성, 생물학적 이용 가능성, 및/또는 친화성이 향상되도록 아미노 및/또는 카르복시 말단에서 추가적인 화학 기로 합성될 수도 있다. 예를 들면, 소수성 기, 예컨대 카보벤족실, 단실, 또는 t-뷰틸옥시카보닐 기가 웨티드의 아미노 말단에 추가될 수도 있다. 마찬가지로, 아세틸 기 또는 9-플루오렌일메톡시-카보닐 기 또한 웨티드의 아미노 말단에 위치할 수 있다. 또한, 소수성 기, t-뷰틸옥시카보닐 또는 아미도 기는 웨티드의 카르복시 말단에 추가될 수 있다.
- [0105] 또한, 본 발명의 웨티드는 입체 배열이 변화도록 합성될 수 있다. 예를 들면, 보통의 L-이성질체보다 오히려, 웨티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 D-이성질체가 사용될 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 웨티드의 아미노산 잔기 중 하나 이상은 잘 알려진 비천연 아미노산 잔기 중 하나로 치환될 수 있다. 이런 변화에 의하여 본 발명의 웨티드의 안정성, 생물학적 이용 가능성, 및/또는 결합 작용을 증가시킬 수 있다.
- [0106] 유사하게, 본 발명의 웨티드 또는 변이체는 특이적 아미노산을 웨티드의 합성 전 또는 후에 반응시킴으로써 변형될 수 있다. 이런 변형의 예는 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 이는 예를 들어 본원에서 참고로서 혼입되는 다음과 같은 문헌에 잘 정리되어 있다(문헌[R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005]). 아미노산의 화학적 변형은 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 아실화(acylation), 아미드화, 리신(lysine)의 피리독실화, 환원성 알킬화, 2,4,6-트라이니트로벤젠 살포산(TNBS)과 아미노 기의 트라이니트로벤질화, 카르복실 기의 아미드의 변형 및 시스테인에서 시스테인산으로의 퍼폼산 산화에 의한 설피드릴 변형, 수은 유도체의 형성, 다른 티올 화합물과 혼합 이황화물의 형성, 말레이미드와의 반응, 요오도아세트산 또는 요오도아세트아미드와의 카르복시메틸화 및 알카라인 pH에서 시안산염과의 카바모일화(Carbamoylation). 이와 관련하여, 단백질의 화학 변형에 관한 더 광범위한 방법에 대하여는 당해 분야의 숙련자는 문헌[Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000)의 Chapter 15]을 참고로 한다.
- [0107] 간략하게, 예를 들어 단백질에서 아르기닐(arginyl) 잔기의 변형은 종종 부가 생성물을 형성하기 위한 페닐글리옥살, 2,3-뷰탄다이온 및 1,2-사이클로헥산다이온과 같은 인접한 다이카보닐 화합물의 반응을 기본으로 한다. 또 다른 예로서는, 메틸글리옥살과 아르기닌(arginine) 잔기의 반응을 들 수 있다. 시스테인은 리신(lysine) 및 히스티딘(histidine)과 같은 다른 친핵성 부위의 부수적인 변형없이도 변형될 수 있다. 결과적으로, 많은 시약이 시스테인의 변형에 이용 가능하다. 특정한 시약에 대한 정보는 피어스 케미칼 컴파니(Pierce Chemical Company) 및 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)와 같은 회사의 웹사이트에서 제공한다.
- [0108] 단백질의 이황화 결합의 선택적인 환원 또한 일반적이다. 이황화 결합은 생물약제의 열 처리 중에 형성되고 산화될 수 있다. 특정한 글루타민산 잔기의 변형에 Woodward's의 시약 K가 사용될 수 있다. N-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N'-에틸카보다이아미드는 리신 잔기와 글루타민산 잔기 사이의 분자내 교차결합 형성하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 다이에틸피로카보네이트는 단백질에서 히스티딜 잔기의 변형을 위한 시약이다. 히스티딘은 또한 4-하이드록시-2-노네날을 이용하여 변형될 수 있다. 예를 들어, 리신 잔기와 다른 알파-아미노 기의 반응은 웨티드의 표면으로의 결합 또는 단백질/웨티드의 교차결합에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜과의 결합 부위 및 단백질의 당화에서 변형의 주요 부위이다. 단백질에서 메티오닌 잔기는, 예를 들어 요오도아세트아미드, 브로모에틸아민, 및 클로라민 T에 의해 변형될 수 있다. 테트라니트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기를 변형하는데 사용될 수 있다. 디타이로신(dityrosine)의 형성에 의한 교차 결합은 과산화수소/구리이온을 이용하여 달성될 수 있다.
- [0109] 트립토판의 변형에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모석신아미드, 2-하이드록시-5-니트로벤질 브로마이드 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐메르캅토)-3H-인돌(BPNS-skatole)이 사용되었다.
- [0110] 치료적인 단백질과 웨티드의 PEG에 의한 성공적인 변형은 종종 순환 반감기를 연장하는 것과 결부되면서, 단백질과 글루타르알데히드, 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트 및 포름알데히드의 교차 결합이 히드로겔의 제조에 사용된다. 면역치료의 알레르겐의 화학 변형은 칼륨 시안산염의 카바모일화에 의해 달성된다.
- [0111] 웨타이드가 변형되거나 비웨티드 결합을 포함하는 웨티드 또는 변이체가 본 발명의 바람직한 실시양태이다.
- [0112] 일반적으로, 웨티드 및 변이체(적어도 아미노산 잔기 사이에 웨티드 결합을 함유하는 것들)는 문헌[Lu et al J. Org. Chem. 1981, 46, 3433] 및 이 문헌에 있는 참고 문헌에 의해 개시된 고체상 웨티드 합성의 Fmoc-폴리아미드 방식에 의해 합성될 수 있다. 일시적인 N-아미노 기의 보호는 9-플루오렌일메틸옥시카보닐(Fmoc) 기에 의해 제공된다. 이렇게 고도로 염기-불안적인 보호기의 반복적인 분열은 N,N-다이메틸포름아미드 중 20% 피페리딘을 사용하여 이루어진다. 측쇄 작용기는 뷰틸 에터(세린 트레오닌 및 티로신의 경우), 뷰틸 에스터(글루탐산 및

아스파르트산의 경우), 뷰틸옥시카보닐 유도체(리신 및 히스티딘의 경우), 트라이틸 유도체(시스테인의 경우) 및 4-메톡시-2,3,6-트라이메틸벤젠설폰일 유도체(아르기닌의 경우)로서 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단의 잔기일 경우, 측쇄 아미도 작용기의 보호를 위해 4,4'-다이메톡시벤즈히드릴 기가 사용된다. 고체상 지지체는 3개의 단량체, 즉 다이메틸아크릴아미드(주쇄-단량체), 비스아크릴로일에틸렌 다이아민(교차 연결기) 및 아크릴로일사르코신 메틸 에스터(작용화제)로 이루어진 폴리메틸-아크릴아미드 중합체를 기반으로 한다. 사용된 웨티드-대-수지 분열성 연결제는 산성-불안정한 4-하이드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 커플링 과정을 매개하는 역 N,N-다이사이클로헥실-카보다이아미드/1-하이드록시벤조트라이아졸을 사용하여 추가되는, 아스파라긴 및 글루타민을 제외한 모든 아미노산 유도체는 그들의 생성된 대칭의 무수물 유도체로서 추가된다. 모든 커플링 및 탈보호 반응은 닉히드린, 트라이니트로벤젠 설폰산 또는 아이소틴 시험 절차를 사용하여 모니터된다. 합성이 완료되면, 50% 스캐빈저 믹스를 포함하는 95% 트라이플루오로아세트산에 의한 처리를 통해 부수적인 측쇄 보호기의 제거와 함께 웨티드는 수지 지지체로부터 분열된다. 통상적으로 사용되는 스캐빈저로는 에탄다이티올, 페놀, 아니솔 및 물이 있고, 정확한 선택은 합성되는 웨티드의 구성 아미노산에 따라 좌우된다. 또한, 웨티드 합성에 있어 고체 상과 액체 상의 조합이 가능하다(예를 들면, 문헌[Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future Curr Pharm Biotechnol. 2004 Feb; 5(1):29-43] 및 이 문헌에 인용된 다른 문헌 참조).

- [0113] 트라이플루오로아세트산은 진공에서 증발에 이어서 조절 웨티드를 제공하는 다이에틸 에터에 의한 분쇄에 의해 제거된다. 존재하는 임의의 스캐빈저는 수성 상의 동결건조시에 스캐빈저가 없는 조절 웨티드를 제공하는 단순한 추출 절차에 의해 제거된다. 웨티드 합성에 필요한 시약들은 보통 영국 엔퀴7 2 큐제이 노팅햄 소재의 칼바이오켐-노바바이오켐(영국) 리미티드(Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd.)에서 입수할 수 있다.
- [0114] 재결정, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피 및 (보통) 예를 들면 아세토니트릴/물 구배 분리를 이용하는 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 기법 중 하나 또는 그의 조합에 의해 정제할 수 있다.
- [0115] 박막 크로마토그래피, 전기 영동법, 특히 모세관 전기 영동법, 고체상 추출법(CSPE), 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 산성 가수 분해 후 아미노산 분석 및 고속 원자 폭격(FAB) 질량 분광 분석, 및 MALDI 및 ESI-Q-TOF 질량 분광 분석을 사용하여 웨티드를 분석할 수도 있다.
- [0116] 본 발명의 추가의 양태는 본 발명의 웨티드 또는 그의 변이체를 암호화하는 핵산(예: 폴리뉴클레오티드)을 제공한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥의 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA, mRNA 및 siRNA 또는 이들의 조합, 또는 폴리뉴클레오티드의 천연 또는 안정화된 형태, 예컨대 포스포로티오에이트 주체를 가진 폴리뉴클레오티드일 수도 있으며, 웨티드를 암호화하는 한 인트론을 함유하거나 함유하지 않을 수도 있다. 물론, 천연 웨티드 결합에 의해 결합된 천연 아미노산 잔기를 함유하는 웨티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 암호화될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 폴리웨티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다.
- [0117] 폴리뉴클레오티드, 특히 DNA를 예를 들면 상보성 접착 말단을 거쳐 벡터로 작동 가능하게 연결하는 여러 가지 방법이 개발되어 왔다. 예를 들어, 상보성 단일중합체 트랙은 DNA 분절에 첨가되어 벡터 DNA에 삽입될 수 있다. 벡터 및 DNA 분절은 상보성 단일중합체 꼬리 사이의 수소 결합에 의해 결합되어 재조합된 DNA분자를 형성한다.
- [0118] 하나 이상의 제한 부위를 함유하는 합성 연결기는 DNA 분절을 벡터로 결합시키는 또 다른 방법을 제공한다. 다양한 제한 엔도뉴클라아제 부위를 함유하는 합성 연결기는 미국 코네티컷주 뉴헤븐 소재의 인터내셔널 바이오테크놀로지스 인코포레이티드(International Biotechnologies Inc)를 비롯한 다양한 공급처로부터 시판된다.
- [0119] 본 발명의 폴리웨티드를 암호화하는 DNA를 변형하는 바람직한 방법은 문헌[Saiki et al(1988), Science 239, 487-491]에 개시된 중합효소 연쇄 반응을 이용한다. 이 방법은, 예를 들면 적당한 제한 부위를 유전공학처리함으로써 DNA를 적합한 벡터로 도입하는데 사용될 수 있으며, 또는 당해 분야에 공지된 다른 유용한 방법에서 DNA를 변형하는데 사용될 수 있다.
- [0120] 바이러스 벡터가 사용되는 경우에는, 폭스- 또는 -아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0121] DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우에는 RNA)는 적당한 숙주에서 발현되어 본 발명의 웨티드 또는 변이체를 포함하는 폴리웨티드를 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 웨티드 또는 변이체를 암호화하는 DNA는 알려진 기법에 따라 사용될 수 있고, 본 발명의 폴리웨티드의 발현 및 생성을 위한 적절한 숙주 세포를 형질전환시키는데

사용되는 발현 벡터를 만들 수 있도록 본원의 교시에 따라 적당히 변형될 수 있다. 이런 기법들은 다음 문헌에서 발표된 기술을 포함하고, 이를 모두는 본원에서 참고로서 인용된다: Rutter 등에 의해 1984년 4월 3일에 발행된 미국 특허 제 4,440,859 호, Weissman에 의해 1985년 7월 23일에 발행된 제 4,530,901 호, Crowl에 의해 1986년 4월 15일에 발행된 제 4,582,800 호, Mark 등에 의해 1987년 6월 30일에 발행된 제 4,677,063 호, Goeddel에 의해 1987년 7월 7일에 발행된 제 4,678,751 호, Itakura 등에 의해 1987년 11월 3일에 발행된 제 4,704,362 호, Murray에 의해 1987년 12월 1일에 발행된 제 4,710,463 호, Toole, Jr. 등에 의해 1988년 7월 12일에 발행된 제 4,757,006 호, Goeddel 등에 의해 1988년 8월 23일에 발행된 제 4,766,075 호, 및 Stalker에 의해 1989년 3월 7일에 발행된 제 4,810,648 호.

- [0122] 본 발명의 화합물을 구성하는 폴리펩티드를 암호화하는 DNA (또는 레트로바이러스 벡터일 경우에는 RNA)는 적당한 숙주로 도입되기 위해 다양한 종류의 다른 DNA 서열과 연결될 수 있다. 동료 DNA는 숙주의 성질, 숙주로 DNA가 도입되는 방법 및 에피솜 유지 또는 통합이 필요한지 여부에 따라 좌우된다.
- [0123] 일반적으로, DNA는 발현을 위해 플라스미드와 같은 발현 벡터로 적절한 배향 및 올바른 리딩 프레임으로 삽입된다. 필요한 경우, DNA는 목적하는 숙주에 의해 인식되는 적절한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있지만, 그러한 조절은 일반적으로 발현 벡터에서 이용 가능하다. 그 후, 벡터는 표준 기법을 통해 숙주로 도입된다. 일반적으로, 숙주 모두가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를 선택하는 것이 필요하다. 하나의 선택 기법은 발현 벡터에 DNA 서열을, 형질전환된 세포에서 선택 가능한 특성(예컨대, 항생제 내성)을 암호화하는 임의의 필요한 제어 요소와 함께 혼입하는 것을 포함한다.
- [0124] 다르게는, 선택 가능한 특성을 가진 유전자는 목적하는 숙주 세포를 공동-형질전환하는 데 사용되는 다른 벡터 상에 있을 수 있다.
- [0125] 본 발명에서 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 충분한 시간 동안 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려진 적절한 조건하에 배양되어 폴리펩티드의 발현을 허용하며, 이는 이어서 회수될 수 있다.
- [0126] 박테리아(예: 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예: 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예: 아스페길러스(*Aspergillus*), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함한 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직한 체계는 ATCC Cell Biology Collection에서 입수할 수 있는 직장결장암 또는 신경교아세포종 세포와 같은 포유류 세포일 수 있다.
- [0127] 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 pSVL이고, 이는 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 파마시아(Pharmacia)로부터 입수될 수 있다. 유도성 포유류 발현 벡터의 한 예로는 pMSG를 들 수 있고, 이는 역시 파마시아로부터 입수할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터로는 pRS403-406 및 pRS413-416을 들 수 있고, 이는 보통 미국 캘리포니아주 92037 라 졸라 소재의 스트라타진 클로닝 시스템스(Stratagene Cloning Systems)로부터 입수할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효모 통합 플라스미드(YIp)이며, 이는 효모 선택성 마커 HIS3, TRP1, LEU2 및 URA3를 혼입한다. 플라스미드 pRS413-416은 효모 중심 플라스미드(Ycp)이다. 여러 종류의 숙주 세포와 함께 사용하기 위한 다른 벡터 및 발현 체계는 당해 분야에서 잘 알려져 있다.
- [0128] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구조물로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 박테리아 세포는 몇몇 환경에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있고, 전형적으로 미국 메릴랜드주 베테스다 소재의 베테스타 리서치 래보레이토리즈 인코포레이티드(Bethesda Research Laboratories Inc.)로부터 입수되는 에스케리치아 콜라이 균주 DH 5 및 미국 메릴랜드주 락빌 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection (ATCC))으로부터 입수되는 RRI(No ATCC 31343)와 같은 에스케리치아 콜라이 균주이다. 바람직한 진핵 숙주 세포로는 효모, 곤충 및 포유류 세포, 바람직하게는 척추 동물 세포, 애컨대 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간 섬유아 세포 및 대장 세포주로부터의 척추 동물 세포가 있다. 효모 숙주 세포는 미국 캘리포니아주 92037 라 졸라 소재의 스트라타진 클로닝 시스템스로부터 일반적으로 입수되는 YPH499, YPH500 및 YPH501을 포함한다. 바람직한 포유류 숙주 세포로는 CCL61로서 ATCC로부터 입수되는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, CRL 1658로서 ATCC로부터 입수되는 NIH 스위스 마우스 배아 세포 NIH/3T3, 인간 배아 신장 세포인 CRL 1650 및 293 세포로서 ATCC로부터 입수되는 원숭이 신장-유도된 COS-1 세포를 포함한다. 바람직한 곤충 세포는 바콜로바이러스 발현 벡터로 형질감염될 수 있는 Sf9 세포가 있다.
- [0129] 본 발명의 DNA 구조물을 이용한 적당한 세포 숙주의 형질전환은 전형적으로 사용되는 벡터의 유형에 좌우되는 공지된 방법에 의해 이루어진다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 관해서는, 문헌[Cohen et al 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. 효모 세포의 형질전환에 관한 내용은 문헌[Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY.]에 기재된다. 문헌[The method of Beggs (1978) Nature 275, 104-109]도 역시 유용하다. 척추 동물 세포에 관해서, 이런 세포들을 형질감염하는데 유용한 시약, 예를 들어 인산칼슘 및 DEAE-덱스트란 또는 리포좀 배합은 스트라타진 클로닝 시스템스, 또는 미국 메릴랜드주 20877 게이터스부르그 소재의 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(Life Technologies Inc.)로부터 입수 가능하다. 전기연동법은 또한 세포를 형질전환 및/또는 형질감염 할 시에 유용하며 이는 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 및 척추 동물 세포들을 형질전환하는 분야에 잘 알려져 있다.

