(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0119264
(43) 공개일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/44 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/44 (2013.01)
A61K 38/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7027024(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년06월18일
심사청구일자 2016년09월29일
(62) 원출원 특허 10-2011-7000740
원출원일자(국제) 2009년06월18일
심사청구일자 2014년06월10일
(85) 번역문제출일자 2016년09월29일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/002771
(87) 국제공개번호 WO 2009/153992
국제공개일자 2009년12월23일
(30) 우선권주장
61/074,062 2008년06월19일 미국(US)
61/197,599 2008년10월28일 미국(US)

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

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **ＣＤＣＡ１ 에피토프 펩티드 및 이를 포함하는 백신**

(57) 요 약

암에 대한 펩티드 백신이 본 명세서에 기재된다. 구체적으로, 본 발명은 CTLs을 유도하는 CDCA1으로부터 유래된 에피토프 펩티드(epitope peptide)를 기재하고 있다. 또한, 본 발명은 상기 펩티드로 펄스된 HLA-A24 양성 표적 세포를 특이적으로 인식하는 확립된 CTLs을 제공한다. 또한, 항원 제시 세포를 유도하는 방법뿐만 아니라, 상기 펩티드 중 어느 하나를 제시하는 항원 제시 세포 및 엑소솜을 제공한다. 추가로, 본 발명은 엑소솜 및 항원 제시 세포뿐만 아니라, CDCA1 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 활성 성분으로서 포함하는 약학적 제제를 제공한다. 더욱이, 본 발명은 CTLs을 유도하는 방법, CDCA1 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리펩티드를 제시하는 엑소솜 또는 항원 제시 세포, 또는 본 발명의 약학적 제제를 사용하여, 항-종양 면역력을 유도하는 방법뿐만 아니라, 암(종양)의 치료 및/또는 예방(즉, 방지), 및/또는 이의 수술 후 재발의 방지를 위한 방법을 제공한다. 표적이 되는 암은, 이에 한정되지 않지만, 유방암, 방광암, 식도암, 소세포폐암(SCLC) 및 비소세포폐암(NSCLC)을 포함한다.

(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 35 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포독성 T 림프구(CTL) 유도성을 갖는 분리된 펩티드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 그 전체의 내용이 본 명세서에 참조로서 통합되는, 2008년 6월 19일에 출원된 미국 가출원 번호 제61/074,062호, 및 2008년 10월 28일 출원된 제61/197,599호에 기반한다.

[0002] 본 발명은 생명화학 분야에 관한 것이며, 보다 구체적으로 암 치료 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 암 백신 및 종양 예방 및 치료를 위한 약물로써 매우 효과적인 신규한 펩티드에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] CD8 양성 세포독성 T림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)는 주조직적합성 복합체(MHC, major histocompatibility complex) 클래스 I 분자에서 발견되는 종양 관련 항원(TAA)으로부터 유래된 에피토프(epitope) 펩티드를 인식한 후, 상기 종양 세포를 사멸시킨다는 것이 입증되었다. TAA의 첫 번째 예로서, 멜라노마 항원(MAGE) 패밀리가 발견된 후, 주로 면역학적인 접근을 통해 많은 다른 TAA가 발견되었다(Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9). 몇몇의 이러한 TAA들은 현재 면역치료 표적으로서, 임상 개발이 진행중이다.

[0005] 강력하고, 특이적인 항종양 면역 작용을 유도할 수 있는 신규한 TAA를 동정하는 것을 다양한 암 종류를 위한 펩티드 백신 전략의 임상 활용 및 개발을 추가로 보장한다(Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94). 현재까지, 이러한 종양 관련 항원 유래 펩티드를 이용한 임상 시험에 관한 다수의 보고가 있었다. 불행히도, 매우 낮은 객관적 반응률이 현재까지 이러한 암 백신 시험에서 관찰되었다(Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15).

[0006] 이러한 TAA를 이용하는 것은 치료학적으로 유발되는 면역 선택의 결과로 TAA의 결실, 변이 또는 저발현에 기여하는 암 세포의 면역 회피의 잘 알려진 위험을 최소화할 수 있기 때문에, 암 세포의 증식 및 분화에 필수 불가결한 TAA는 면역 치료를 위한 표적으로서 매우 공격적이다.

[0007] CDCA1, 세포 분열 주기 관련 1은 CDC2, 싸이클린(cyclin), 토포이소머라제(topoisomerase) II 및 다른 것들과 같은, 세포 주기 유전자를 동시에 발현시키는 유전자 클래스의 구성원으로 동정되었다(Walker et al., Curr Cancer Drug Targets 2001 May;1(1):73-83). 특히 CDCA1은 유사분열하는 HeLa 세포의 센트로미어(centromere)와 관련되어 있음이 밝혀졌고, 이를 통해 효모 Nuf2의 기능적 상동체로 간주되고 있다(J Cell Biol 2001 Jan 22; 152(2):349-60).

[0008] 추가로, 23,040 유전자를 포함하는 게놈 와이드 cDNA 마이크로어레이를 이용한 유전자 발현 프로파일의 분석을 통해서, 또한 이러한 공개된 내용이 본 명세서에 참조로서 통합되어, CDCA1이 유방암(WO2005/028676), 방광암(WO2006/085684), 식도암(WO2007/013671), 소세포폐암(SCLC) (WO2007/013665) 및 비소세포폐암(NSCLC)(WO2005/089735)에서 상향 조절되는 신규한 분자로서 규명되었다. CDCA1의 발현은 비록 23개 정상 조직

중 정소를 제외하고 그 발현이 검출되지 않음에도 불구하고, SCLC, NSCLC 및 암세포주에서 특히 상향 조절된다. 게다가, 폐암 세포주에서 발현되는 CDCA1에서 siRNA에 의한 CDCA1 발현의 하향 조절은 세포 성장 저해를 야기한다(WO2005/089735).

[0009] 결과를 통합할 때, 이러한 결과는 CDCA1이 신규하고, 잠재적으로 보편적인 암항원(oncoantigen)임을 제시한다. 따라서, CDCA1으로부터 유래된 에피토프 펩티드는 다양한 암의 치료를 위한 암 면역치료제로 활용될 수 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0011] **발명의 요약**

[0012] 본 발명은 면역 치료법의 표적이 될 수 있는 적합한 에피토프 펩티드의 발견에 부분적으로 근거한다. CDCA1이 유방암, 방광암, 비소세포폐암, 소세포폐암 및 식도암을 포함하는 다양한 암 종에서 상향 조절되는 것으로 인식한 뒤, 본 발명은 추가 분석을 위해서 CDCA1(GenBank Accession No. NM_145697(서열번호: 34)의 유전자에 의해서 암호화되는 서열번호: 35)를 표적으로 삼았다. 구체적으로, 상응되는 분자에 대하여 특이적으로 CTL을 유도하는 에피토프 펩티드를 포함하는 CDCA1 유전자 산물들이 선택되었다. 건강한 기증자로부터 획득한 말초단핵세포(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 CDCA1 유래된 HLA-A*2402 결합 후보 펩티드를 이용하여 자극되었다. 각각의 후보 펩티드로 펄스된 HLA-A24 양성 표적 세포를 특이적으로 인식하는 CTL이 확립되었으며, CDCA1에 대하여 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 HLA-A24 제한적 에피토프 펩티드가 동정되었다. 이러한 결과들은 CDCA1이 강력한 면역원성이며, 이의 에피토프가 종양 면역 치료법을 위해서 효과적인 표적이라는 것을 나타낸다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 3, 4, 11, 14, 22 및 23중에서 선택되는 아미노산 서열뿐만 아니라, CTL 유도성을 갖는 펩티드를 제공하는 것이다. 본 발명은 변형된 펩티드가 원래의 CTL 유도성을 유지하는 한, 하나, 둘 또는 다수의 아미노산이 치환, 삽입, 결실 또는 첨가된, 서열번호 3, 4, 11, 14, 22 또는 23의 아미노산 서열을 갖는 변형된 펩티드를 고려한다.

[0014] 개체에 투여되었을 때, 본 발명의 펩티드는 항원 제시 세포 또는 엑소솜의 표면에 제시되며, 그런 다음 각각의 펩티드를 표적으로 하는 CTL을 유도한다. 따라서, 본 발명의 목적은 항원 제시 세포를 유도하는 방법뿐만 아니라, 본 발명의 펩티드 중 어느 하나를 제시하는 항원 제시 세포 및 엑소솜을 제공하는 것이다.

[0015] 항종양 면역 반응은 CDCA1 폴리펩티드를 제시하는 엑소솜 및 항원 제시 세포뿐만 아니라, 상기 CDCA1 폴리펩티드 또는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 투여에 의해서 유도된다. 따라서, 본 발명의 목적은 본 발명의 폴리펩티드 또는 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 활성 성분으로 포함하는 엑소솜 및 항원 제시 세포뿐만 아니라, 본 발명의 폴리펩티드 또는 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약학적 제제를 제공하는 것이다. 본 발명의 약학적 제제는 백신으로서 특별한 유용성을 발견한다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 CDCA1 폴리펩티드, CDCA1 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, CDCA1 폴리펩티드를 제시하는 엑소솜(exosome) 또는 항원 제시 세포 또는 본 발명의 약학적 제제를 투여하는 단계를 포함하는, CTLs 유도 방법, 항-종양 면역을 유도하는 방법뿐만 아니라, 암(종양)의 치료 및/또는 예방(즉, 방지), 및/또는 이의 수술 후 재발의 방지를 위한 방법을 제공하는 것이다. 아울러, 본 발명의 CTLs은 또한 암에 대한 백신으로서의 용도를 밝힌다. 본 발명에 의해 고려되는 암의 예로는 이에 한정되지 않으나, 유방암, 방광암, 식도암, 소세포폐암 (SCLC) 및 비소세포폐암 (NSCLC)을 포함한다.

[0017] 상기에 대하여 추가로, 본 발명의 다른 목적 및 특징은 하기의 발명의 상세한 설명을 함께 있는 도면과 실시예와 결합하여 읽을 때, 보다 명확해질 것이다. 그러나, 상기 본 발명의 요약 및 하기의 발명의 상세한 설명 모두는 내용을 예시한 것이며, 본 발명 또는 본 발명의 다른 내용이 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 본 발명은 다수의 구체적인 내용을 참조로 하여 본 명세서에 기재되어 있지만, 이러한 설명은 본 발명을 예시하는 것이며, 이는 본 발명의 제한으로 여겨지지 않는다. 다양한 변형 및 활용이 하기 첨부된 청구항에 기재된, 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않으면서, 당업자에게 일어날 수 있다. 유사하게, 본 발명의 다른 목적, 특징, 이익 및 장점은 이러한 요약 및 하기 기재된 특정 내용에 분명하게 나타났으며, 당업자에게 명백할 수 있다. 이러한 목적, 특징, 이익 및 장점은 함께 따르는 실시예, 데이타, 도면 및 이로부터 이끌어낼 수 있는 모든 합

리적인 추론, 본 명세서에 통합된 참조의 단독 또는 고려와 병합하여 명백해질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 본 발명의 다양한 측면 및 활용은 도면의 간단한 설명 및 본 발명의 상세한 설명 및 이에 따른 바람직한 실시예를 고려하면, 당업자에게 명백해질 수 있다.

[도 1] 도 1은 CDCA1으로부터 유래된 펩티드로 유도된 CTLs의 IFN-감마 ELISPOT 분석 결과를 나타내는, 일련의 그림, (a) 내지 (g)를 포함한다. CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3)(a)로 자극된 웰 번호 #8, CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4)(b)로 자극된 웰 번호 #1, CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11)(c)로 자극된 웰 번호 #1, CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14)(d)로 자극된 웰 번호 #4, CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22)(e)로 자극된 웰 번호 #2 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)(f)로 자극된 웰 번호 #2에 있는 CTLs은 각각 대조군에 비하여 강력한 IFN-감마 생성능을 나타낸다. 반대로, 펩티드 펄스된 표적 세포에 대한 특이적 IFN-감마 생성은 CDCA1-A24-10-74 (서열번호: 2)로 자극한 CTLs에서는 검출되지 않았다(g). 사각형 상자로 나타낸 상기 웰 안의 세포는 CTLs 라인을 확립하기 위하여 증폭하였다. 도면에서, "+"는 적합한 펩티드에 의해서 펄스된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생성을 나타내고, "-"는 어떠한 펩티드로도 펄스되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생성을 나타낸다.