- [0130] 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 발명의 DNA 구조물을 함유하는 세포는 공지된 기법, 예컨대 PCR에 의해 식별될 수 있다. 다르게는, 항체를 이용하여 상정액(supernatant)에 존재하는 단백질을 검출할 수 있다.
- [0131] 본 발명의 특정한 숙주 세포(박테리아, 효모 및 곤충 세포)는 본 발명의 펩티드 제조에 유용하다는 것을 인식할 것이다. 그러나, 다른 숙주 세포들도 특정한 치료 방법에서 유용할 수도 있다. 예를 들면, 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포는 적당한 MHC 분자에 펩티드가 로딩되게 하여 본 발명의 펩티드를 발현하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 발현 백터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0132] 바람직한 실시양태에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이고, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 프로스 타트산 포스파타제(PAP)을 함유한 재조합 응합 단백질로 로딩된 APC는 현재 전립선 암 치료를 위해 연구중이다 (Sipuleucel-T)(문헌[Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM.; Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; J Clin Oncol. 2006; 24(19):3089-3094; Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ; 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. 2006; 107(1):67-74]).
- [0133] 본 발명의 추가의 양태는 펩티드 또는 그의 변이체들을 생성하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 숙주 세포 배양 단계 및 펩티드를 숙주 세포 또는 그의 배양 배지에서 단리하는 단계를 포함한다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 펩티드, 핵산 또는 발현 백터는 약제에 사용된다. 예를 들면, 펩티드 또는 그의 변이체는 정맥 주사(i.v.), 피하 주사(s.c.), 피내 주사(i.d.), 복막내 주사(i.p.), 근육내(i.m.) 주사 등을 위해 제조될 수 있다. 펩티드 주사의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m., 및 i.v이다. DNA 주사의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v이다. 펩티드 또는 DNA의 투여량은 50 µg 내지 5 mg이며, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg이며, 이는 각각의 펩티드 또는 DNA에 좌우된다. 이러한 범위의 투여량은 성공적으로 이전 실험에서 사용된 바 있다(문헌[Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G; Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12): 1553-1564; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Abstract No 3017]).
- [0135] 본 발명의 중요한 양태는 활성화된 CTL을 생성하는 시험관내 방법이다. 상기 방법은 시험관내 CTL과, 항원 특이적 방식으로 CTL을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 적합한 항원 제시 세포의 표면에서 발현된 항원 로딩된 인간 유형 I 또는 II MHC 분자를 접촉시킴을 포함한다. 항원은 본 발명에 따른 펩티드이다. 바람직하게는, 항원 제시 세포와 함께 충분한 양의 항원이 사용된다.
- [0136] MHC 유형 II 에피톱이 항원으로서 사용되는 경우, CTL은 CD4 양성 조력 세포이고, 바람직하게는 T_{H1}-유형이다. MHC 유형 II 분자는 적당한 임의의 세포의 표면에서 발현될 수 있고, 바람직한 세포는 천연적으로 MHC 유형 II 분자를 발현하지 않는다(이 경우 세포는 형질감염되어 상기 분자를 발현한다). 다르게는, 세포가 천연적으로 MHC 유형 II 분자를 발현하는 경우, 세포는 항원-프로세싱 또는 항원 제시 경로에서 결합이 있다. 이러한 방식으로, CTL을 활성화하기 전에 MHC 유형 II 분자를 발현하는 세포는 선택된 펩티드 항원에 의해 실질적으로 완전하게 감작될 수 있다.
- [0137] 항원 제시 세포(또는 자극 세포)는 전형적으로 MHC 유형 II 분자를 그 표면에 가지며, 바람직하게는 그 자체로

선택된 항원으로 MHC 유형 II을 실질적으로 로딩할 수 없다. MHC 유형 II 분자는 선택된 항원으로 용이하게 시험관내에서 로딩될 수 있다.

- [0138] 바람직하게는, 포유류 세포는 TAP 펩티드 전달체의 기능이 없거나 또는 낮은 수준으로 갖거나 또는 감소된 기능을 갖는다. TAP 펩티드 전달체가 결여된 적당한 세포는 T2, RMA-S 및 드로소필라 세포를 포함한다. TAP은 항원 프로세싱과 관련된 전달체(Transporter associated with Antigen Processing)의 약어이다.
- [0139] 인간 펩티드 로딩 결합 세포주 T2는 제품 번호 CRL 1992로서 미국 메릴랜드주 20852 럭스빌 파크라운 드라이브 12301 소재의 어메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection)에서 입수되고, 드로소필라 세포주 쉬네이더주(Schneider line) 2는 제품 번호 CRL 19863으로서 ATCC로부터 입수되고, 마우스 RMA-S 세포주는 문헌[Karre and Ljunggren (1985) J. Exp. Med. 162, 1745]에 기재되어 있다.
- [0140] 숙주 세포가 MHC 유형 I 분자를 형질감염 전에 발현하지 않는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 자극 세포는 T-세포 동시자극에 이서 중요한 분자, 예컨대 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3을 발현한다.
- [0141] 많은 MHC 유형 II 분자 및 동시자극 분자의 핵산 서열은 GenBank 및 EMBL 데이터베이스로부터 공개적으로 입수 가능하다.
- [0142] 유사하게, 항원으로서 사용되는 MHC 유형 I 에피톱의 경우, CTL은 CD8 양성조력 세포이다. MHC 유형 I 분자는 임의의 적당한 세포의 표면에서 발현될 수 있고, 세포가 천연적으로 MHC 유형 I 분자를 발현하지 않는 것이 바람직하다(이 경우 세포는 형질감염되어 상기 분자를 발현한다). 다르게는, 세포가 천연적으로 MHC 유형 I 분자를 발현하는 경우에는, 항원-프로세싱 또는 항원 제시 경로에서 이가 결함이 있다. 이러한 방식으로, CTL을 활성화하기 전에 MHC 유형 I 분자를 발현하는 세포는 선택된 펩티드 항원으로 실질적으로 완전하게 감작될 수 있다.
- [0143] 항원 제시 세포가 이러한 에피톱을 발현하도록 형질감염되는 경우, 바람직하게는 세포는 서열 식별 번호: 1 내지 서열 식별 번호: 29를 포함한 펩티드 또는 그의 아미노산 서열 변이체를 발현할 수 있는 발현 백터를 포함한다.
- [0144] 여러 가지의 다른 방법이 CTL을 시험관내에서 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Peoples et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 432-436와 Kawakami et al (1992) J. Immunol. 148, 638-643]에 기재된 방법은 자가조직 종양-침투 림프구를 이용하여 CTL을 생성한다. 문헌[Plebanski et al (1995) Eur. J. Immunol. 25, 1783-1787]은 자가 말초 혈액 림프구(PLB)를 이용하여 CTL을 제조한다. 문헌[Jochmus et al (1997) J. Gen. Virol. 78, 1689-1695]은 수지상 세포를 펩티드 또는 폴리펩티드를 펠스하여 이용하거나, 재조합 바이러스를 이용하여 감염시킴으로써 자가 CTL을 생성하는 것으로 기재한다. 문헌[Hill et al (1995) J. Exp. Med. 181, 2221-2228 및 Jerome et al (1993) J. Immunol. 151, 1654-1662]은 B 세포를 이용하여 자가 CTL을 생성한다. 추가적으로, 펩티드 또는 폴리펩티드와 함께 펠스된 또는 재조합 바이러스에 의해 감염된 대식세포는 자가 CTL을 제조하는 데에 사용할 수 있다. 문헌[S. Walter 등 (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T-cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15; 171 (10):4974-8)]은 인공 항원 제시 세포를 사용하여 시험관내 T 세포의 감작에 대해 기재하고, 이는 선택된 펩티드에 대한 T 세포를 생성하는데 적당한 방법이다.
- [0145] 동종이형 세포가 CTL을 제조하는데 또한 사용될 수 있으며, 이의 방법은 본원에서 참고로서 인용되는 국제 특허 출원 공개 제 97/26328 호에 기재되어 있다. 예를 들어, 드로소필라 세포 및 T2 세포 외에도, CHO 세포, 바클로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효모, 백시니아-감염된 표적 세포 등을 포함한 다른 세포들 또한 항원을 제시하는 데 사용될 수 있다. 또한, 식물 바이러스가 사용될 수 있으며(예를 들면 문헌[Porta Virology, 1994, 202, 449-955] 참고), 이는 외래 펩티드를 제시하기 위한 고수율 시스템으로서 동부콩 모자이크(cowpea mosaic) 바이러스의 개발을 기재한다.
- [0146] 본 발명의 펩티드에 대해 지향되는 활성화된 CTL은 치료에 유용하다. 따라서, 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의해 수득될 수 있는 활성화된 CTL을 제공한다.
- [0147] 상기 방법에 의해 생성된 활성화된 CTL은 서열 식별 번호: 1 내지 서열 식별 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 세포를 선택적으로 인식할 것이다.
- [0148] 바람직하게는, CTL은 TCR을 통해 HLA/펩티드 복합체와 상호 작용(예를 들어 결합)함으로써 세포를 인식한다.

환자에서 CTL은 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 표적 세포를 사멸시키는 방법에 유용하다. 환자는 효과적인 수의 활성화된 CTL을 투여받는다. 환자에게 투여된 CTL은 환자로부터 유래되거나 상기 기재한 바와 같이 활성화될 수 있다(즉, 이는 자가 CTL이다). 다르게는, CTL은 환자가 아닌 다른 개체에서 유래된다. 물론, 바람직하게는, 공여자는 건강한 개체이다. 여기서 "건강한 개체"란 개체가 일반적으로 양호한 건강 상태를 가지고 있고, 바람직하게는 적격 면역계를 가지고, 더 바람직하게는, 용이하게 시험되거나 검출되는 어떠한 질병도 갖지 않음을 의미한다.

[0149] 생체내에서, 본 발명에 따른 CD4-양성 CTL에 대한 표적 세포는 종양의 세포(이는 종종 MHC 유형 II를 발현한다) 및/또는 종양을 둘러 싸고 있는 기질 세포이다(종양 세포)(이 또한 종종 MHC 유형 II를 발현한다)(문헌 [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, and Stevanovic, S; Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas, Clin Cancer Res., 2006, 12, 4163-4170]).

[0150] 본 발명의 CTL은 치료 조성물에서 활성 성분으로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 표적 세포를 환자에서 사멸시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 환자에게 효과적인 수의 상기 정의된 바와 같은 CTL의 투여를 포함한다.

[0151] 여기서 "비정상적으로 발현되는"이라는 것은 폴리펩티드가 발현의 정상 수준에 비해 과발현되거나, 유전자가 종양이 유래된 조직에서는 침목적이지만 종양에서는 발현되는 것을 의미한다. "과발현"이라는 것은 폴리펩티드가 정상 조직에 존재하는 수준의 1.2배 이상으로 존재하는 것을 의미하고, 더 바람직하게는 적어도 2배, 더 바람직하게는 적어도 5배 또는 10배로 정상 조직에 존재하는 것을 의미한다.

[0152] CTL은 예를 들면 상기 기재된 방법으로 수득될 수 있다.

[0153] 소위 CTL의 입양 전달을 위한 프로토콜은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 다음과 같은 문헌에서 찾아 볼 수 있다(문헌[Rosenberg, SA, Lotze, MT, Muul, LM, Chang, AE, Avis, FP, Leitman, S, Linehan, WM, Robertson, CN, Lee, RE, Rubin, JT, et al., 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., 1987, 316, 889-897; Rosenberg, SA, Packard, BS, Aebersold, PM, Solomon, D, Topalian, SL, Toy, ST, Simon, P, Lotze, MT, Yang, JC, Seipp, CA, et al.; Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report, N. Engl. J. Med., 1988, 319, 1676-1680; 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, and Rosenberg, SA; Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, Science, 2002, 298, 850-854; Yee, C, Thompson, JA, Byrd, D, Riddell, SR, Roche, P, Celis, E, and Greenberg, PD; 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, 2002, 99, 16168-16173; 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, and Rosenberg, SA; Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma, J. Clin. Oncol., 2005, 23, 2346-2357]; (문헌[Gattinoni, L, Powell, DJ, Jr., Rosenberg, SA, and Restifo, NP; Adoptive immunotherapy for cancer: building on success, Nat. Rev. Immunol., 2006, 6, 383-393]) 및 (문헌[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, and Rosenberg, SA; Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, Science, 2006, 314 (5796): 126-129])에서 리뷰되었다.

[0154] 본 발명의 임의의 문자(즉, 웹티드, 핵산, 발현 벡터, 세포, 활성화된 CTL, T-세포 수용체 또는 이를 암호화하는 핵산)는 면역 반응을 괴할 수 있는 세포를 특징으로 하는, 장애의 치료에 유용하다. 따라서, 본 발명의 임의의 문자는 약제로서 또는 약제의 제조에 사용될 수 있다. 이러한 문자는 그 자체로 또는 본 발명의 다른 분

자와 함께 또는 공지된 문자와 함께 사용될 수 있다.

- [0155] 바람직하게는, 약제는 백신이다. 이는 환자, 병에 걸린 기관 또는 전신적으로에 직접적으로 투여될 수 있거나, 후속적으로 환자에게 투여되는 환자 또는 인간 세포주로부터 유래된 세포로 생체외 적용되거나, 환자로부터 유래된 면역 세포로부터 아집단을 선택하기 위해 시험관내 사용되며, 이는 이어서 환자로 다시 재투여된다. 핵산이 시험관내에서 세포에 투여되는 경우, 인터루킨-2와 같은 면역 자극 사이토카인을 공동 발현하기 위해 세포가 형질감염되는 것이 유용할 수도 있다. 웨პ티드는 실질적으로 순수할 수 있고, 또는 면역-자극 보조제(아래 참조)와 조합되거나 또는 면역-자극 사이토카인과 함께 사용되거나, 또는 리포좀과 같은 적당한 전달 시스템과 함께 투여될 수 있다. 웨პ티드는 또한 keyhole limpet haemocyanin (KLH) 또는 mannan(WO 95/18145 및 문헌 [Longenecker et al (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690, 276-291] 참조)과 같은 적당한 담체와 함께 결합될 수 있다. 웨პ티드는 또한 태그될 수도 있거나, 융합 단백질일 수도 있으며, 또는 하이브리드 분자(hybrid molecule)일 수도 있다. 본 발명의 웨პ티드는 CD4 또는 CD8 CTL을 자극할 것으로 기대될 수 있다. 그러나, 반대의 CD에 대해 양성인 T 세포에 의해 제공된 도움이 존재할 때 자극은 더 효율적이다. 따라서, CD4 CTL을 자극하는 MHC 유형 II 에피톱에 있어서는, 융합 파트너 또는 하이브리드 분자의 부분이 적당하게 CD8-양성 T 세포를 자극하는 에피톱을 제공한다. 또 한편으로는, CD8 CTL을 자극하는 MHC 유형 I 에피톱에 있어서는, 융합 파트너 또는 하이브리드 분자의 부분이 적당하게 CD4-양성 T 세포를 자극하는 에피톱을 제공한다. CD4- 및 CD8-자극 에피톱은 당해 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.
- [0156] 본 발명의 한 양태에서, 백신은 적어도 하나의 웨პ티드, 바람직하게 2 내지 50개, 더 바람직하게는 2 내지 25개, 더욱더 바람직하게는 2 내지 15개, 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 웨პ티드 또는 추가의 웨პ티드를 포함한다. 웨პ티드는 하나 이상의 특이적 TAA에서 유래되었고 이는 MHC 유형 I 및/또는 유형 II 분자에 결합할 수 있다.
- [0157] 바람직하게, 본 발명의 웨პ티드가 백신이나 본 발명의 약제에 사용되는 경우, 이들은 염으로서, 예를 들면, 비제한적으로 아세트산염 또는 염화염으로서 존재한다. 실시예 7은 백신 IMA-910의 연구를 제공하고 이는 본 발명의 웨პ티드 중 일부를 포함하며, 염 형태의 웨პ티드를 사용하는 백신의 제조 및 그의 입자 크기를 기재한다.
- [0158] 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하고, 또는 적당한 벡터 또는 전달 시스템에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이런 핵산을 디자인하고 도입하는 방법은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 개요는 문헌[S. Pascolo: Vaccination with messenger RNA Methods Mol Med 2006, 127; 23-40; R. Stan, JD Wolchok and AD Cohen DNA vaccines against cancer Hematol Oncol Clin North Am 2006, 3; 613-636 or A Mahdavi and BJ Monk Recent advances in human papillomavirus vaccines Curr Oncol Rep 2006, 6, 465-472]에 의해 제공된다. 폴리뉴클레오티드 백신은 제조하기 쉽지만, 이를 벡터의 면역 반응을 유도하는 작용 방식은 완전히 이해되지 않았다. 적당한 벡터 및 전달 시스템은 아데노바이러스, 백시나 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노-결합 바이러스 또는 한 개 이상의 바이러스의 요소를 포함하는 하이브리드와 같은 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 시스템은 양이온 지질 및 양이온 중합체를 포함하고, 이는 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자-총"을 통한 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 웨პ티드 또는 핵산에 의해 암호화된 웨პ티드는 예를 들면 위에서 언급한 각각의 반대 CDR에 대한 T 세포를 자극하는 에피톱을 갖는 융합 단백질일 수도 있다.
- [0159] 본 발명의 약제는 하나 이상의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 면역 반응을 비-특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질을 말한다(예: CTL 및 항원에 대한 조력 T 세포에 대해서 매개된 면역 반응). 따라서 본 발명의 약제에서 유용한 것으로 고려된다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 1018 ISS, 알루미늄 염, 암필리박스(Amplivax), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(Imiquimod), 이뮤팩트(ImuFact) IMP321, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, 쥐브이뮨(JuvImmune), 리포백(LipoVac), MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드(Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, 웨പ텔(PepTel)® 벡터 시스템, PLG 극미립자, 레시퀴모드(resiquimod), SRL172, 바이로좀(Virosomes) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유래된 아퀼라(Aquila)의 QS21 스티뮬론, 마이코박테리아 추출물 및 합성 박테리아의 세포 벽 모방제, 및 다른 독점적 보조제, 예컨대 리비 데톡스(Ribi's Detox), 쿠일(Quil), 또는 수퍼포스(Superfos)가 있다. 프레운드(Freund's) 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 수지상 세포에 특이적인 몇몇의 면역적 보조제(예: MF59) 및 그들의 제조 방법은 이전에 기재된 바 있다(문헌[Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Uguzzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM; Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison AC; The mode of