[도 2] 도 2는 IFN-감마 ELISA 분석에서 CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3)(a), CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4)(b), CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11)(c), CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14)(d), CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22)(e) 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)(f)로 확립된 CTL 라인의 IFN-감마 ELISA 분석 결과를 나타내는 일련의 선 그래프, (a) 내지 (g)를 포함한다. 이러한 결과는 각각의 펩티드를 이용한 자극에 의해서 확립된 CTL 라인은 대조군에 비하여 강력한 IFN-감마 생성을 나타낸다는 것을 보여준다. 반대로, 펩티드 펄스된 표적 세포에 대한 특이적 IFN-감마 생성은 CDCA1-A24-10-74(서열번호: 2)로 확립한 CTL 라인으로부터 검출되지 않았다(g). 도면에서, "+"는 적합한 펩티드에 의해서 펄스된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생성을 나타내며, "-"는 어떠한 펩티드로도 펄스되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생성을 나타낸다.

도 3은 서열번호: 23으로 자극된 CTL 라인으로부터 제한된 희석을 통해 확립된 CTL 클론의 IFN-감마 생성을 나타내는 선 그래프이다. 이러한 결과는 서열번호: 23으로 자극되어 확립된 CTL 클론이 대조군과 비교하여 강력한 IFN-감마 생성을 나타낸다는 것을 보여준다. 도면에서, "+"는 서열번호: 23으로 펄스된 표적 세포에 대한 IFN-감마 생성을 나타내며, "-"는 어떠한 펩티드로도 펄스되지 않은 표적 세포에 대한 IFN-감마 생성을 나타낸다.

[도 4] 도 4는 CDCA1 및 HLA-A*2402가 외인성으로 발현되는 표적 세포에 대한 특이적 CTL 활성을 나타내는 선 그래프이다. CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)으로 확립된 상기 CTL 라인은 CDCA1 및 HLA-A*2402 모두가 형질감염된 COS7 세포에 대하여 높은 특이적 CTL 활성을 나타냈다(마름모꼴). 반대로, HLA-A*2402(삼각형) 또는 CDCA1(원형) 중 하나를 발현하는 표적 세포에 대해서는 유의적인 특이적 CTL 활성이 검출되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 비록, 본 명세서에 기재된 어떠한 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 방법 및 재료는 본 발명의 실시예를 수행 또는 검사하는데 사용될 수 있으나, 바람직한 방법, 도구, 및 재료는 여기에 기재된다. 그러나, 본 재료 및 방법이 기재되기 이전에, 본 발명은 명세서에 기재된 특정 사이즈, 모양, 부피, 재료, 방법, 프로토콜 등에 한정되지 않으며, 이들은 통상적인 실험 및 최적화에 부합하여 변형될 수 있다. 또한, 본 발명의 상세한 설명에서 사용되는 용어는 특정한 버전 또는 내용을 기술하기 위한 목적이나, 오직 첨부된 청구항으로 제한되는 본 발명의 범위로 제한하려는 의도는 아니다.

[0021] 본 명세서에서 언급된 개별 공개, 특허 또는 특허 출원의 내용은 그 전체가 명세서에 참조로서 통합된다. 그러나, 본 명세서의 어느 것도 본 발명은 이전 발명으로 인하여 선행되는 문헌의 자격이 없다는 인정으로서, 만들어지지 않는다.

[0022] I. 정의

[0023] 별도로 명시되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적, 과학적 용어는 본 발명이 속한 당업자에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그러나, 충돌이 있는 경우, 정의를 포함한 본 명세서에 따른다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 단어는 별도로 명시되지 않는 한, 단수를 의미한다.

[0025] 본 발명에서 호환적으로 사용되는 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 1개 이상의 아미노산 잔기로 된 아미노산 중합체가 변형된 잔기, 또는 천연 아미노산 중합체뿐만 아니라 천연 아미노산에 상응하는 인공 화학 모방체와 같은 비천연 잔기에 적용된다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "아미노산"은 천연 아미노산과 합성 아미노산, 및 천연 아미노산과 마찬가지로 기능하는 아미노산 유사체(analog) 및 아미노산 모방체(mimetic)를 의미한다. 천연 아미노산은 유전 코드에 의해 암호화되는 아미노산, 및 세포에서 번역 후 변형된 아미노산[예를 들면, 하이드록시프롤린(hydroxyproline), 감마-카복시글루탐산(gamma-carboxyglutamate) 및 O-포스포세린(O-phosphoserine)]이다. 상기 용어 "아미노산 유사체"는 천연 아미노산과 같은 기본적인 화학 구조(수소, 카복실기, 아미노기 및 R기에 결합하는 α탄소)를 가지고 있지만, 변형된 R기 또는 변형된 골격을 가지는 화합물을 의미한다[예를 들면, 호모세린(homoserine), 노르루신(norleucine), 메티오닌(methionine), 설폭사이드(sulfoxide), 메티오닌 메틸 설포니움(methionine methyl sulfonium)]. 상기 용어 "아미노산 모방체"는 서로 다른 구조를 갖지만, 일반적인 아미노산과 비슷한 기능이 있는 화학적 화합물을 의미한다.

[0027] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회가 권장하는, 일반적으로 알려진 3문자 상징 또는 1문자 상징에 의해 기재되어 질 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어 "유전자", "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 및 "핵산"은 따로 명시되지 않는 한, 호환적으로 사용되며, 일반적으로 인정되는 1문자 코드에 의해 기재된다.