action of immunological adjuvants; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11]. 또한, 사이토카인도 사용될 수 있다. 몇몇의 사이토카인은 수지상 세포의 림포이드 조직(예: TNF-알파)으로의 이동과 직접적으로 연관된 바 있으며, 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T-림프구(예: GM-CSF, IL-1 및 IL-4)에 대한 항원 제시 세포로의 성장을 가속시키고(미국 특허 제 5,849,589 호, 본 발명의 참조 문헌으로 들어가 있음) 면역보조제의 역할을 한다(예: IL-12) 문헌[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].

[0160] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 세팅에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨(Toll)-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9을 통해 본질적인 (비-적응) 면역계를 활성화시킴으로써 작용한다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 웨티드 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-특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포의 성장 및 분화를 향상시키고, 이는 T_{H1} 세포의 활성화 및 강한 세포독성 T-림프구 (CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9의 자극에 의해 유도되는 T_{H1} 바이어스는 보통 T_{H2} 바이어스를 촉진하는 alum 또는 불완전한 프레온드 보조제(IFA)와 같은 백신 보조제의 존재시에도 유지된다. CpG 올리고뉴클리오티드는 다른 보조제와 함께 제형되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어 내기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제형으로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활성을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 전체 투여량 백신에 대한 유사한 항체 반응에 의해 항원 투여량을 대략 두 배 정도 줄일 수 있게 한다(문헌[Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, JUNE 2006, 471-484]). 미국 특허 제. 6,406,705 B1 호는 CpG 올리고뉴클레오티드, 비-핵산 보조제 및 항원-특이적 면역 반응을 일으키는 항원의 병용 사용을 기술한다. 시판되는 CpG TLR9 길항제는 Mologen(Berlin, Germany)에 의해 만들어진 dSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)이며 이는 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9와 같은 다른 TLR 결합 분자 또한 사용될 수 있다.

[0161] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 화학적으로 변형된 CpGs(예: CpR, Idera), 폴리(I:C), 예컨대 암필리겐(AmpliGen), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 면역활성적인 작은 문자 및 항체, 예컨대 사이클로포스파미드, 수니티닙, 베바시주맙, 셀레브렉스, NCX-4016, 실데나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, XL-999, CP-547632, 파조파닙, ZD2171, 항-CTLA4 및 SC58175(이들은 치료적으로 또는 보조제로서 작용할 수 있다). 본 발명에서 유용한 보조제 및 첨가제의 양 및 농도는 과도한 실험없이 숙련자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0162] 바람직한 보조제는 dSLIM, BCG, OK432, ALDARA, 페비테르(PeviTer) 및 쥬브이뮨이다.

[0163] 바람직하게 본 발명의 약제는 암에 대해 활성이다. 암은 비전이성이거나 전이성이거나 있고 구강 및 인두의 암, 소화기관의 암, 대장, 직장 및 항문의 암, 호흡기관의 암, 유방암, 자궁경부, 질 및 외음부의 암, 자궁체부 및 난소의 암, 남성 생식기의 암, 요로암, 뼈 및 연조직의 암 및 카포시 육종, 피부의 흑색종, 안구 흑색종, 및 비-흑색종 안구암, 뇌 및 중추신경의 암, 갑상선 및 기타 내분비선의 암, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 및 골수종일 수 있다. 가장 바람직하게 본 발명에 의해 치료가 되는 종양 장애는 직장결장암, 폐암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 위암, 신장암, GIST 또는 아교모세포종이다.

[0164] 본 발명의 웨티드가 아교모세포종, 직장결장암, 췌장암, 폐암, 신장 또는 위암으로부터 단리되었기 때문에, 본 발명의 약제는 아교모세포종, 직장결장암, 췌장암, 폐암, 신장 또는 위암을 치료하는데 특히 유용할 것이다.

[0165] 암을 치료하는 데에 유용할 뿐만 아니라, 본 발명의 웨티드는 진단에도 유용하다. 이 웨티드가 아교모세포종에서 발생되고, 이 웨티드들은 정상 조직에 존재하지 않기 때문에, 이들은 암을 진단하는 데에 쓰일 수 있다.

[0166] 조직 검사 시, 본 발명의 웨티드의 존재는 병리학자의 암 진단에 도움을 줄 수 있다. 항체에 의한 본 발명의 특정한 웨티드의 검출, 질량 분광 분석 또는 당해 분야에 공지된 다른 방법은 병리학자들이 조직이 악성인지 또는 염증이 있는 것인지 또는 일반적으로 병적인 것인지를 결정하는 데에 이용된다. 본 발명의 웨티드의 기들이 존재한다는 것은 병적인 조직의 분리 또는 소분류를 가능하게 한다.

[0167] 병적인 조직 표본에서 본 발명의 웨티드가 검출되는 것은 면역계를 이용한 치료의 이득에 대해 결정을 하는 데에 도움을 준다. 이는 특히 T 림프구가 작용 메커니즘에 관련되는 것으로 알려져 있거나 관련될 것으로 예상이

될 때는 더욱 그렇다. MHC 발현의 손실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 피하는 것으로 기재된 메커니즘이다. 따라서, 본 발명의 웨티드의 존재는 이 메커니즘이 분석되는 세포에 의해 악용되지 않는다는 것을 보여준다.

- [0168] 본 발명의 웨티드는 본 발명의 웨티드에 대한 림프구 반응, 예컨대 본 발명의 웨티드 또는 MHC 분자에 착화된 본 발명의 웨티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응을 분석하는 데 사용될 수 있다. 이러한 림프구 반응들은 추가 치료 단계에 대한 의사 결정을 위한 진단 마커로서 사용될 수 있다. 이러한 반응은 단백질, 혼산, 자가 조직의 물질, 림프구의 입양 전달의 백신화와 같은 다양한 방법으로 림프구의 반응을 일으키는 데 목적을 둔 면역 치료 접근에서 대리 마커로서 사용될 수 있다. 유전자 치료의 세팅에서, 본 발명의 웨티드에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려될 수 있다. 림프구 반응의 모니터는, 예를 들어 이식 대 숙주 및 숙주 대 이식의 겸출과 같은 이식 치료법의 치료 후 겸진에서 가치 있는 도구가 될 수 있다.
- [0169] 본 발명의 웨티드는 MHC/웨티드 복합체에 대한 특이적 항원의 발생 및 개발에 사용될 수 있다. 이는 병적인 조직을 표적으로 하는 독소 또는 방사성 물질을 이용하는 치료에 사용될 수 있다. 이 항원의 또 하나의 용도는 PET와 같은 영상 목적으로 방사성 핵종을 병적인 조직으로 표적화하는 것이다. 이 용도는 작은 전이의 겸출 또는 병적인 조직의 정확한 크기 및 위치 확인에 도움을 준다. 또한, 이들은 암 조직 검사 샘플을 기반으로 병리학자의 진단을 확인하는 데 사용될 수 있다.
- [0170] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)에 관련된다: (a) 상기 기재된 바와 같은 약학 조성물을 용액 또는 동결건조된 형태로 함유하는 컨테이너; (b) 선택적으로, 동결건조된 제형을 위한 희석액 또는 재구성 용액을 함유하는 제 2 컨테이너; 및 (c) 선택적으로, (i) 용액의 용도 또는 (ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 용도에 대한 지침서. 이 키트는 또한 (iii) 완충제, (iv) 희석액, (v) 필터, (vi) 바늘 또는 (v) 주사기 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 컨테이너는 바람직하게 병, 바이알, 주사기 또는 시험관이고; 다용도 컨테이너일 수도 있다. 약학 조성물은 바람직하게 동결건조되어 있다.
- [0171] 본 발명의 키트는 바람직하게는 적합한 컨테이너에서 본 발명의 동결건조된 제형 및 그의 재구성 및/또는 용도를 위한 지침서를 포함한다. 적합한 컨테이너는 예를 들면, 병, 바이알(예: 듀얼 챔버 바이알), 주사기(듀얼 챔버 주사기 등) 및 시험관을 포함한다. 컨테이너는 유리 또는 플라스틱 등의 여러 가지의 자재로 만들어 질 수 있다. 바람직하게 키트 및/또는 컨테이너는 재구성 및/또는 용도에 대한 사용법을 포함한 지침서를 포함하고 있다. 예를 들면, 라벨에는 동결건조된 제형이 상기 기재된 바와 같이 웨티드의 농도를 재구성하는 방법이 쓰여 있을 수도 있다. 라벨은 또한 제형이 피하주입이 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.
- [0172] 제형을 갖는 컨테이너는 재구성된 제형의 반복된 투여를 가능하게 하는 다용도 바이알일 수 있다 (예: 약 2 내지 6회의 투여). 키트는 또한 적당한 희석액(예: 중탄산나트륨 용액)을 포함하는 제 2 컨테이너를 추가로 포함할 수도 있다.
- [0173] 희석액과 동결건조된 제형의 혼합시에, 재구성된 제형 중 최종 웨티드 농도는 바람직하게 적어도 0.15 mg/mL/웨티드 ($=75 \mu\text{g}$)이고 바람직하게 3 mg/mL/웨티드 ($=1500 \mu\text{g}$)을 넘지 않아야 한다. 키트는 다른 완충제, 희석액, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 지침서가 삽입된 패키지를 포함한, 사용자의 입장에서 필요한 것을 더 추가로 포함할 수도 있다.
- [0174] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학 조성물의 제형을 포함하는 단일 컨테이너를 다른 성분(예: 다른 화합물 또는 이를 다른 화합물의 약학 조성물)과 함께 또는 없이 갖거나, 각각의 성분을 별도의 컨테이너에서 가질 수 있다.
- [0175] 바람직하게, 본 발명의 키트는 다음과 같은 제 2 화합물 또는 그들의 약학적 조성물과 함께 공동투여되도록 포장된 본 발명의 제형을 포함한다: 보조제(예: GM-CSF), 화학요법제, 천연 생성물, 호르몬 또는 길항제, 항-헬관 형성제 또는 억제제, 세포자멸-유도제 또는 킬레이터. 키트의 성분은 미리 혼합되어 있을 수도 있고 또는 각각의 성분은 환자에게 투여되기 전에 별도의 다른 컨테이너에 담겨있을 수도 있다. 키트의 성분은 하나 이상의 액체 용액, 바람직하게는 수용액, 더욱 바람직하게는 무균 수용액에 제공될 수 있다. 키트의 성분은 적당한 용매를 첨가함으로서 액체로 전환될 수 있는 고체로서 제공될 수도 있고, 바람직하게 이는 다른 별도의 컨테이너에 담겨 제공된다.
- [0176] 치료 키트의 컨테이너는 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체 또는 액체를 담을 수 있는 임의의 다른 수단일 수도 있다. 보통, 하나 이상의 성분이 있을 경우, 키트는 제 2 바이알 또는 다른 컨테이너를 포함하고, 이는 별도의 투여를 허용한다. 키트는 약학적으로 허용되는 액체를 위한 다른 컨테이너를 포함할 수도 있

다. 바람직하게, 치료 키트는 본 키트의 성분인 본 발명의 시약의 투여를 허용하는, 장치를 함유한다(예: 하나 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등).

[0177] 본 발명의 약학 제형은 구강, 비강, 안약 형태의, 피하의, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등의 어떠한 주입 형태로든 웨티드 투여에 적당한 약제이다. 바람직한 투여 경로는 피하 경로이고 가장 바람직한 투여 경로는 피내 경로이다. 주입 펌프에 의해서도 투여가 가능하다.

[0178] 본 발명을 위해, 모든 참조 문헌은 그 전체가 참고로서 인용된다.

발명의 효과

[0179] CD8과 CD4 의존하는 어느 한 반응 유형의 MHC 복합체에 결합할 수 있는 웨티드에 대한 신규한 아미노산 서열을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0180] 도 1은 MHC 유형 I 제한된 방식으로 제시되는, 대장암 샘플 CCA707로부터의 종양 관련 웨티드(TUMAP) PCN-002(도 1a), 아교모세포종 샘플 GB1006로부터의 TOP-002(도 1b), 아교모세포종 샘플 GB1006로부터의 PTP-001(도 1c), 신장 세포 암종 샘플 RCC190로부터의 GAL-001(도 1d), 아교모세포종 샘플 GB1002로부터의 CHI-001(도 1e), 아교모세포종 샘플 GB1002로부터의 JAK-001(도 1f), 비-소 폐 세포 암 NSCLC-풀 2로부터의 AKR-001(도 1g) 및 혀장암 샘플 PC330로부터의 FNI-001(도 1h)을 식별하는 ESI-액체 크로마토그래피 질량 스펙트럼을 도시한다.

도 2는 MHC 유형 II 제한된 방식으로 제시되는, 위장암 GC-풀 2로부터의 종양 관련 웨티드(TUMAP) CEA-009(도 2a), 위장암 GC-풀 1로부터의 TGFBI-006(도 2b), 아교모세포종 샘플 GB6002로부터의 TGFBI-007(도 2c), 아교모세포종 샘플 GB1004로부터의 TGFBI-008(도 2d), 비-소 폐 세포 암 NSCLC-풀 1로부터의 TGFBI-009(도 2e) 및 아교모세포종 샘플 GB6002로부터의 TGFBI-010(도 2f)를 식별하는 ESI-액체 크로마토그래피 질량 스펙트럼을 도시한다.

도 3은 아교모세포종 관련 웨티드 PTP-001(도 3a) 및 CHI-001(도 3b)을 암호화하는 두 개의 유전자의 발현 프로파일을 도시한다. 유전자의 발현은 정상 조직에서는 없거나 아주 낮지만 아교모세포종 샘플에서는(GB1006T 내지 GB1011T; NCH359T 및 NCH361T) 250배 이상으로 증가했다.

도 4는 문헌[Sylvester-Hvid, C, Kristensen, N, Blicher, T, Ferre, H, Lauemoller, SL, Wolf, XA, Lamberth, K, Nissen, MH, Pedersen, LO, and Buus, S; 2002, Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction, *Tissue Antigens*, 59, 251-258]에 따라 Epl ELSIA에 의해 측정되는 HLA-A*0201에 대한 선택된 웨티드의 결합 친화성을 도시한다. 분석은 MHC 유형 I 결합 웨티드인 것으로 공지된 웨티드로 제한되었다. HLA-DR 결합 웨티드의 친화성은 이 분석으로 측정될 수 없다.