[0029] 별도로 명시되지 않는 한, 상기 용어 "암"은 예로 유방암, 방광암, 식도암, 소세포폐암(SCLC) 및 비소세포폐암(NSCLC)이 포함되는 CDCA1 유전자를 과발현하는 암을 나타낸다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어 "세포독성 T 림프구", "세포독성 T 세포" 및 "CTL"은 따로 명시되지 않는 한, 호환적으로 사용되며, 따로 특별히 나타내지 않는 한, 비-자가 세포(예를 들면, 종양 세포, 바이러스 감염된 세포)를 인식하고 이러한 세포의 사멸을 유도하는 T 림프구의 하위 그룹을 나타낸다.

[0031] II. 펩티드(Peptides)

[0032] CDCA1로부터 유래한 펩티드가 세포 독성 T 세포(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)에 의해 인식되는 항원으로서 역할을 한다는 것을 증명하기 위하여, CDCA1로부터 유래된 펩티드(서열번호: 35)가 일반적으로 HLA 대립 유전자로 알려진, HLA-A24에 의해 한정되는 항원 에피토프인지 여부를 분석하였다(Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994). CDCA1로부터 유래된 HLA-A24 결합 펩티드 후보는 HLA-A24 에 대한 그들의 결합 친화성을 바탕으로 동정되었다. 이러한 펩티드를 담지한 수지상 세포(dendritic cells, DCs)에 의해 T 세포를 생체 외에서 자극한 후, 하기 펩티드를 각각 사용하여 CTLs을 성공적으로 확립하였다:

[0033] CDCA1-A24-10-119 (서열번호: 3),

[0034] CDCA1-A24-10-335 (서열번호: 4),

[0035] CDCA1-A24-10-48 (서열번호: 11),

[0036] CDCA1-A24-10-5 (서열번호: 14),

[0037] CDCA1-A24-9-8 (서열번호: 22),

[0038] 및

[0039] CDCA1-A24-9-56 (서열번호: 23).

[0040] 이렇게 확립된 CTLs은 각각의 펩티드로 자극된 표적 세포에 대해 강력한 특이적 CTL 활성을 보였다. 이러한 결과는 CDCA1이 CTL에 의해 인식되는 항원이고 상기 펩티드는 HLA-A24에 의해 한정되는 CDCA1의 에피토프 펩티드임을 나타낸다.

[0041] CDCA1 유전자는 유방암, 방광암, 식도암, 소세포폐암(SCLC) 및 비소세포폐암 (NSCLC)과 같은, 대부분의 암 조직에서 과발현되므로, 이것은 면역치료의 효과적인 표적임을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 CTL에 인식되는 CDCA1 유래 에피토프에 상응하는 노나펩티드(9개의 아미노산 잔기로 이루어지는 펩티드) 및 데카펩티드(10개의 아미노

산 잔기로 이루어지는 펩티드)를 제공한다. 본 발명의 노나펩티드 및 데카펩티드의 특별히 바람직한 실시예로는 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 펩티드를 포함한다.

[0042] 일반적으로, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1): 163-75에 기재된 바와 같이, 인터넷상에서 현재 사용가능한 소프트웨어 프로그램을 이용하여 컴퓨터 상(in silico)에서 다양한 펩티드와 HLA 항원 사이의 결합 친화성을 산출하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75; 및 Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81에 기재되어 있는 바에 따라, HLA 항원과의 결합 친화성을 측정할 수 있다. 결합 친화성을 측정하는 방법은, 예를 들면, Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; 및 Protein Science, 2000, 9: 1838-1846에 기재되어 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 공지된 프로그램에 의해 HLA 항원에 결합하는 것으로 확인된 CDCA1의 펩티드를 포함한다.

[0043] 본 발명의 상기 노나펩티드 및 데카펩티드는 상기 펩티드가 CTL 유도성을 유지하는 한, 부가적인 아미노산 잔기를 선택적으로 인접시킬 수 있다. CTL 유도성을 갖는 이러한 펩티드는 전형적으로는 약 40 아미노산 미만, 흔히 약 20 아미노산 미만, 보통 약 15 아미노산 미만이다. 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택된 아미노산 서열로 구성된 상기 펩티드에 인접한 특정 아미노산 서열은 원래의 펩티드의 CTL 유도성을 손상시키지 않는 한 제한되지 않고 임의의 종류의 아미노산으로 구성될 수 있다. 따라서, 또한 본 발명은 CTL 유도성 및 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 제공한다.

[0044] 일반적으로, 단백질에서 하나, 둘 또는 다수의 아미노산의 변형은 상기 단백질의 기능에 영향을 끼치지 않으며, 몇몇의 경우에는 심지어 본래 펩티드의 원하는 기능을 강화시킬 수 있다. 사실, 변형된 펩티드(즉, 본래의 참조 서열과 비교하여, 하나, 둘 또는 다수의 아미노산 잔기가 변형된(즉, 치환, 첨가, 결실 또는 삽입) 아미노산 서열로 구성되는 펩티드)는 본래 펩티드의 생물학적 활성을 유지한다고 알려지고 있다(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). 따라서, 하나의 실시예에서, 본 발명의 상기 펩티드는 CTL 유도성 및 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택되는 아미노산 서열에서 하나, 둘 또는 심지어 다수의 아미노산이 삽입, 첨가, 결실 및/또는 치환된 아미노산 서열을 모두 가질 수 있다.

[0045] 당업자는 단일 아미노산 또는 아미노산의 일부 비율이 바뀌는, 아미노산 서열 각각의 삽입 또는 치환이 본래 아미노산 측쇄의 특성을 보존하는 결과를 내는 경향이 있음을 알고 있다. 보통, 이들은 단백질의 변화가 본래 단백질과 유사한 기능을 갖는 변형된 단백질을 만드는 "보존적 치환" 또는 "보존적 변형"이라고 일컫는다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 잘 알려져 있다. 보존되는 아미노산 측쇄 특성의 예는 예를 들어, 소수성 아미노산(A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 및 하기의 작용기 또는 공통적인 특성을 갖는 측쇄가 포함된다: 지방족 측쇄(G, A, V, L, I, P); 측쇄를 포함하는 수산기 그룹(S, T, Y); 측쇄를 포함하는 황 원자(C, M); 측쇄를 포함하는 카르복실산 및 아미드(amide)(D, N, E, Q); 측쇄를 포함하는 염기(R, K, H); 및 측쇄를 포함하는 방향족(H, F, Y, W). 아울러, 하기의 8개 그룹은 각각 보존적 치환으로서 당업계에서 서로 허용될 수 있는 아미노산을 포함한다:

[0046] 1) 알라닌(A), 글라이신(G);

[0047] 2) 아스파르트산(D), 글루타민산(E);

[0048] 3) 아스파르긴(N), 글루타민(Q);

[0049] 4) 아르기닌(R), 라이신(K);

[0050] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V);

[0051] 6) 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W);

[0052] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및

[0053] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)(예를 들면, Creighton, Proteins 1984 참조).

[0054] 이러한 보존적으로 변형된 펩티드는 또한 본 발명의 펩티드로 간주된다. 그러나, 본 발명의 펩티드는 이에 한정되지 않으며 상기 변형된 펩티드가 본래 펩티드의 CTL 유도성을 유지하는 한, 비-보존적 변형을 포함할 수 있다. 더욱이, 변형된 펩티드는 CTL 유도성 펩티드의 다형성 변이, 종간 유사체(interspecies homologues), 및 CDCA1의 대립 유전자를 제외하지 않는다.

[0055] 필요한 CTL 유도성을 유지하기 위하여, 소수(예를 들어, 1, 2 또는 몇몇) 또는 적은 퍼센트의 아미노산을 변형

(삽입, 첨가, 결실 및/또는 치환)할 수 있다. 본 명세서에서, 상기 용어 "몇몇"은 5개 미만의 아미노산, 예를 들어, 3개 또는 그 이하를 의미한다. 변형된 아미노산의 퍼센트는 바람직하게 20% 미만이며, 보다 바람직하게는 15% 미만이며, 그보다 더욱 바람직하게는 10% 미만 또는 1 내지 5%이다.

[0056] 본 발명의 바람직한 펩티드의 상동성 분석은, CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3), CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4), CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11), CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14), CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22) 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)이 다른 공지의 인간 유전자 산물로부터 유래한 펩티드와 현저한 유사성을 가지고 있지 않다는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 펩티드가 면역치료를 위해 사용되었을 경우, 알려지지 않거나 원하지 않은 면역 반응을 발생시킬 수 있는 가능성은 매우 낮다. 따라서, 이러한 펩티드는 CDCA1에 대한 종양 환자의 면역력을 유도하는데 매우 유용할 것으로 예상된다.

[0057] 면역치료의 문맥으로 이용될 때, 본 발명의 펩티드는 세포 또는 엑소솜의 표면에 제시되며, 바람직하게는 HLA 항원과의 복합체로서 제시된다. 따라서, CTLs을 유도할 뿐만 아니라, 상기 HLA 항원에 대한 높은 결합 친화성을 가진 펩티드를 선택하는 것이 바람직하다. 이러한 목적을 위해서, 상기 펩티드는 증가된 결합 친화성을 갖는 변형된 펩티드를 생산하기 위하여, 아미노산 잔기들의 치환, 삽입, 결실 및/또는 첨가를 통해서 변형될 수 있다. 자연적으로 나타난 펩티드와 더불어, HLA 항원에 결합함으로써 나타나는 펩티드 서열의 규칙성은 이미 알려져 있으며(J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), 이러한 규칙성에 기반한 변형은 본 발명의 면역원성 펩티드에 도입될 수 있다. 예를 들면, HLA-A24 결합 친화도를 증가시키기 위하여, N 말단의 두 번째 아미노산을 페닐알라닌(phenylalanine), 타이로신(tyrosine), 메티오닌(methionine), 또는 트립토판(tryptophan)으로 치환, 및/또는 C 말단의 아미노산을 페닐알라닌(phenylalanine), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 트립토판(tryptophan), 또는 메티오닌(methionine)으로 치환하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 서열번호의 아미노산 서열에서 N 말단의 두 번째 아미노산이 페닐알라닌(phenylalanine), 타이로신(tyrosine), 메티오닌(methionine), 또는 트립토판(tryptophan)으로 치환, 및/또는 서열번호의 아미노산 서열에서 C 말단이 페닐알라닌(phenylalanine), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 트립토판(tryptophan), 또는 메티오닌(methionine)으로 치환된, 서열번호 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 펩티드는 본 발명에 의해서 포함된다. 치환은 마지막 아미노산에서 뿐만 아니라, 펩티드의 잠재적 TCR 인지 위치에도 도입될 수 있다. 다수의 연구에서 예를 들어 CAP1, $p53_{(264-272)}$, $Her\text{-}2/neu_{(369-377)}$ 또는 $gp100_{(209-217)}$의 펩티드에서의 아미노산 치환은 본래와 동등하거나 또는 우수하다는 것을 보였다(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 및 S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

[0058] 또한, 본 발명은 상기 펩티드의 N 및/또는 C 말단에 하나 내지 두 개의 아미노산의 첨가를 고려한다. 또한 이러한 높은 HLA 항원 결합 친화성을 가지면서 CTL 유도성을 보유하는 변형된 펩티드는 본 발명에 포함된다.

[0059] 그러나, 상기 펩티드 서열이 상이한 기능을 갖는 내인성 또는 외인성의 아미노산 서열의 일부와 동일할 경우, 특이적 물질에 대한 자가면역 질환 및/또는 알러지 증상과 같은 부작용이 유도될 수 있다. 따라서, 상기 펩티드의 서열과 일치하는 다른 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 경우를 방지하기 위하여, 우선 이용가능한 데이타베이스를 이용하여 상동성 검색을 수행하는 것이 바람직하다. 목적 펩티드와 비교하여 1개 또는 2개 아미노산의 차이가 있는 펩티드조차 존재하지 않는다는 상동성 검색 결과가 확실해진다면, 상기 목적 펩티드는 이의 HLA 항원과의 결합 친화성, 및/또는 상기와 같은 부작용의 위험이 없는 CTL 유도성을 증가시키기 위하여 변형될 수 있다.