도 5는 말초 혈액으로부터 ODC-001 및 NOX-001 특이적 CD8+ 립프구의 증식을 유도하는 미세구의 테트라머 분석을 도시한다. 건강한 HLA-A*0201+ 공여자 HD100의 웰 당 1×10^6 CD8+ 농축된 PBMC는 항-CD28 + 고 밀도 종양 항원 A*0201/ODC-001(위 폐널) 또는 항-CD28 + 고 밀도 종양 항원 A*0201/NOX-001(아래 폐널)에 연결된 미세구로 매주 자극되었다. 시험관내 3번째 자극 후, 모든 세포들은 항체 CD8 FITC + 테트라머 A*0201/NOX-001 PE 및 A*0201/ODC-001 APC로 염색되었다. 세포들은 립프구 집단 또는 CD8+ 립프구(오른쪽 폐널)에서 게이팅되고, 숫자들은 CD8+ 립프구 내의 테트라머+ 백분율을 나타낸다.

도 6는 다섯 번의 자극 주기 후 IFN γ ELISPOT에 의해서 검출되는 TGFBI-004의 시험관내 면역원성을 도시한다.

세포는 감작되고 TGFBI-004로 반복되어 재자극되었으며 관련된 TGFBI-004(웰 1, 2, 3 및 4) 및 관련없는(음성 대조군) 웨티드로 각각 배양되었다. IFN γ ELISPOT 후 분석은 ELISPOT 판독기에서 수행되었다(CTL, Cleveland, USA). PHA-이오노마이신은 양성 대조군 역할을 했다. 숫자는 양성 점의 수를 나타낸다.

도 7은 다섯 번의 자극 주기 후 ICS에 의해 검출되는 TGFBI-004의 시험관내 면역원성을 도시한다.

세포들은 TGFBI-004 로딩된 자가 DC에 의해 감작되며 자가 PBMC + TGFBI-004로 반복적으로 재자극되었다. 판독을 위해 세포들은 관련된 TGFBI-004(웰 1, 2, 3 및 4) 및 관련없는(음성 대조군) 웨티드로 각각 배양되었다. 세포내 IFN γ 염색에 추가적으로, 세포는 CD4-FITC 및 CD8-PerCP 항체로 또한 염색되었다. 분석은 4가지 색 FACSCalibur 세포 계산기(BD Biosciences, Germany)에서 수행되었다.

도 8은 NOX-001 웨პ티드에 의한 시험관내 재자극시에 T 세포주에 의한 IFN γ 생성의 ELISPOT 분석을 도시한다. A: 공여자 HBC-154(분류된 CD8+ NOX-001 테트라머+)의 T 세포주 7+; B: 공여자 HBC-154(분류된 CD8+ NOX-001 테트라머-)의 T 세포주 7-.

분류된 CD8+ NOX-001 테트라머+ (A) 및 CD8+ NOX-001 테트라머- (B) 세포들은 관련없는(MLA-001)(상부 웨) 및 관련된(NOX-001)(하부 웨) 웨პ티드($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)에 의한 자극 후 IFN γ ELISPOT에 의해 분석되었다. 숫자는 양성 점의 수를 나타낸다.

도 9는 본 발명에 포함된 웨პ티드의 HLA-A*0201에 대한 친화성을 보여준다. P116 HLA 유형 I 웨პ티드 및 바이러스 마커 웨პ티드 HBV-001의 해리 상수(K_D)는 ELISA를 기반으로 한 분석으로 측정되었다(실시예 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0181] 실시예

[0182] 1. 합성 및 구조

[0183] 웨პ티드는 Fmoc 화학을 이용하는 이미 확립된 표준 고상 합성에 의해 합성된다. 분취용 HPLC에 의한 정제 후, 이온-교환 절차는 생리적으로 호환가능한 카운터 이온(아세트산 또는 클로라이드)을 통합시키기 위해 수행되었다. 마지막으로, 동결건조 후 백색이거나 회색에 가까운 백색의 고체가 수득되었다. TUMAS는 제조 과정중에 기술적인 이유로 클로라이드 염으로서 공급되는 IMA-CCN-001을 제외하고 아세트산 염으로 투여되었다.

[0184] 2. 세포 표면에 제시된 종양 관련 웨პ티드(TUMAP)의 식별

[0185] 조직 샘플

[0186] 환자의 종양 및 건강한 조직은 몇몇의 임상실험센터에 의해 제공되었다(아래 표 참조). 모든 환자의 동의서는 수술 전에 얻어졌다. 조직은 수술 직후 액체 질소에 의해 냉동되고 이는 영하 80°C 에서 TUMAP이 단리될 때까지 저장되었다.

[0187] HLA 웨პ티드의 조직 샘플로부터의 단리

[0188] 충격 냉동 조직 샘플로부터의 HLA 웨პ티드 풀(pool)이 약간 변형된 프로토콜에 따라 고체 조직으로부터 면역 침전법을 통해 HLA-A*02-특이적 항체 BB7.2 또는 HLA-A, -B, -C-특이적 항체 W6/32, CNBr-활성화된 세파로스, 산 치료 및 한외 여과기 사용하여 얻어졌다(문헌[Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature 351, 290-296 (1991); Seeger, F.H. et al. The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. Immunogenetics 49, 571-576 (1999)]).

[0189] ESI-액체 크로마토그래피 질량 분광 분석(ESI-LCMS)에 의한 TUMAP의 감지

[0190] 얻어진 HLA 웨პ티드 풀은 그들의 소수성에 따라 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(CapLC, Waters) 용리된 웨პ티드는 ESI 공급원을 갖춘 hybrid quadrupole orthogonal acceleration time of flight tandem mass spectrometer (Q-TOF Ultima, Waters)에 의해 분석되었다. 웨პ티드 풀은 농축 및 탈염을 위한 C18 예비-컬럼에 로딩되었다. 로딩 후에, 예비-컬럼은 $5 \mu\text{m}$ C18 역상 물질(Dionex)로 패킹된 용융-실리카 미세모세관 컬럼($75 \mu\text{m}$ i.d. x 250 mm)에 의한 분리를 위해 정렬된다. 용매 A는 4 mM 암모늄 아세테이트/물이었다. 용매 B는 80% 아세토니트릴 /물 중 2mM 암모늄 아세테이트이었다. 두 용매 모두 포름산을 사용하여 pH3.0에 맞추어졌다. 15 내지 60% B의 2원 구배가 90분 내에 실행되었고, 스플릿-시스템에 의해 유량 $5 \mu\text{l}/\text{분}$ 이 $200 \text{ nL}/\text{분}$ 으로 감소되었다. 금으로 코팅된 유리 모세관(PicoTip, New Objective)이 미세-ESI 공급원으로의 도입에 사용되었다. TOF 분석기의 통합 시간은 1.9 초였고, 여기서 스캔 간 지연은 0.1 초였다. 이어서, 웨პ티드 서열은 충돌 유도 부식(CID) 질량 분광 분석(ESI-CMS/MS)에 의해 밝혀졌다. 식별된 TUMAP 서열은 천연 TUMAP 단편 패턴을 합성 서열-동일 기준 웨პ티드의 단편 패턴과 비교함으로서 보증되었다.

[0191] 도 1 및 도 2는 MHC 유형 I 관련 TUMAP(도 1a 내지 1h) 및 MHC 유형 II 관련 TUMAP(도 2a 내지 2f)에 대한 종양 조직으로부터 수득한 예시적인 스펙트럼을 보여준다.

[0192] 3. 본 발명의 웨პ티드를 암호화하는 유전자의 발현 프로파일

[0193] MHC 분자에 의해 종양 세포의 표면에 제시된다고 식별된 웨პ티드는 그들이 유래된 조직에 대한 높은 인식 특이성

을 갖는 T 세포를 유도할 수 있을 것 같다. 이런 웨티드에 의한 백신에 의해서 유도되는 자가면역의 위험성을 최소화하기 위해 본 발명자들은 대부분의 정상 조직과 비교했을 때 종양 세포에서 과발현되는 단백질로부터 유래된 웨티드에 초점을 맞추었다.

[0194] 가장 이상적인 웨티드는 종양에 대해 독특하고 다른 어떠한 조직에서도 찾을 수 없는 단백질로부터 유래된 것이다. 이상적인 발현을 갖는 유전자로부터 유래된 웨티드를 식별하기 위해서, 식별된 웨티드는 이들이 유래된 것으로부터 각각 단백질 및 유전자로 할당되었고, 이 유전자들의 발현 프로파일이 생성되었다.

[0195] RNA 공급원 및 제조

[0196] 수술로 제거된 조직 표본은 각각의 환자로부터 얻은 동의서가 주어진 후 몇몇의 상이한 임상 부위에 의해 제공되었다(표 2 참조).

[0197] 종양 조직 표본은 수술 직후 액체 질소 중에 스냅-냉동되었고, 후에 절구 및 유봉을 이용하여 액체 질소하에 균질화되었다. 총 RNA는 TRIzol(독일 칼스루흐 소재의 인비트로젠(Invitrogen))을 이용하여 샘플로부터 제조되었고, 이어서 RNeasy(독일 헬렌 소재의 QIAGEN)에 의해 청소되었다; 이 두 개의 방법 모두는 제조업자의 프로토콜에 따라 실행되었다.

[0198] 건강한 인간 조직으로부터의 총 RNA는 상업적으로 얻어졌다(영국 헌팅돈 소재의 암비온(Ambio); 독일 헤이델베르그 소재의 클론테크(Clontech); 네덜란드 암스테르담 소재의 스트라타진(Stratagene); 미국 캘리포니아주 하이워드 소재의 바이오체인(BioChain)). 여러 개체(2 내지 123명의 개체)로부터의 RNA는 각각의 개체로부터의 RNA가 동일한 무게가 나가도록 혼합되었다. 백혈구는 4명의 지원자의 혈액 샘플로부터 단리되었다.

[0199] 모든 RNA 샘플의 양 및 품질은 아질런트(Agilent) 2100 생체분석기(독일 발드브론 소재의 아질런트(Agilent))에 의해 RNA 6000 Pico LabChip 키트(아질런트)를 사용하여 분석되었다.

[0200] 마이크로어레이 실험

[0201] 모든 종양 및 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 아피메트릭스 휴먼 게놈(Affymetrix Human Genome)(HG) U133A 또는 HG-U133 + 2.0 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재의 아피메트릭스(Affymetrix))에 의해 실행되었다. 모든 단계는 아피메트릭스의 사용 설명서에 따라 실행되었다 (http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx). 요약하면, 이중 가닥 cDNA는 사용 설명서에 따라 수퍼스크립트(SuperScript) RTII(인비트로젠) 및 올리고-dT-T7 프라이머(독일 에베르스 베르그 소재의 MWG 바이오테크)를 사용하여 5 내지 8 µg의 총 RNA로부터 합성되었다. 시험관내 전사는 U133A 어레이를 위한 바이오어레이 하이 일드 RNA 트랜스크립트 라벨링 키트(BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit)(미국 뉴욕주 파민데일 소재의 ENZO 다이아그노스틱스 인코포레이티드(ENZO Diagnostics, Inc.)) 또는 U133 + 2.0 어레이를 위한 진침 IVT 라벨링 키트(GeneChip IVT Labelling Kit)(아피메트릭스)를 사용하여 실행된 후, cRNA 단편화, 하이브리드화 및 스트렙트아비딘-피코에리트린 및 비오티닐화된 항-스트렙트아비딘 항체로의 염색으로 이어졌다(네덜란드 레이덴 소재의 몰레큘러 프로브스(Molecular Probes)). 이미지는 아질란트 2500A 진어레이 스캐너(U133A) 또는 아피메트릭스 진-칩 스캐너 3000(U133 + 2.0)을 이용하여 스캔되었고, 데이터는 모든 파라미터에 대해 디폴트 세팅을 이용하여 GCOS 소프트웨어(아피메트릭스)를 통해 분석되었다. 정규화를 위해, 아피메트릭스에 의해 제공된 100개의 하우스키핑 유전자가 사용되었다 (http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx). 상대적인 발현 값은 상기 소프트웨어에 의해 제공된 신호 로그 비율을 통해 계산되었고, 정상 샘플은 임의로 1.0으로 정해졌다.

[0202] 본 발명의 모든 웨티드의 발현 프로파일은 종양 조직에서 각 유전자의 높은 발현을 나타내지만 정상적인 조직에서는 발현이 되지 않거나 아주 낮은 정도로 발현된다.

[0203] 도 3은 아교모세포종 특이적 웨티드의 유전자 PTP-001(유전자:PTPRZ1, 도 3a), 및 CHI-001(유전자:CH3L2, 도 3b)에 대한 프로파일을 보여준다.

[0204] 4. 추가 종양 샘플에서의 ESI-액체 크로마토그래피 질량 분광 분석(ESI-LCMS)에 의한 식별된 TUMAP의 재검출

[0205] 실시예 1에서의 방법에 의해 식별된 TUMAP는 질량 분광 분석에 의해 직장결장암 샘플에서 전체적으로 검색되었다.

[0206] 얻어진 HLA 웨티드 풀은 그들의 소수성에 따라 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(CapLC, Waters), 용

리된 펩티드는 ESI 공급원을 갖춘 hybrid quadrupole orthogonal acceleration time of flight tandem mass spectrometer (Q-TOF Ultima, Waters)에 의해 분석되었다. 펩티드 풀은 농축 및 탈염을 위한 C18 예비-컬럼에 로딩되었다. 로딩 후에, 예비-컬럼은 5 μm C18 역상 물질(Dionex)로 패킹된 용융-실리카 미세모세관 컬럼(75 μm i.d. x 250 mm)에 의한 분리를 위해 정렬된다. 용매 A는 4 mM 암모늄 아세테이트/물이었다. 용매 B는 80% 아세토니트릴 /물 중 2mM 암모늄 아세테이트이었다. 두 용매 모두 포름산을 사용하여 pH3.0에 맞추어졌다. 15 내지 60% B의 2원 구배가 90분 내에 실행되었고, 스플릿-시스템에 의해 유량 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 이 200 n $\text{l}/\text{분}$ 으로 감소되었다. 금으로 코팅된 유리 모세관(PicoTip, New Objective)이 미세-ESI 공급원으로의 도입에 사용되었다. TOF 분석기의 통합 시간은 1.9 초였고, 여기서 스캔 간 지연은 0.1 초였다. 한정된 펩티드의 검출을 위해, 크로마토그래피 시스템에서 펩티드의 공지된 분자량 및 체류 시간을 기반으로 하여, 고 민감 검사는 ESI-LCMS 유형의 실험으로 실행되었다. 그러므로, 이전에 식별된 펩티드(단독 및/또는 이중 하전)의 m/z 값을 포함한 목록은 전구물질 선택에 적용되었다. 이어서, 펩티드 서열은 충돌 유도 부식(CID) 질량 분광 분석(ESI-CMS/MS)에 의해 밝혀졌다. TUMAP 서열은 생성된 천연 TUMAP 단편 패턴을 합성 서열-동일 기준 펩티드의 단편 패턴과 비교함으로서 확인되었다. 체류 시간의 안정성을 포함한 HLA 펩티드 정제 수율 및 분석 시스템의 재현성의 평가는 풍부한 내인성 HLA-A*02 펩티드(DDX5로부터 YLLPAIVHI)의 강도 및 체류 시간을 내부 표준으로써 수행되었다. 그러므로, 이 실험에서 이전에 식별된 TUMAP의 검출을 위한 CRC 샘플 포함 기준은 LCMS/MS 실험에서 내부 이중 하전 기준 신호(YLLPAIVHI)의 스캔 당 650 카운트라는 최소 강도로 정해졌으며 이는 성공적인 HLA 펩티드 단리 및 분석 시스템의 정확한 성능을 보장한다.

[0207] 표 2는 다른 단계의 대장암 및 직장암 샘플의 분석, 및 둘 중 하나의 초기 종양 부위에서 발생한 전이의 분석의 결과를 보여준다. 모든 HLA-A*02 TUMAP는 샘플의 대부분에서 발견되었다. HLA-DR TUMAP의 재검출 빈도는 일반적으로 더 낮다. 이 것은 HLA 유형 II 펩티드에서 각각의 코어 서열에 대한 여러 가지 길이의 변이체가 존재할 수 있으므로 예상된다. 이전에 이미 식별된, 대장암에서 높은 숫자로 존재한다고 알려진 ODC-001, TUMAP(M Diehl, PhD thesis 1998, University of Tuebingen)는 양성 대조군으로 쓰였다.

[표 2]

CRC 샘플에서 TUMAP의 재검출

| 번호 | CRC 샘 플 | 종양 위치 | 종양 단 계 | TUMAP 재검출 (+) 또는 비검출 (-) | | | | | | |
|------------------|------------|-------|-----------|--------------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | | | | 유형 I | | | | 유형 II | | |
| | | | | C20- 001 | TGFBI- 001 | TOP- 001 | NOX- 001 | PCN- 001 | ODC- 001 | TGFBI- 004 |
| 1 | CCA062 | 대장 | I | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | - |
| 2 | CCA740 | 대장 | II | + | + | + | + | + | + | n.a. |
| 3 | CCA165 | 대장 | II | + | + | + | + | + | + | - |
| 4 | CCA712 | 대장 | III | + | + | + | - | - | + | n.a. |
| 5 | CCA707 | 대장 | III | + | + | + | + | + | + | n.a. |
| 6 | CCA718 | 대장 | III | + | + | + | + | + | + | n.a. |
| 7 | CCA739 | 대장 | III | + | + | + | + | + | + | n.a. |
| 8 | CCA166 | 대장 | III | + | + | + | + | + | + | - |
| 9 | CCA734 | 대장 | III | + | + | + | + | + | + | n.a. |
| 10 | CCA719 | 대장 | IV | + | + | + | + | - | + | n.a. |
| 11 | CCA725 | 대장 | IV | + | + | + | - | + | + | n.a. |
| 12 | CCA164 | 대장 | IV | + | + | - | - | + | + | - |
| 13 | CCA167 | 대장 | IV | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | - |
| 14 | CCA056 | 대장 | ? | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | - |
| 15 | CCA305 | 대장 | ? | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | - |
| 20 | CCA708 | 대장 전이 | IV | + | + | + | + | + | + | + |
| 16 | CCA160 | 직장 | II | + | + | + | + | + | + | + |
| 17 | CCA754 | 직장 | II | + | + | + | - | + | + | n.a. |
| 18 | CCA170 | 직장 | III | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | + |
| 19 | CCA171 | 직장 | IV | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | - |
| 21 | CCA724 | 직장 전이 | IV | + | + | - | - | - | + | + |
| 분석된 샘플 중 검지된 펩티드 | | | | 100% | 100% | 87% | 67% | 80% | 100% | 33 % |

[0210]

n.a.: not analysed (분석되지 않음)

[0212] 5. HLA 유형 I-제한 펩티드의 HLA-A*0201로의 결합

[0213] ELISA EpI 키트(Soeren Buus, Institute of Medical Microbiology and Immunology at the University of Copenhagen, Denmark에서 입수)를 사용하여 실베스터-히비드(Sylvester-Hvid)(문헌[Sylvester-Hvid, C,

Kristensen, N, Blicher, T, Ferre, H, Lauemoller, SL, Wolf, XA, Lamberth, K, Nissen, MH, Pedersen, LO, and Buus, S; Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction, *Tissue Antigens*, 2002, 59, 251-258]) 및 ELISA EpI 키트 사용 설명서에 따라 HLA 결합 분석이 실행되었다.

[0214] 웹티드 용액의 제조

[0215] 웹티드는 10mg/ml의 농도에서 DMSO+0.5% TFA(독일 다름스타트 소재의 메르크(Merck)) 중에 용해되었다. 이 분석에 사용된 가장 높은 웹티드 용액은 200 μM이었으며, 따라서 저장 용액은 1:50으로 웹티드-희석 완충제(0.1% 루트롤-F68 및 10 mg/l 폐놀 레드를 포함한 PBS)에 희석되어 최종 부피가 100 μl에 맞추어졌다. 웹티드-희석 완충제를 사용하여 순차적인 5배 희석액이 생성되었다.

[0216] HLA-A*0201/웹티드 복합체의 리폴딩(refolding)

[0217] 사용 설명서에 따라, 2배 농도 HLA-A*0201 용액은 3x pH 완충제(pH 6.6), 루트롤-F68, 인간 β2m, 재조합 HLA-A*0201(이들 모두는 ELISA EpI 키트에 포함되어 있음)를 PBS와 혼합함으로써 제조되었다.

[0218] 리폴딩 과정을 위해서는, 15 μl 웹티드 순차 희석 및 15 μl의 2배 농도 MHC 믹스를 96-웰 판(미국 뉴욕주 로체스터 소재의 뉴크(Nunc))에서 혼합하였고, 이는 18°C에서 48시간 동안 배양되었다.

[0219] ELISA에 의한 복합체의 정량화(quantification)

[0220] Maxisorp 판(미국 뉴욕주 로체스터 소재의 뉴크)은 코팅 완충제(pH 9.6) 중 5 μg/ml w6/32 항체로 코팅되었고 이는 24시간 동안 4°C에서 배양되었으며 PBS 중 5% 탈지유 분말(독일 다름스타트 소재의 메르크)로 밤새 4°C를 사용하여 차단되었다.

[0221] MHC 복합체 기준(ELISA EpI 키트)은 PBS 중 2% 탈지유 분말(SMP/PBS)로 희석되었고 농도는 10nM에 맞추어졌다. 3.16 배 순차 희석이 준비되었고 이는 코팅되고 차단된 Maxisorp 판으로 이동되었다. 웹티드-MHC 복합체는 2% SMP/PBS에 의해 10배로 희석되고, 이는 동일한 Maxisorp 판으로 이동되었으며 2시간 동안 4°C에서 배양되었다. 토끼 항-hβ2m 항체(ELISA EpI 키트)가 2% SMP/PBS 중 1:2500 희석으로 첨가되었고 이는 4°C에서 1시간 동안 배양되었다. 증폭 완충제(HRP-결합된 엔소 항-토끼 중합체) 및 마우스 혈청(이는 둘 다 ELISA EpI 키트에 의해 공급됨)은 2% SMP/PBS에서 희석되었고, 판에 추가되었으며, 실온에서 30분 동안 배양되었다. 전개 완충제(테트라메틸벤자린, TMB; ELISA EpI 키트)가 추가되었으며, 판은 빛 보호 아래에서 실온에서 30분 동안 배양되었다. 반응은 0.2M 황산(독일 다름스타트 소재의 VWR)을 추가함으로서 멈추어졌다. 판은 OD450nm에서 VERSAmax ELISA-판독기(미국 캘리포니아주 서니베일 소재의 몰레큘러 디바이시즈)를 사용하여 판독되었다.

[0222] 엑셀 및 프리즘(Prism, 등록상표명), 그래프패드 3.0을 사용하여 데이터가 분석되었다.

[0223] 결과는 도 4에 보여진다. 낮은 K_D 값은 HLA-A*0201에 대한 높은 친화성을 반영한다. 결합 친화성이 약 4 디케이드에 걸쳐 연장되지만, 대부분의 웹티드는 1 디케이드 내에 유사한 결합 친화성을 갖는다(C20-001, ODC-001, PCN-001, TOP-001). MUC-001의 친화성은 포함된 리간드 대부분에 비해 약 1 디케이드가 낮게 나타나지만, MUC-001은 신장암에 대한 백신에 쓰였을 때, T-세포 반응을 일으킬 수 있는 능력을 가지고 있다(문헌[Wierecky, J., Muller, MR, Wirths, S, Halder-Oehler, E, Dorfel, D, Schmidt, SM, Hantschel, M, Brugger, W, Schroder, S, Horger, MS, Kanz, L, and Brossart, P; Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients, *Cancer Res.*, 2006, 66, 5910-5918]). 다른 한편으로는, NOX-001은 약간 더 높은 친화성을 가지고 있으며, TGFB1-001은 다른 대부분의 웹티드와 비교했을 때 K_D 값이 100배 정도 낮은 가장 높은 결합력을 가지고 있다.

[0224] 절대적으로, 대부분의 웹티드에서 관찰되는 0.01 내지 0.1nM의 K_D 값은 이미 강한 결합을 나타낸다. 유사한 친화성이 성공적으로 시험된 신장 세포암 백신 IMA901에 함유된 웹티드에 대해 관찰되었다(문헌[H. Singh-Jasuja, S. Walter, T. Weinschenk, A. Mayer, P. Y. Dietrich, M. Staehler, A. Stenzl, S. Stevanovic, H. Rammensee, J. Frisch; Correlation of T-cell response, clinical activity and regulatory T-cell levels in renal cell carcinoma patients treated with IMA901, a novel multi-peptide vaccine; ASCO Meeting 2007 Poster # 3017; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Poster # 3017]).

따라서, 본 발명 펩티드의 결합 특성은 지금까지 생체내 상에서 T-세포 반응을 일으킨다고 알려진 펩티드와 비슷하다.

[0225] 6. MHC 유형 I 제시된 펩티드의 시험관내 면역원성

[0226] 시험관내 CD8+ T 세포의 감작

[0227] 펩티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체로 로딩된 인공 항원 제시 세포(aAPC)에 의한 시험관내 자극을 실행하기 위해서, 우선 표준 밀도 구배 분리 배지(독일 콜베 소재의 PAA)를 사용하여 새로운 HLA-A*02+ 버피 코트로부터 PBMC(말초 혈액 단핵 세포)를 단리했다. 버피 코트는 혈액 은행 Tubingen 또는 Katharinenhospital Stuttgart로부터 입수되었다. 단리된 PBMC는 T-세포 배지(TCM)에서 10% 열 불활성화된 인간 AB 혈청(독일 콜베 소재의 PAA), 100 U/ml 폐니실린/100 µg/ml 스트렙토마이신(벨기에 베르비어스 소재의 캄브렉스(Cambrex)), 1 mM 나이트륨 피루브산(독일 뉴스타트 소재의 CC Pro) 및 20 µg/ml 젠타마이신(캄브렉스)이 보충된 RPMI-글루타막스(독일 칼스루흐 소재의 인비트로젠)로 이루어진 인간 시험관내 감작을 위해 밤새 배양되었다. CD8+ 럼프구는 제조업자의 지침에 따라 CD8+ MACS 양성 선택 키트(독일 베르기쉬 글라드바흐 소재의 밀텐ي(Miltenyi))를 사용하여 단리되었다. 수득된 CD8+ T-세포는 2.5 ng/ml IL-7(독일 하이델베르그 소재의 프로모셀(Promocell)) 및 10 U/ml IL-2(독일 먼니치 소재의 카론(Chiron))가 보충된 TCM에서 사용할 때까지 배양되었다. pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T-세포 자극 및 관독을 약간만 변형하여 상기 기재된 바와 같이 수행하였다(문헌[Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978]). 요약하면, 횡단막 도메인이 결핍되고 중쇄의 카르복시 말단에서 비오틴화된 비오틴화된 재조합 HLA-A*0201 분자는 문헌[Altaian, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Williams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 1996, 274, 94-96]에 의해 설명된 방법에 따라 제조되었다. 정제된 동시자극 마우스 IgG2a 항 인간 CD28 Ab 9.3(문헌[Jung, G, Ledbetter, JA, and Muller-Eberhard, HJ; Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84, 4611-4615])은 제조업자(독일 본 소재의 퍼바이오(Perbio)가 권장하는대로 세포-N-하이드록시석신이미도비오틴을 이용하여 화학적으로 비오틴화되었다. 사용된 비드는 크기가 5.60 µm 스트렙트아비딘 코팅된 폴리스티렌 입자였다(미국 일리노이주 소재의 방스 래보레이토리즈(Bangs Laboratories)). 양성 대조군 및 음성 대조군으로서 사용되는 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(변형된 Melan-A/MART-1의 펩티드 ELAGIGILTV) 및 A*0201/DDX5-001(DDX5로부터의 YLLPAIVHI) 또는 A*0201/HBV-001(FLPSDFFPSV)였다.

[0228] 600ng의 비오틴 항-CD28 + 200ng의 관련된 비오틴-pMHC(고 밀도 비드) 또는 2ng의 관련 + 200ng 비관련(pMHC 라이브리리) MHC(저 밀도 비드)의 존재하에 800,000 비드/200 µl은 96-웰 판에 코팅되었다. 96-웰 판에서 자극은 1×10^6 CD8+ T 세포를 37°C에서 3 내지 4일 동안 5 ng/ml IL-12(프로모셀)가 보충된 200 µl TCM에서 2×10^5 세척된 코팅된 비드로 공동배양함으로써 시작된다. 배지의 반은 80 U/ml IL-2로 보충된 새로운 TCM에 의해 교환되고 배양은 37°C에서 3 내지 4일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 마지막으로, 테트라머 분석은 4가지 색의 FACSCalibur(BD) 상의 항체 CD8-FITC 클론 SK1(독일 하이델베르그 소재의 BD)와 함께 형광 MHC 테트라머(문헌[Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Williams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; 특정 T 럼프구의 표현형 분석, Science, 1996, 274, 94-96])에서 설명된 대로 제조됨)를 사용하여 수행되었다. 펩티드 특이적 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 테트라머 분석의 평가는 FCS Express 소프트웨어(De Novo Software)를 사용하여 수행되었다. 특이적 테트라머 + CD8+ 럼프구의 시험관내 감작은 적절한 게이팅 및 음성 대조군 자극에 대한 비교에 의해 검출되었다. 주어진 항원에 대한 면역원성은 건강한 공여자 중 한 명의 하나 이상의 평가 가능한 시험관내 자극된 웰이 시험관내 자극 후 CD8+ T 세포주를 함유하는 것으로 발견되는지를 검출하였다(즉, 이 웰은 CD8+ T 세포 중 1% 이상의 특이적 테트라머+를 가졌으며 특이적 테트라머+ 세포의 백분율은 음성 대조군 자극의 평균의 적어도 10배이다).

[0229] 본 발명의 펩티드는 비교를 위해 생체내 면역원성이 있는 것으로 알려진 다른 펩티드와 비교하여 실험되었다. NOX-001 및 ODC-001에 대해 특이적인 T-세포주의 발생을 보여주는 대표적인 염색이 도 5에 보여진다. 결과는 표 3에 정리되어 있다.

[0230] [표 3]

[0231] 백신 웨티드와 비교된 본 발명의 웨티드의 시험관내 면역원성

| 항원 | 면역원성 검출됨 |
|-----------|----------|
| TGFBI-001 | 검출됨 |
| NOX-001 | 검출됨 |
| PCN-001 | 검출됨 |
| TOP-001 | 검출됨 |
| C20-001 | 검출됨 |
| ODC-001 | 검출됨 |
| CCN-001 | 검출됨 |
| PTP-001 | 검출됨 |
| CHI-001 | 검출됨 |
| JAK-001 | 검출됨 |

[0232]

[표 3a]

[0234] 본 발명의 웨티드의 시험관내 면역원성

| 항원 | 양성 도너 / 실험된 도너 | 양성 웰 / 실험된 웰 |
|---------------|----------------|---------------|
| IMA-HBV-001 | 7/16 (44%) | 10/107 (9%) |
| IMA-TGFBI-001 | 3/4 (75%) | 4/22 (18%) |
| IMA-NOX-001 | 3/5 (60%) | 9/60 (15%) |
| IMA-PCN-001 | 3/4 (75%) | 4/42 (10%) |
| IMA-TOP-001 | 2/5 (40%) | 7/72 (10%) |
| IMA-C20-001 | 1/5 (20%) | 1/60 (2%) |
| IMA-ODC-001 | 1/5 (20%) | 1/60 (2%) |
| IMA-HBV-001 | 2/5 (40%) | 10/54 (19%) |
| IMA-CEA-004 | 4/4 (100%) | 50/60 (83%) |
| IMA-CCN-001 | 5/5 (100%) | 42/54 (78%) |
| IMA-MET-001 | 4/6 (67%) | 30/72 (42%) |

[0235]

[0236] 본 발명자들에 의해 수행된 시험관내 면역원성 실험의 결과는 여기에 정리되어 있다. 나타난 결과는 높은 밀도의 비드에 의한 CD8+ 세포의 자극에 의해 수득되었다. 다른 인간 혈청이 면역원성 결과에 높은 영향을 줄 수 있기 때문에, 동일한 혈청이 사용된 실험의 결과만이 평가되었다.

[0237]

7. MHC 유형 II를 나타내는 웨티드의 시험관내 면역원성

[0238]

T 조력 세포는 종양 세포에 대한 면역 반응을 활성화시키고 유지하는 CTL을 지지하는데 중요한 역할을 한다. 따라서, MHC 유형 II 웨티드는 IMA910에 포함되었다. IMA910에 포함된 세 개의 유형 II 웨티드 중 하나인 TGFBI-004는 시험관내 면역 가능성에 대해 시험되었고, 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 유도인자로서 증명되었다. CD4+ 및 기능적인 CD8+ T 림프구의 생성은 자가조직 시스템에서 수행된 자극을 이용하는 실험에서 보여졌다.

[0239]

시험의 원리

[0240]

특이적 인간 CD4+ 및 CD4+ 세포의 감작 및 확장은 자가조직 DC를 갖는 단핵세포-고갈된 PBMC의 감작 및 자가조직 PBMC의 재자극에 의해 시험관내 분석되었다. 요약하면, 항원-특이적 CD4+ T 세포의 생성을 위해서, 건강한 공여자 중 한 명의 단핵세포-고갈된 PBMC(HLA 유전자형 유형I: A1/A25/B8/B18 및 유형 II: DQB1*02/DQB1*06/DRB1*03/DRB1*15/DRB3/DRB5)는 웨티드-펄스 자가조직 DC에 대해서 자극되었으며 자가조직 PBMC + 웨티드에 의해 재자극되었다. 판독 시스템으로서, 단기 재자극시의 IFN γ 생성은 ELISPOT 및 유식 세포에 의해 평가되었다. T 세포는 특이적 T 세포 소집단에서 IFN γ 생성 세포의 백분율을 결정하기 위해서 ELISPOT 및 세포내 IFN γ 염색 + CD4-FITC 및 CD8-PerCP에 의한 8개의 자극 후 분석되었다. 이 실험에서, 다른 웰로부터의 TGFBI-004 웨티드로 자극된 세포들은 풀링되고, 판독을 위해 관계없는 웨티드로 배양되고 음성 대조군으로 수행되었다.