[0060] 비록 상기 기재된 바와 같이 HLA 항원에 대한 높은 결합 친화성을 갖는 펩티드는 매우 효과적일 것으로 예상되지만, 지표로서 높은 결합 친화성의 존재에 따라 선택된 상기 후보 펩티드들은 CTL 유도성의 존재에 대해 더욱 조사된다. 여기에서, 구문 "CTL 유도성"은 항원 제시 세포에 제시될 때, 세포독성 T 림프구(CTLs)를 유도하는 펩티드의 능력을 의미한다. 나아가, "CTL 유도성"은 상기 펩타이드의 CTL 활성 유도, CTL 증식, 표적 세포의 CTL 용해 증진, 및 CTL IFN-감마 생성을 증가시키는 능력을 포함한다.

[0061] CTL 유도성의 확인은 인간 MHC 항원(예를 들면, B-림프구, 대식세포, 및 수지상 세포(DCs))을 운반하는 항원 제시 세포, 또는 보다 구체적으로 인간 말초혈액 단핵구 백혈구로부터 유래된 DC의 유도하고, 상기 펩티드로 자극한 후, CD8-양성 세포와 혼합한 다음, 표적 세포에 대하여 CTL에 의해서 생성되고 방출된 IFN-감마를 측정하는 것에 의해서 수행된다. 반응 체계로서, 인간 HLA 항원을 발현하도록 제작된 형질전환 동물(예를 들어, BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug,

61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class restricted T(H) response에 기재됨)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 표적 세포는 ^{51}Cr 등으로 방사선 표지될 수 있으며, 세포독성 활성은 상기 표적세포로부터 방출되는 방사능으로부터 산출될 수 있다. 대안적으로, CTL 유도성은 고정화된 펩티드를 운반하는 항원 제시 세포(APCs)의 존재하에 CTL에 의해서 생성되고 방출되는 IFN-감마(IFN-gamma)를 측정하고, 항-IFN-감마 단일클론 항체를 이용하여 상기 배지 내의 억제 구간을 가시화함으로써 측정할 수 있다.

[0062] 상기 기재한 바와 같이 상기 펩티드의 CTL 유도성 검사 결과, HLA 항원에 대한 높은 결합 친화성을 갖는 펩티드들은 반드시 높은 CTL 유도성을 갖지 않는다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 상기 확인되고 검사된 펩티드 가운데, 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 노나펩티드 또는 데카펩티드는, HLA 항원에 대한 높은 결합 친화성뿐만 아니라 특히 높은 CTL 유도성을 보이다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 이러한 펩티드들은 본 발명의 바람직한 실시예로서 시험된다.

[0063] 또한, 상기 기재한 변형과 더불어, 본 발명의 펩티드는 결과적으로 연결된 펩티드가 본래 펩티드의 CTL 유도성을 유지하는 한, 다른 물질들과 연결될 수 있다. 적합한 물질들은 그 예로 펩티드, 지질, 당 및 당 사슬, 아세틸기(acetyl group), 천연 및 합성 폴리머 등을 포함한다. 상기 펩티드는 본래 펩티드의 생물학적 활성을 파괴시키지 않는 한, 글리코실화(glycosylation), 측쇄 산화, 또는 인산화(phosphorylation), 등과 같은 변형을 포함할 수 있다. 이러한 종류의 변형은 추가적인 기능을 부여하기 위하여(예를 들면, 표적화 기능, 및 전달 기능), 또는 상기 폴리펩티드를 안정화시키기 위하여 수행될 수 있다.

[0064] 예를 들면, 폴리펩티드의 세포 내(in vivo) 안정성을 증가시키기 위하여, 당업계에는 D-아미노산, 아미노산 미메틱스(mimetics) 또는 비자연적인 아미노산을 도입할 수 있다는 것이 알려져 있다; 또한 이러한 개념은 본 발명의 폴리펩티드에 적용될 수 있다. 폴리펩티드의 안정성은 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 예를 들어, 펩티드가수분해효소 및 인간 혈장 및 혈청과 같은, 다양한 생물학적 배지가, 안정성을 시험하기 위하여 사용될 수 있다(예를 들면, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302 참조).

[0065] 본 발명의 펩티드는 HLA 항원과 조합된 복합체로서 세포(예를 들면, 항원 제시 세포)의 표면 또는 엑소솜에 제시된 다음 CTL을 유도한다. 따라서, 또한 세포 또는 엑소솜의 표면에 HLA 항원을 갖는 복합체를 형성하는 펩티드는 본 발명에 포함된다. 이러한 엑소솜은 바람직하게, 예를 들어 일본 특허 출원 코효(Kohyo) 공개번호 Hei 11-510507 및 WO99/03499에 기재된 방법을 이용하여 제조될 수 있으며, 치료 및/또는 예방의 대상이 되는 환자로부터 수득한 APC를 이용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 상기 펩티드를 제시하는 엑소솜 또는 세포는 백신으로서 접종될 수 있다.

[0066] 상기 복합체에 포함되는 HLA 항원의 형태는 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 개체의 HLA 항원과 반드시 일치해야한다. 예를 들면, 일본 인구에 있어서, HLA-A24, 특히 HLA-A2402가 일반적이며 따라서 일본인 환자의 치료를 위해서 적합하다. 일본인 및 백인에게 높게 발현되는 A24 형태를 이용하는 것은 효과적인 결과를 얻는데 알맞으며, 또한 A2402와 같은 서브타입의 사용을 확인하였다. 전형적으로, 임상에서는, 치료를 필요로 하는 환자의 HLA 항원 형태가 우선 검사되고, 이는 특정 학원에 대한 높은 결합 친화성 또는 항원 제시에 의해서 CTL 유도성을 갖는 펩티드의 선택에 적합하게 이용할 수 있다.

[0067] 바람직하게는 엑소솜 또는 세포에 대한 A24 형태의 HLA 항원을 사용할 경우, 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 사용된다.

[0068] 또한, 명세서에서, 본 발명의 펩티드는 "CDCA1 펩티드(들)" 또는 "CDCA1 폴리펩티드(들)"로 기재될 수 있다.