[0241]

수지상 세포(DC)의 생성

[0242]

인간 DC는 10% 자가조직 원형질// 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640-글루타막스/25mM 헤페스(독일 소재의 인비트로젠)를 가지고 있는 DC 배지에서 배양된 단핵 세포로부터 수득되었다. 먼저, 베피 코트 및 원형질은 건강한 공여자의 혈액(Bloodbank Tubingen)의 원심분리에 대해서 수득되었다. 그 후 PBMC는 표준 밀도 구배 분리(오스트리아 PAA 소재의 림포사이트 세파레이션 미디움(Lymphocyte Separation Medium))에 대해서 베피 코트로부터 단리되었고, 총 세포 개수를 결정하기 위해서 DC 배지에서 재혈탁되었다.

100 내지 120 백만의 PBMC는 세척되고, 15 ml X-Vivo 20 배지(벨기에 소재의 바이오휘태커(BioWhittaker))에서 재현탁되었고, 세포 배양 플라스크로 옮겨졌다. 37°C에서 2시간 후, 말초 혈액 백혈구(PBL)를 함유한 배지는 제거되었고, 점착 단핵 세포는 10 ml PBS로 2회 세척되고 100 ng/ml GM-CSF 및 30 ng/ml IL-4(독일 소재의 이뮤노툴스(ImmunoTools)) 또는 20 ng/ml(독일 소재의 R&D 시스템스)를 갖는 10 ml DC 배지에서 6일 동안 배양되었다. 3일 및 5일째, 100 ng/ml GM-CSF 및 30 ng/ml IL-4 (이뮤노툴스) 또는 20 ng/ml IL-4(독일 소재의 R&D 시스템스)가 더해졌다. 7일째, 미성숙한 DC는 10 ng/ml TNF- α (독일 소재의 R&D 시스템스) 및 20 μ g/ml 폴리(IC)(독일 소재의 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)) 또는 100 ng/ml LPS에 의해서 24시간 동안 활성화되었다. 나머지 PBMC 및 수득된 PBL은 분할되고 냉동되었다.

[0243] 특이적 T 세포의 시험관내 감작

[0244] CD4+ T 세포를 생성하기 위해, 3 백만 PBMC/PBL은 2×10^5 자가조직 DC로 자극되었다. DC는 8일째 수확되었다 (챕터 3.1, DC의 생성 참고). 5 mM EDTA를 갖는 PBS는 가능한 많은 세포(점착 세포 포함)를 얻으려는 목적으로 쓰였다. DC 배지로 세척된 후, 세포 개수가 결정되었다. 웨티드 로딩을 위해, DC는 1 ml DC 배지에서 재현탁 되었고 25 μ g/ml 웨티드로 37°C에서 2시간 동안 배양되었다. DC의 펄스에 사용되는 웨티드는 TGFBI-004, 포스 믹스(Posmix)(EBV 및 CMV 관련 웨티드의 혼합물), Padre 및 CMV였다. 자가조직 PBMC/PBL는 해동되고, DC 배지로 세척되고(2회 이상), 24 웨л 판에서 1ml 중 3 Mio 세포/ml의 밀도로 플레이팅되었다. 웨티드로 로딩된 DC는 그 후 플레이팅된 PBMC/PBL에 더해졌고(웨티드를 함유한 1ml 혼탁액으로서) 37°C에서 7일간 배양되었다. 감작 후, 수득된 CTL은 우선 조사된다(30 Gy; Gammacell 1000 Elite, Nordion International, Canada) 동결보존된 자가 조직 웨티드-로딩된 PBMC로 재자극되었다. 이 목적을 위해 웨л마다 5×10^5 CTL 및 2.5×10^6 PBMC가 더해졌다. 웨티드에 의한 PBMC의 펄스는 상기한 바와 같이(DC) 수행되었다. 처음 재자극 후 1일 째, IL-2(독일 소재의 R&D 시스템스) 및 IL-7은 2 ng/ml 및 5 ng/ml의 최종 농축액에 각각 더해졌다. 그 후에, 매 2일 째 및 7 일 째 날, IL-2 및 IL-7은 각각 배지에 더해졌다. 두번째 재자극은 7일 후에 행해졌으나, 이번에 웨티드는 배양된 CTL에 단독으로 더해졌다(PBMC 없이). 웨티드-로딩된 PMBC 및 웨티드 단독을 교대로 가하면서 재자극은 7 일 주기로 수행되었다. 8번의 자극후 분석은 세포내 IFN γ 염색 및 IFN γ ELISPOT에 의해 수행되었다.

[0245] 결과

[0246] 관심있는 웨티드에 특이적으로 반응하는 CD4+ T 세포주를 감작할 수 있었다(도 6 및 도 3). T 세포 반응은 ELISPOT에 의해 4개의 T 세포주 중 2개에서 검출될 수 있었으며, CD4+ 및/또는 CD8+ 세포를 생성하는 4개의 T 세포주 TGFBI-004 특이적 IFN γ 중 3개는 ICS에 의해 보여졌다. 따라서, 상기 기재된 실험 시스템에 의해 시험된 한 명의 공여자에서 TGFBI-004는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 유도할 수 있었다. 이 유망한 결과에 따르면, 웨티드는 면역원성이 있고 T 세포 반응을 유도할 수 있는 능력을 갖는 가능성 있다.

8. NOX-001 및 TGFBI-001에 의해 예시된 기능적 검증

[0247] IMA910 백신에 포함된 웨티드의 면역원성은 이매틱스 TUMAP 검증 플랫폼을 사용하여 시험관내 검증되었다(독일 튜빈겐 소재의 이매틱스 바이오테크놀로지스 게엠베하(immatics biotechnologies GmbH)). 특이적 T 세포의 유도는 면역 시스템을 성공적으로 활성화시키는 웨티드의 능력을 암시한다. 효율적인 항종양 면역 반응이 활성화된 T 세포가 친화성이 높고 기능적일 때만 가능하므로, IFN γ 를 생성하거나 종양 세포주를 사멸하는 그의 능력을 시험함으로써 TUMAP의 높은 친화성, 기능성 T 림프구를 감작하는 능력을 조사하였다. 두 개의 웨티드, NOX-001 및 TGFBI-001는 시험관내 높은 친화성의 CTL을 유도할 수 있는 능력으로 인해, 보다 심오한 검증을 위해서 선택되었다. 결과는 인간에서 웨티드 둘 모두에 대해 높은 친화성 전구물질 T 세포가 존재하고, 기능적인 CD8+ T 세포주가 NOX-001에 의해 생성될 수 있다는 것을 증명하였다.

[0248] 시험의 원리

[0249] IMA910 웨티드의 면역원성 및 특이적 T 세포의 특성을 추가로 통찰하기 위해, 두 가지 웨티드, NOX-001 및 TGFBI-001이 추가적인 평가를 위해 선택되었다. 이를 목적으로 한 실험은 독일 튜宾겐 소재의 이매틱스 바이오테크놀로지스 게엠베하에서 수행되었다(세포 분류는 튜宾겐 대학의 Dr. Buhrin의 실험실에서 수행되었다).

[0250] 고밀도 또는 저밀도 항원에 의해 활성화될 수 있는 능력에 따라, T 세포주는 고 또는 저 친화성으로 분류될 수 있다. 상술한 바와 같이(문헌[Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 최첨단: 인간 CD8 T 세포의 미리 정해진 친화성은 정해진 MHC/항-CD28 코팅된 미세구에서 확장되었다, J. Immunol., 2003, 171, 4974-4978]), 인간 고 친화성 CTL은 저 친화성 CD8+ T 세포에 비해 활성화를 위해 더 적은 웨티드를 사용함으로써 성공적으로 상승될 수 있다. 또한, 이러한 방식으

로 확장된 세포는 항원 발현 종양 세포주를 인식하는데 더 효율적인 것으로 보여졌고, 이것은 치료 전략 개발에 가능성이 큰 도구로 선정된다.

[0252] 웨티드의 고 친화성 CTL 주를 생성할 수 있는 능력을 결정하기 위해서, 단리된 인간 CD8+ 세포는 IL-12 및 IL-2의 존재하에 저밀도 pMHC(웨티드-MHC-복합체) 및 항-CD28항체로 코팅된 비드로 반복되는 시험관내 자극하여 감작되고 확장되었다. 3회의 자극 후에, 시험관내 감작된 T 세포의 단편은 pMHC-테트라머 염색되었고 유세포 분석에 의해서 검출되었다. 각각의 공여자의 테트라머-양성 세포는 항원 특이성에 따라 풀링되었고, pMHC-테트라머 및 인간 항-CD8-FITC 항체로 염색되었고, 마지막으로 FACSaria에 대해 FACS 분류되었다. 분류된 세포는 방사능 공급기 세포, 사이토카인 및 미토겐의 존재하에 배양되고 확장되었다. 감작된 고 친화성 항원 특이적 세포의 생성에 대한 관독으로써, pMHC-테트라머 염색이 수행되었다. 그들의 기능을 결정하기 위해서, IFN γ 제조는 ELISPOT에 의해서 분석되었으며, 종양 세포주의 사멸은 상응하는 웨티드 및 종양 세포주에 의한 세포의 재자극 후 생/사 염색에 기반을 둔 세포독성 분석 결과를 이용하여 검사되었다.

[0253] 특이적 CD8+ T 세포주의 생성

[0254] 웨티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체로 로딩된 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 이용한 시험관내 자극이 상기 기재된 바와 같이 수행되었다. 상기 기재된 방법과의 유일한 차이점은 자극이 200 ng 관련 MHC(고 밀도 비드) 대신에 2 ng 관련 + 200 ng 비관련 라이브러리(pMHC) MHC(저 밀도 비드)로 로딩된 비드로 수행된다는 점이다. 따라서, 주로 고 친화성 T 세포는 웨티드의 심오한 겸종을 위해서 생성되었다. 3회의 자극 후, 시험관내 감작된 T 세포의 단편은 pMHC-테트라머 염색되고 유세포 분석에 의해서 검출되었다. 주어진 항원에 대한 면역원성은 건강한 공여자 중 한 명의 하나 이상의 평가가능한 시험관내 자극된 웰이 시험관내 자극 후 특이적 CD8+ T 세포주를 함유하는 것으로 발견되는지를 검출하였다(즉, 이 웰은 CD8+ T 세포 중 1% 이상의 특이적 테트라머+를 가졌으며 특이적 테트라머+ 세포의 백분율은 음성 대조군 자극의 평균의 적어도 10배이다). 각각의 공여자의 테트라머-양성 세포는 이 후에 항원 특이성에 따라 풀링되고, 상응하는 pMHC-테트라머 및 인간 항-CD8-FITC 항체 클론 SK1로 염색되고, 최종적으로 FACSaria에 대해 FACS 분류되었다(독일 소재의 BD 바이오사이언시즈). 분류된 세포는 5×10^5 세포/ml 조사된 새로운 동종이형 PBMC, 5×10^4 세포/ml 조사된 LG2-EBV 세포, 150 U/ml IL-2(독일 먼니치 소재의 키론(Chiron)) 및 0.5 μ g/ml PHA-L(독일 만헤임 소재의 로슈 다이아그노스틱스)의 존재하에 T 세포 배지(10% 열 불활성화된 인간 AB 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 1mM 나트륨 피루브산 및 20 μ g/ml 젠타마이신이 보충된 RPMI-글루타막스)에서 배양되었다. 이 세포들의 확장은 150 U/ml IL-2를 함유하는 T 세포 배지에서 일어난다. 감작된 고 친화성 항원 특이적 세포의 생성을 위한 관독으로서, pMHC-테트라머 염색은 상기와 같이 수행되었으며 4가지 색의 FACSCalibur(독일 소재의 BD 바이오사이언시즈)에서 분석되었다.

[0255] 기능 시험

[0256] 그들의 기능을 결정하기 위해, IFN γ 제조는 상응하는 웨티드로 세포를 재자극한 후 ELISPOT(IFN γ ELISPOT 세트, 독일 소재의 BD)에 의해 평가되었다. 추가로, 세포-매개된 특이적 CTL의 세포독성은 종양 세포주를 생/사 세포-매개 세포독성 키트(L7010, 독일 소재의 인비트로젠)를 사용하여 사멸시킴으로써 조사되었다. 두 분석은 따로 지적 되지 않는 한 제조업자의 지시에 따라 수행되었다.

[0257] 결과

[0258] NOX-001 및 TGFBI-001, 두 웨티드 모두 저 pMHC 밀도 aAPC에 의한 성공스러운 감작에서 보여지듯이 시험관내 면역원성이었다. TGFBI-001 특이적 T 세포주 뿐만 아니라 NOX-001도 FACS에 의해 확립될 수 있었고, 이것은 고 친화성 CD8+ T 세포 전구물질이 건강한 공여자에 존재한다는 것을 시사한다.

[0259] 또한, NOX-001에서, 하나의 T 세포주는 상기 웨티드에 의한 재자극 후(도 8) 특이적으로 IFN γ 를 발현하므로 ELISPOT에 의해 기능성이 입증됨을 확립할 수 있다.

9. 본 발명의 HLA 유형 1 제한된 웨티드의 HLA-A*0201로의 결합

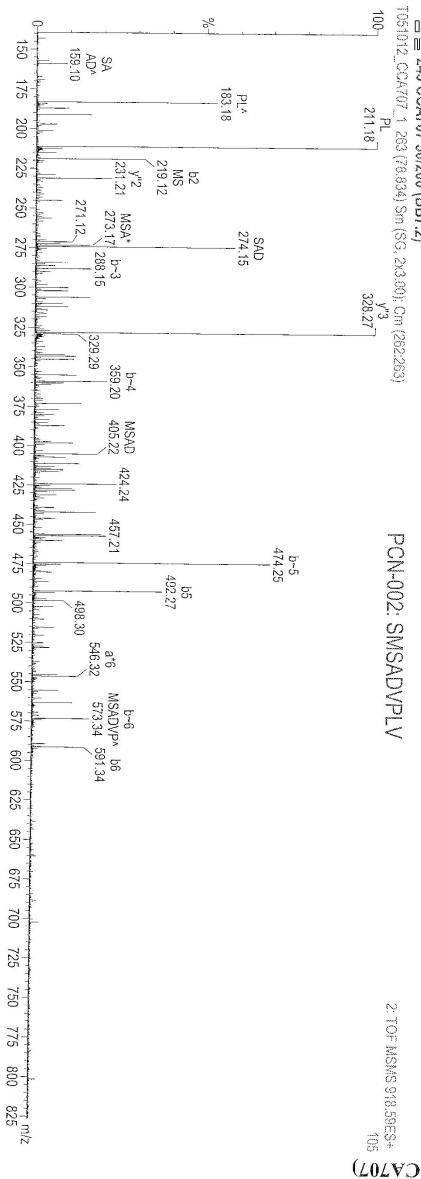
[0261] 이 분석의 목적은 HLA 유형 I 웨티드 CHI-001, DCA-001, JAK-001 및 PTP-001의 HLA-A*0201 대립 유전자에 의해 암호화된 MHC 분자에 대한 친화성을 평가하기 위한 것이다. HLA-A*0201에 대한 모든 웨티드의 친화성은 잘 알려진 대조군 웨티드 HBV-001과 비교될 수 있었으며, 분리 상수(K_D)는 0.05 내지 1.6nM의 범위에 있었다.

[0262] 시험의 원리

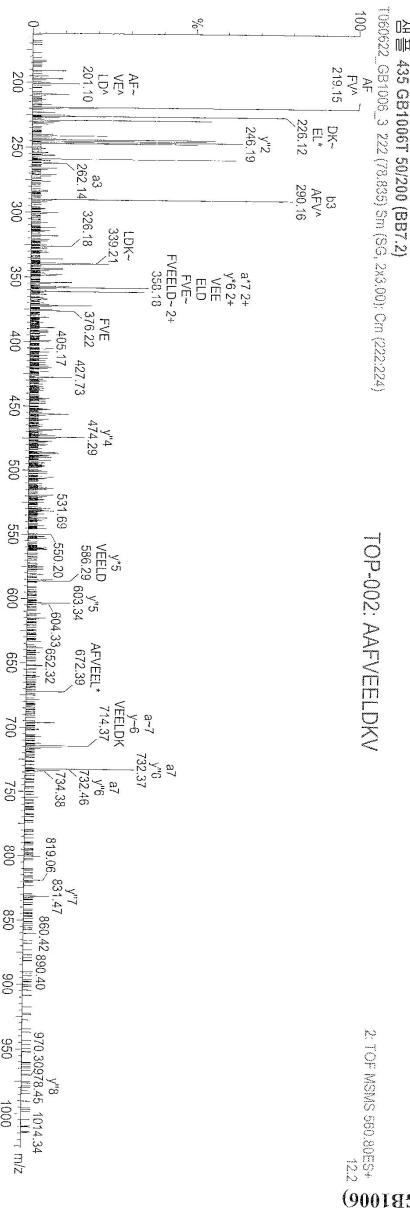
- [0263] 안정한 HLA/펩티드 복합체는 3개의 분자로 구성된다: HLA 중쇄, 베타-2 마이클로글로불린(b2m) 및 펩티드 리간드. 변성된 재조합 HLA-A*0201 중쇄 분자 단독의 활성은 이들을 "빈 HLA-A*0201 분자"의 기능적인 등가물이 되도록 보존될 수 있다. b2m 및 적당한 펩티드를 함유하는 수성 완충제로 희석되었을 때, 이 분자들은 전체적으로 펩티드에 의존하는 방식으로 빠르고 효율적으로 폴딩된다. 이 분자들의 이용가능성은 펩티드와 HLA 유형 I 분자 사이의 상호작용의 친화성을 측정하기 위한 ELISA-기반 분석에서 사용된다(문헌[Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferre H, Lauemoller SL, Wolf XA, Lamberth K, Nissen MH, Pedersen LO, Buus S. Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction. *Tissue Antigens* 2002, 59, 251-258]).
- [0264] 정제된 재조합 HLA-A*0201 분자는 b2m과 함께 배양되고 관심있는 펩티드의 투여량을 등급화하였다. 새로운-폴딩된 HLA/펩티드 복합체의 양은 정량적 ELISA에 의해 결정되었다. 분리 상수(K_D 값)는 보정 시약 HLA/펩티드 복합체의 희석으로부터 기록된 표준 곡선을 사용하여 계산되었다.
- [0265] 결과
- [0266] 결과는 도 9에서 보여진다. 더 낮은 K_D 값은 HLA-A*0201에 대한 더 높은 친화성을 나타낸다. HLA-A*0201에 대한 모든 펩티드의 친화성은 잘 알려진 대조군 폐비드 HBV-001과 비교될 수 있었으며, 분리 상수(K_D)는 0.05 내지 1.6nM의 범위이다.

도면

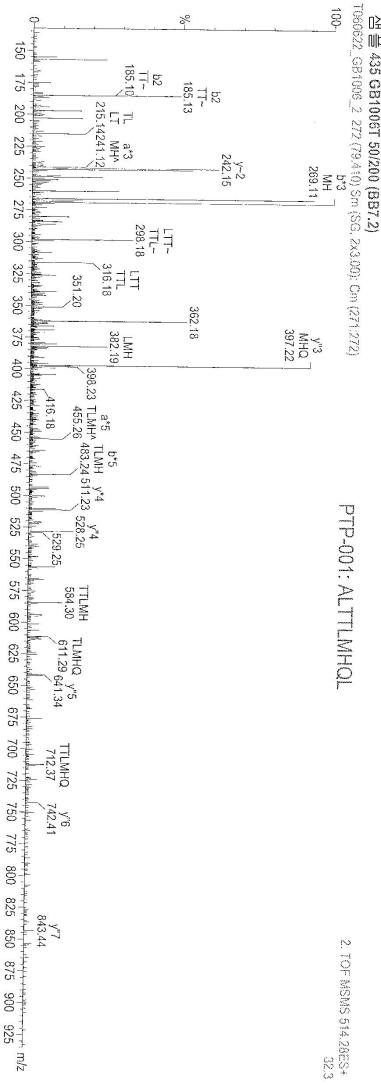
도면1a



도면1b



도면1c



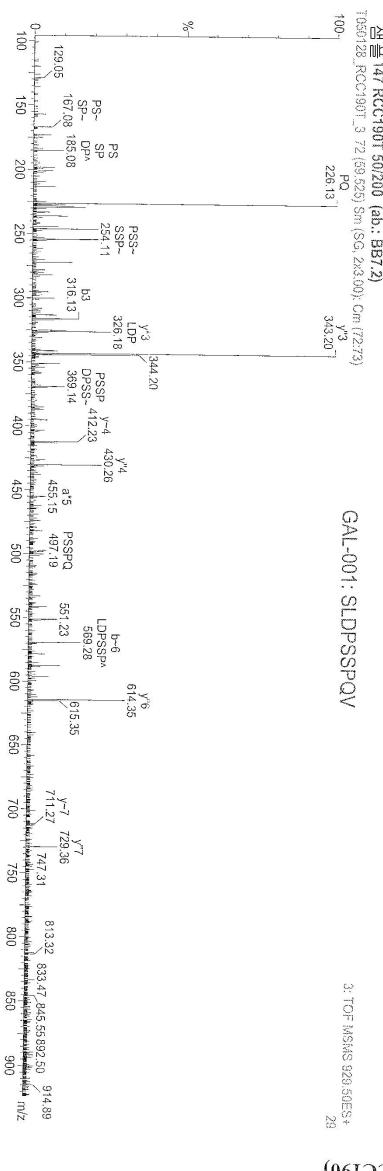
PTP-001 (GB1006)

2. TOF MS/MS 514.28ES+

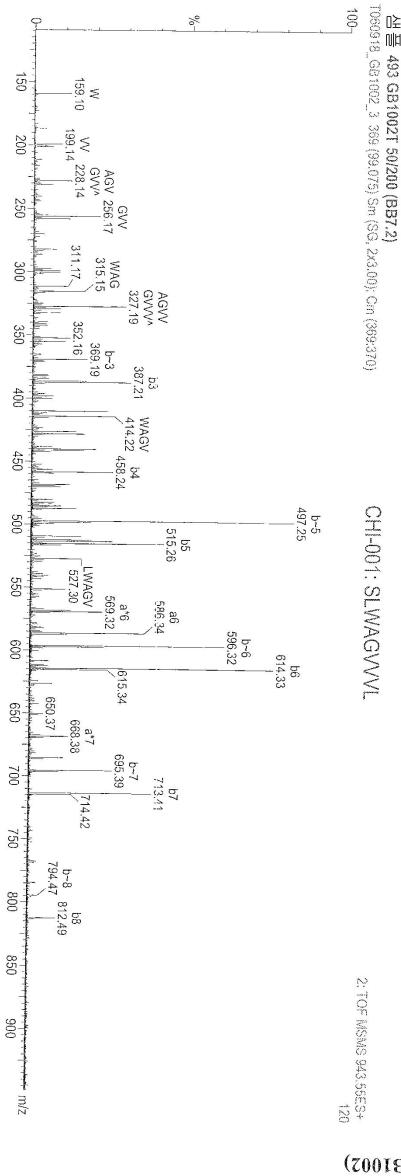
32.3

PTP-001: ALTLLMHQQL

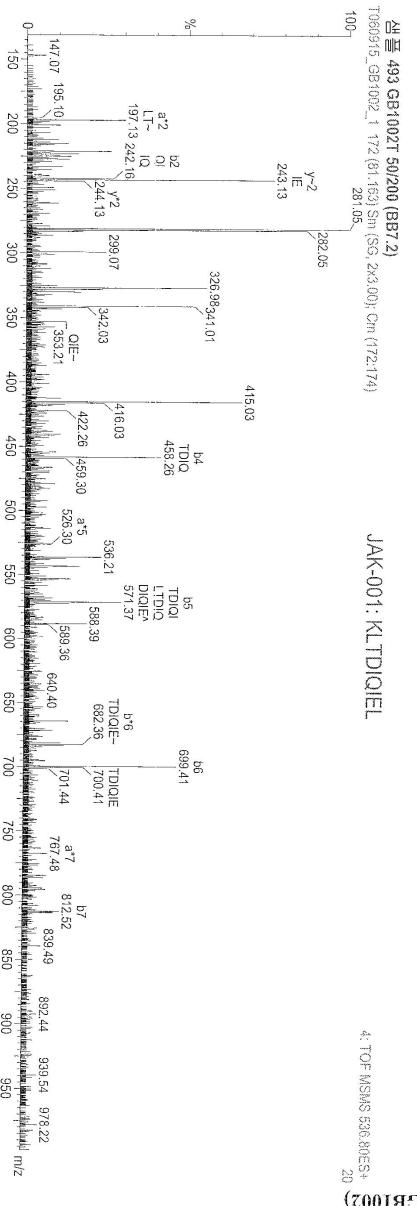
도면1d



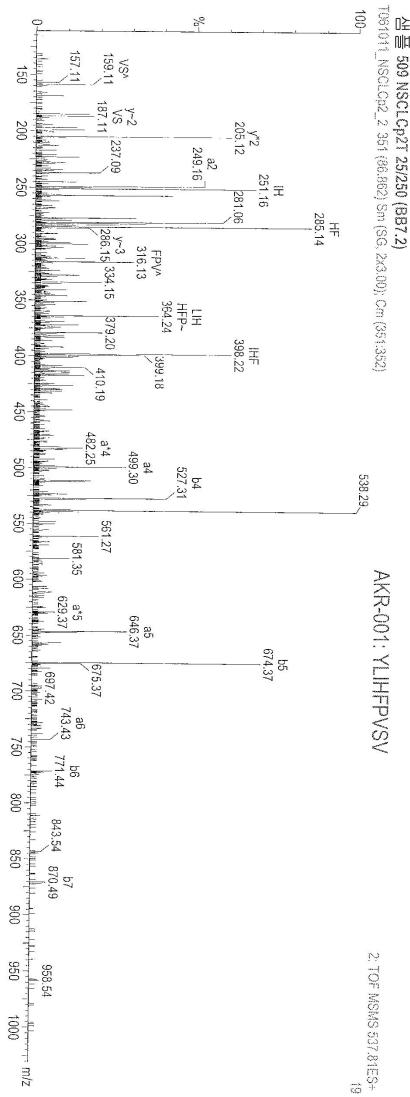
도면1e



도면 1f

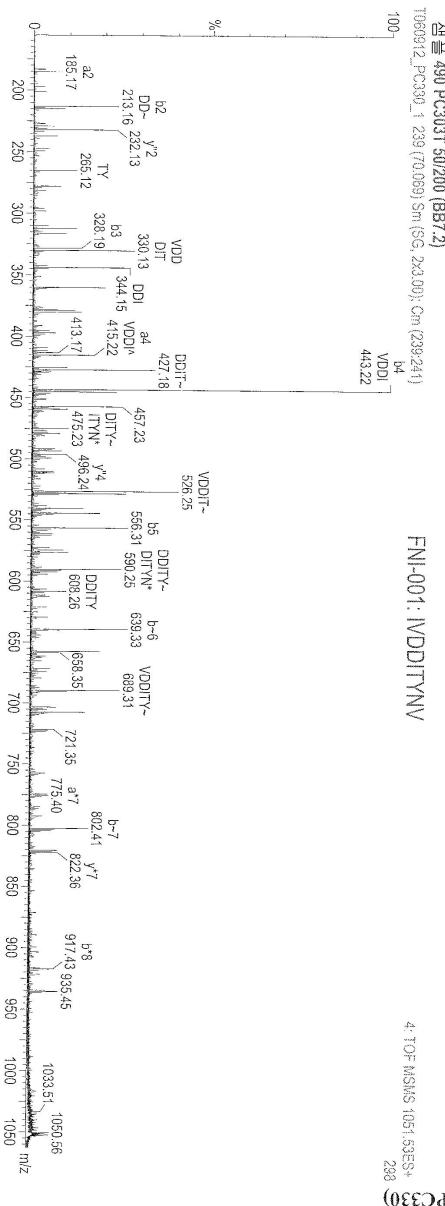


도면1g

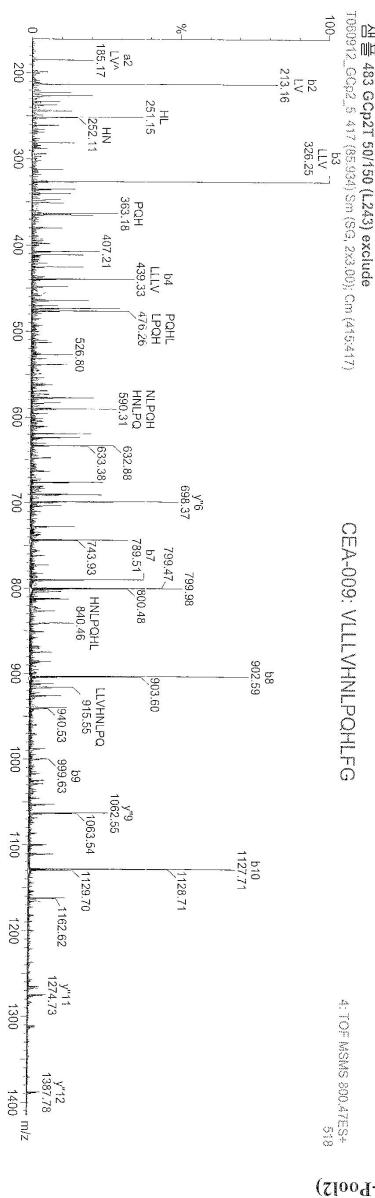


AKR-001 (NSCLC-P0012)