[0069] Ⅲ. CDCA1 펩티드의 제조

[0070] 본 발명의 펩티드는 공지된 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 재조합 DNA 기술 또는 화학적 합성을 사용하여, 합성적으로 제조될 수 있다. 본 발명의 펩티드는 각각 합성되거나, 둘 또는 이상의 펩티드로 구성되는 긴 폴리펩티드로서 합성될 수 있다. 이후, 상기 펩티드는 자연적으로 형성되는 숙주 세포 단백질 및, 이의 단편, 또는 다른 화학적 물질이 실질적으로 제거되도록 분리, 즉 정제될 수 있다.

[0071] 본 발명의 펩티드는 선별된 아미노산 서열을 기초로 한 화학 합성을 통해 얻어질 수 있다. 합성에 적용될 수 있는 종래 펩티드 합성 방법의 예들은 하기를 포함한다:

[0072] (i) 펩티드 합성(Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966;

[0073] (ii) 단백질(The Proteins), Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

[0074] (iii) 펩티드 합성(Peptide Synthesis)(일본어), Maruzen Co., 1975;

[0075] (iv) 펩티드 합성의 기본 및 실험(일본어), Maruzen Co., 1985;

[0076] (v) 제약 개발(두 번째 권)(일본어), Vol. 14(펩티드 합성), Hirokawa, 1991;

[0077] (vi) WO99/67288; 및

[0078] (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "고체상 펩티드 합성(Solid Phase peptide synthesis)", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

[0079] 대안적으로, 본 발명의 펩티드는 펩티드를 생산하기 위한 모든 공지된 유전 공학 기술을 적용하여 획득될 수 있다(예를 들면, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). 예를 들면, 우선, 발현할 수 있는 형태로 목적 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 적합한 벡터(예를 들면, 프로모터 서열에 상응하는 조절 서열의 하위 단계)가 제조되고 적합한 숙주 세포에 형질전환된다. 그리고 상기 숙주 세포는 관심있는 펩티드를 생산하기 위하여 배양된다. 또한, 상기 펩티드는 시험관 내 번역 체계(in vitro translation system)를 채택하여 시험관 내에서 생성될 수 있다.

[0080] IV. 폴리뉴클레오티드(Polynucleotides)

[0081] 또한, 본 발명은 상기 언급된 본 발명의 임의의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클리레오티드를 제공한다. 이들은 CDCA1 유전자의 보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 자연적으로 발생되는 CDCA1 유전자(GenBank 등록번호 NM_145697(서열번호: 34))로부터 유래되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이하, 구문 "보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열"은 동일하거나 필수적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 서열을 의미한다. 유전자 코드의 퇴화도(degeneracy)로 인하여, 대다수의 기능적으로 동일한 핵산은 특정한 단백질을 암호화한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG, 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 암호화한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해서 특정화되는 각 위치에서, 상기 코돈은 암호화되는 폴리펩티드를 변화시키지 않고 이에 상응되는 임의의 코돈으로 변화할 수 있다. 이러한 핵산 변이는 "침묵 변이(silent variation)"이며, 이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종류이다. 또한, 본 명세서에서 펩티드를 암호화하는 모든 핵산 서열은 상기 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기재한다. 일반적인 기술의 하나는 핵산 내의 각 코돈(예외 일반적으로 메티오닌(methionine)을 위한 유일한 코돈인 AUG, 및 트립토판(tryptophan)을 위한 유일한 코돈인, TGG)은 기능적으로 동일한 분자를 생산하기 위하여 변형되는 것을 인식할 수 있다. 따라서, 펩티드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 각각의 공개된 서열에 암시적으로 기재된다.

[0082] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA, 및 이의 변이체로 구성될 수 있다. DNA는 A, T, C, 및 G와 같은 염기로 적절하게 구성되며, RNA에서는 T가 U로 치환된다.

[0083] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열 사이에 삽입하거나 또는 삽입하지 않은 채로, 본 발명의 다양한 펩티드를 암호화할 수 있다. 예를 들면, 삽입하는 아미노산 서열은 폴리뉴클레오티드 또는 번역된 펩티드의 절단 위치(예, 효소 인식 서열)를 제공할 수 있다. 더욱이, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 코딩 서열에 대하여 임의의 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 펩티드의 발현을 위하여 필요한 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자 등이 있는 발현 벡터(플라스미드)일 수 있다. 일반적으로, 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 폴리머라아제(polymerase) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 이용한 종래의 재조합 기술을 통해 폴리뉴클레오티드의 조작에 의해서 제조될 수 있다.

[0084] 재조합 및 화학적 합성 기술 모두는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 생산하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드는 컴피턴트(competent) 세포로 형질감염되었을 때 발현될 수 있는, 적합한 벡터 내로 삽입함으로써 생산될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 PCR 기술을 이용하여 증폭되거나 적합한 숙주에서 발현될 수 있다(예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989 참조). 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5에 기재된 바와 같이, 고체상(solid phase) 기술을 이용하여 합성될 수 있다.

[0085] V. 항원 제시 세포(Antigen-presenting cells, APCs)

[0086] 또한, 본 발명은 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 사이에 형성된 복합체를 그 표면에 제공하고 있는 항원 제시 세포(antigen-presenting cell, APCs)를 제공한다. 본 발명의 펩티드와 접촉 또는 발현가능한 형태의 본 발명의 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드를 도입함으로써 획득되는 APCs는 치료 및/또는 예방의 대상이 되는 환자로부터 유래될 수 있으며, 그 자체로 백신으로서 투여되거나 또는 본 발명의 펩티드, 엑소솜, 또는 세포독성 T 세포를 포함하는 다른 약물과의 조합으로서 투여될 수 있다.

[0087] 상기 APC는 특정 종류의 세포에 한정되지 않으나, 림프구에 의해서 인식되기 위하여 그들의 세포 표면에 단백질 항원을 제시하는 것으로 알려져 있는, 수지상 세포(DCs), 랑게르한스 세포(Langerhans cell), 대식세포, B 세포, 및 활성화된 T 세포를 포함한다. DC는 APCs 중에서 강력한 CTL 유도 활성을 갖는 대표적인 APC이기 때문에, DCs는 본 발명의 APCs로서 사용할 수 있다.