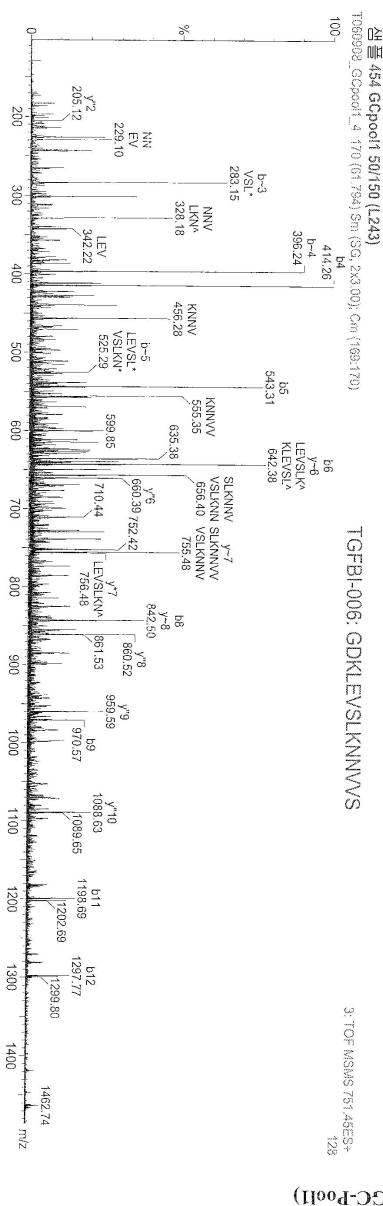
도면1h



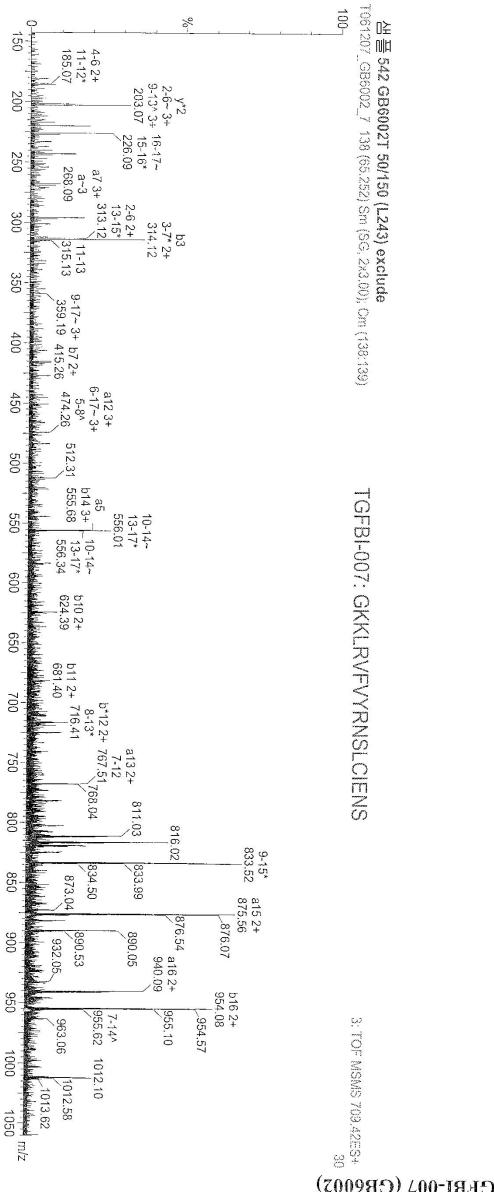
도면2a



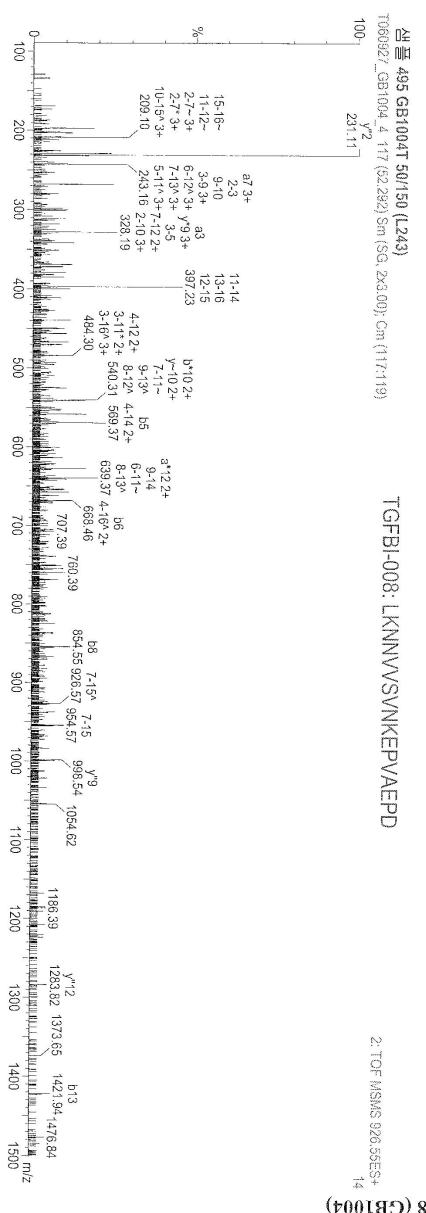
도면2b



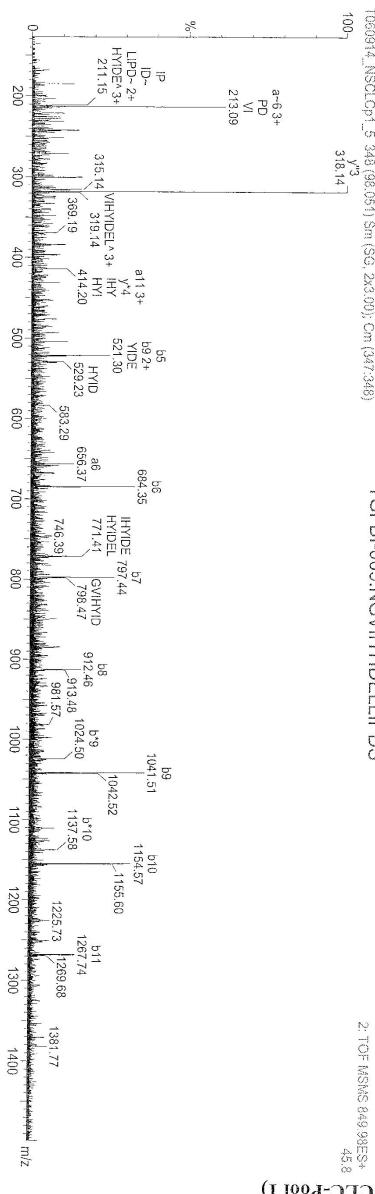
도면2c



도면2d



도면2e

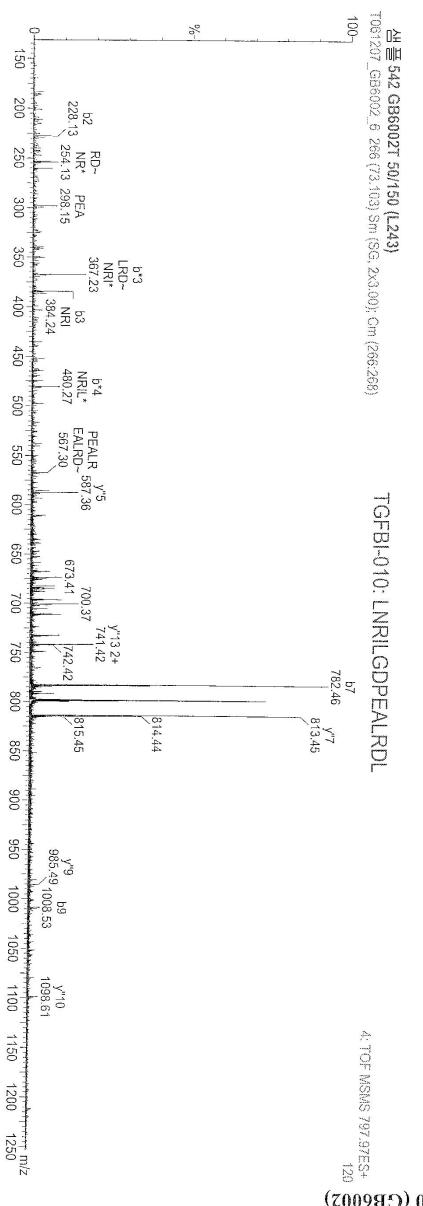


TGFB1-009:NGVIVHYIDELLIUPDS

2. TOFMSMS 849.98ES⁺
45.8

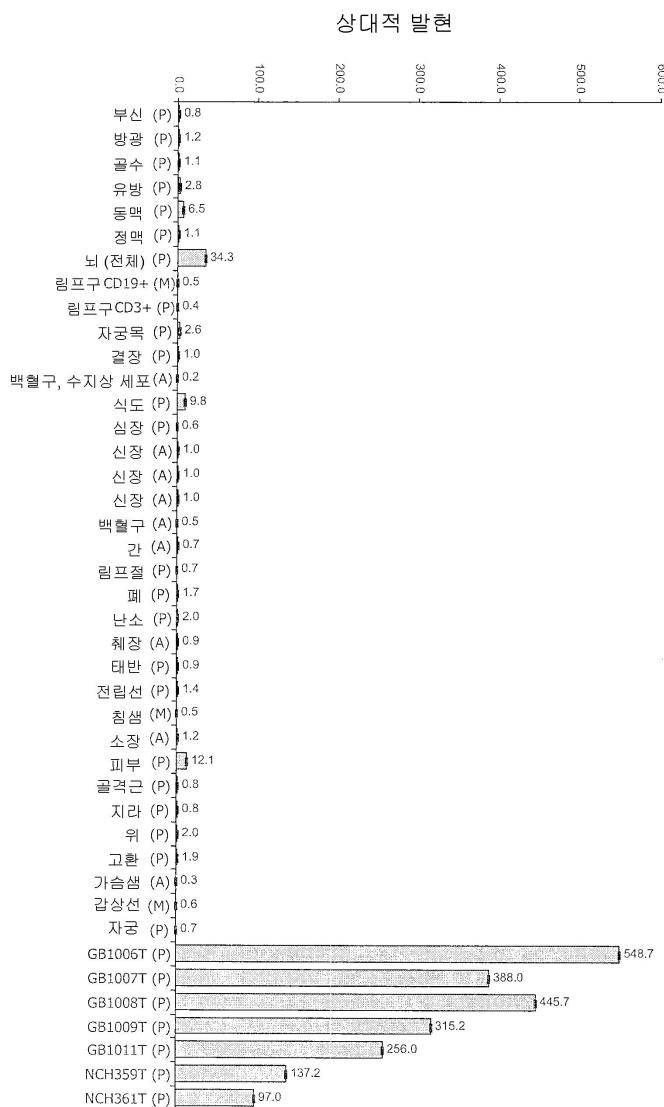
TGFB1-009 (NSCLC-Pool 1)

도면2f



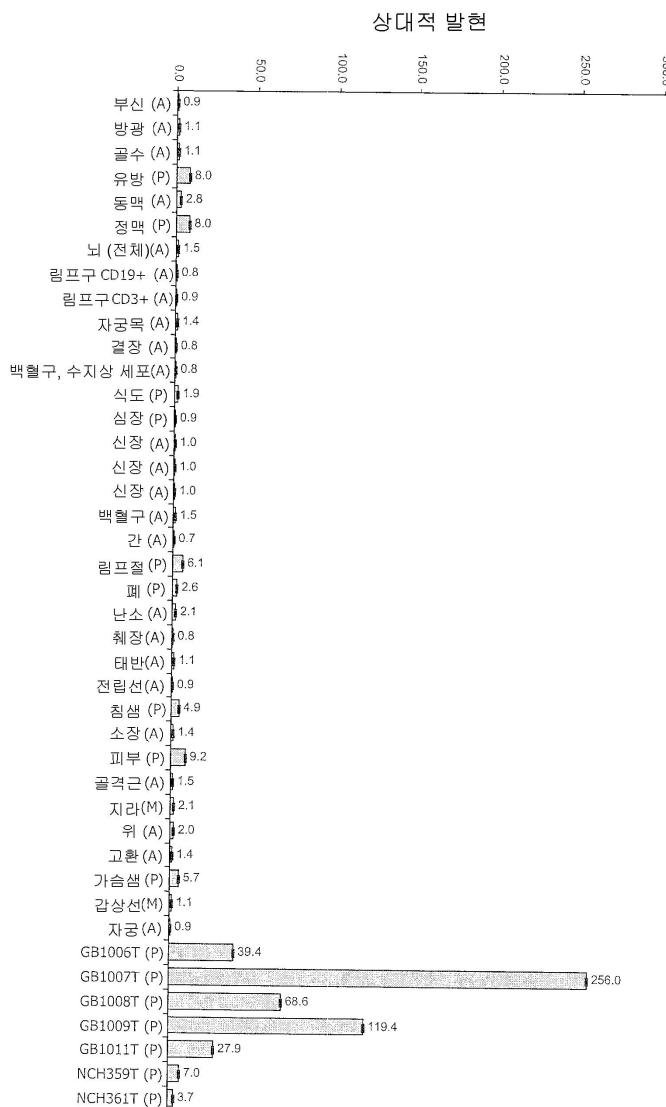
도면3a

PTP 발현 프로필



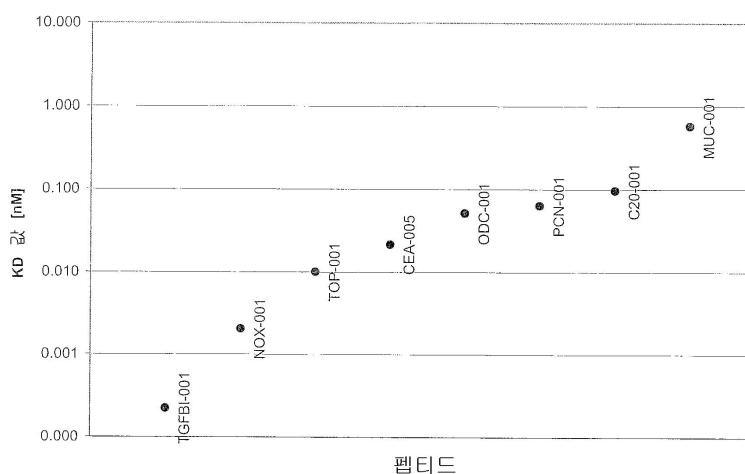
도면3b

CHI 발현 프로필

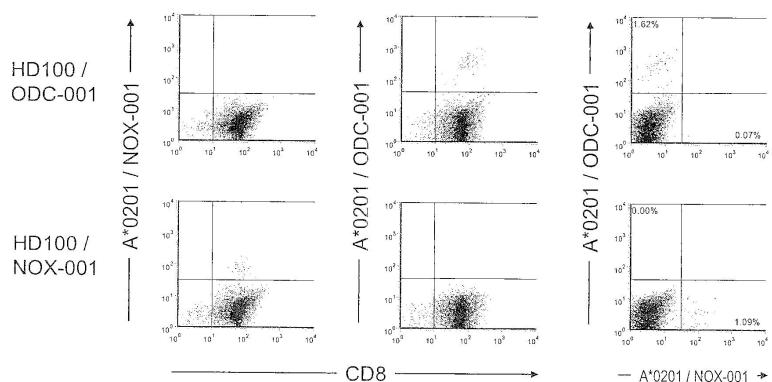


도면4

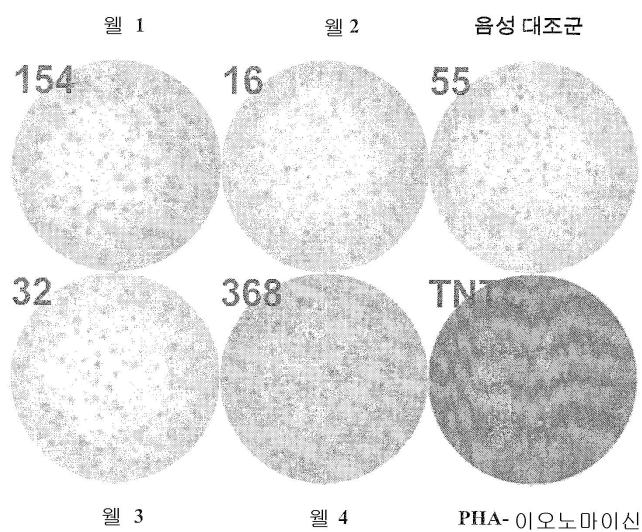
MHC I 분자 결합 친화성



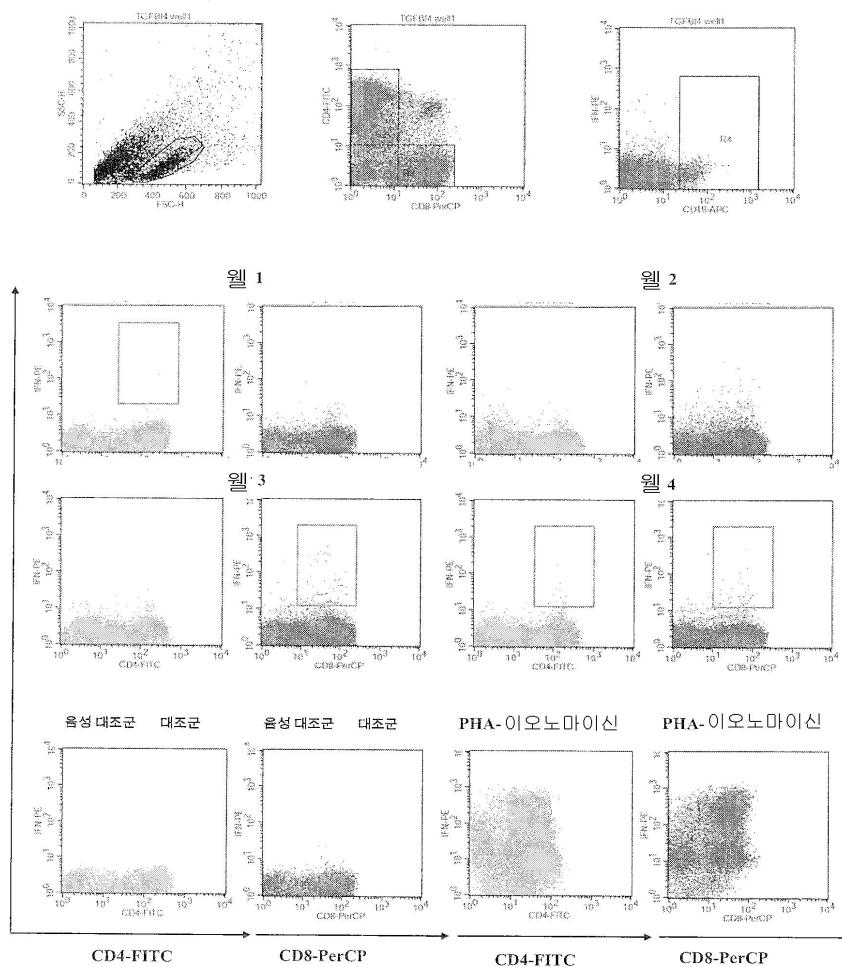
도면5



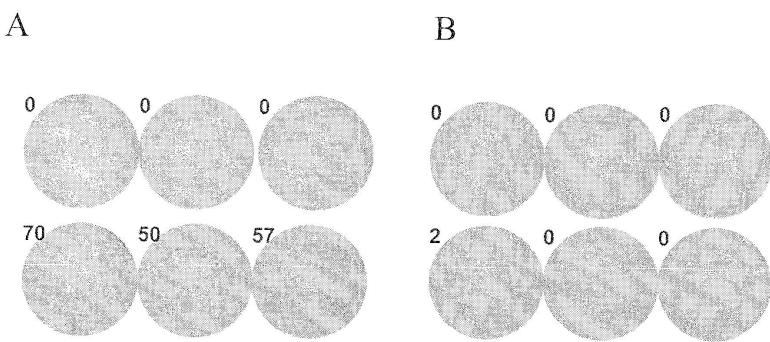
도면6



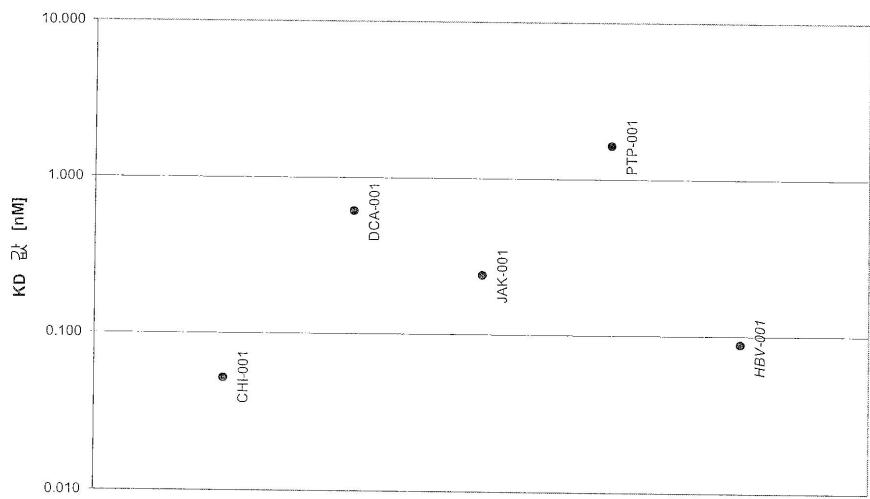
도면7



도면8



도면9



필터

서열목록

서열목록 전자파일 첨부