[0088] 예를 들면, APC는 말초 혈액 단핵구로부터 유래된 DCs에 의해서 유도되고, 그런 다음 시험관 내, 생체 외(ex vivo), 또는 생체 내(in vivo)에서 본 발명의 펩티드와 접촉(자극)하여 수득될 수 있다. 본 발명의 펩티드가 상기 개체에 투여될 경우, 본 발명의 펩티드를 제시하는 APCs는 개체의 체내에서 유도된다. 구문 "APC 유도"는 HLA 항원과 본 발명의 펩티드 사이에 형성된 복합체를 세포 표면에 제시하기 위해 본 발명의 펩티드, 또는 본 발명의 상기 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드를 세포와 접촉(자극)하는 것을 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 펩티드를 상기 APCs에 도입하여, 상기 APCs가 상기 펩티드를 제시할 수 있게 한 뒤, 상기 APCs는 백신으로서 개체에 투여될 수 있다. 예를 들면, 생체 외(ex vivo) 투여는 하기의 단계를 포함한다:

[0089] a: 첫 번째 개체로부터 APCs를 수집하는 단계;

[0090] b: 단계 a의 APCs와 펩티드를 접촉시키는 단계; 및

[0091] c: 펩티드가 담지된 APCs를 두 번째 개체에 투여하는 단계.

[0092] 상기 첫 번째 개체 및 두 번째 개체는 동일한 개체일 수 있으며, 또는 다른 개체일 수도 있다. 대안적으로, 본 발명에 따르면, 항원 제시 세포를 유도하기 위한 약학적 조성물의 제조를 위한 본 발명의 펩티드의 용도가 제공된다. 또한, 본 발명은 항원 제시 세포를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공한다. 나아가, 또한 본 발명은 항원 제시 세포를 유도하기 위한 본 발명의 펩티드를 제공한다. 상기 단계(b)에서 획득한 APCs는 백신으로서 상기 개체에 투여될 수 있다.

[0093] 본 발명의 하나의 측면에 따르면, 상기 APCs는 높은 수준의 CTL 유도성을 갖는다. "높은 수준의 CTL 유도성" 용어에 있어서, 상기 높은 수준이란 펩티드와 접촉하지 않거나 CTL을 유도할 수 없는 펩티드와 접촉한 APC에 의한 CTL 유도성 수준에 대한 상대적인 것이다. 이러한 높은 수준의 CTL 유도성을 갖는 APCs는 시험관 내(in vitro)에서 본 발명의 APCs 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 전달하는 단계를 포함하는 방법에 의해서 제조될 수 있다. 상기 도입된 유전자는 DNAs 또는 RNAs 형태일 수 있다. 도입을 위한 방법의 예는, 리포펙타민(lipofection), 전기천공법(electroporation), 및 인산 칼슘(calcium phosphate) 방법과 같이, 당업계에서 일반적으로 수행되는 다양한 방법을 특정한 제한없이 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 이는 Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; Published Japanese Translation of International Publication No. 2000-509281에 기재된 바에 따라 수행될 수 있다. 상기 유전자를 APCs에 전달함으로써, 상기 유전자는 상기 세포 내에서 전사, 번역 등을 거치며, 그리고 나서 수득된 단백질은 MHC 클래스 I 또는 클래스 Ⅱ에 의해 처리되고, 펩티드를 제시하기 위하여 제시 기작(presentation pathway)을 통해서 진행된다.

[0094] VI.세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell)

[0095] 본 발명의 임의의 펩티드에 대해서 유도되는 세포독성 T 세포는 생체 내(in vivo)에서 암 세포를 표적으로 하는 면역 반응을 강화하며 따라서 펩티드 그 자체와 유사한 유형으로, 백신으로서 사용될 수 있다. 따라서, 또한, 본 발명은 본 발명의 임의의 펩티드에 의해 특이적으로 유도 또는 활성화되는 분리된 세포독성 T 세포를 제공한다.

[0096] 이러한 세포독성 T 세포는 (1) 개체에 본 발명의 펩티드를 투여하고, 개체로부터 유래된 세포독성 T 세포를 수집하거나 또는 (2) 개체 유래된 APCs 및 CD8-양성 세포, 또는 말초혈액 단핵구 백혈구를 시험관 내(in vitro)에서 본 발명의 펩티드와 접촉(자극)하고, 세포독성 T 세포를 분리함으로써 수득될 수 있다.

[0097] 본 발명의 펩티드를 제시하는 APCs로부터 자극됨으로써 유도되는, 상기 세포독성 T 세포는, 치료 및/또는 예방

의 대상이 되는 환자로부터 유래될 수 있으며, 그 자체로 투여되거나, 또는 효과를 조절하기 위한 목적으로 본 발명의 펩티드 또는 엑소좀을 포함하는 다른 약물과 조합으로 투여될 수 있다. 상기 수득된 세포독성 T 세포는 본 발명의 펩티드를 제시하는 표적세포, 예를 들면, 유도에 사용된 동일한 펩티드에 대해 특이적으로 작용한다. 상기 표적 세포는 내인성으로 CDCA1을 발현하는 세포이거나, 또는 상기 CDCA1 유전자가 형질감염된 세포일 수 있다; 그리고 상기 펩티드에 의해서 자극되기 때문에 본 발명의 펩티드를 세포 표면에 제시하는 세포는 활성화된 CTL 공격의 표적으로서도 사용할 수 있다.

[0098] VII. T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)

[0099] 또한, 본 발명은 T 세포 수용체(TCR)의 서브유닛(subunit)을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물, 및 이를 이용한 방법을 제공한다. 상기 TCR 서브유닛은 CDCA1을 제시하는 종양 세포에 대하여 T 세포의 특이성을 줄 수 있는 TCRs을 형성하는 능력을 가진다. 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 본 발명의 하나 또는 다수의 펩티드로 유도된 CTL의 TCR 서브유닛으로서 알파(alpha-) 및 베타(beta-) 사슬의 핵산이 동정될 수 있다(WO2007/032255 및 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288(2003)). TCRs의 유도체는 높은 결합 활성을 갖는 CDCA1 펩티드를 나타내는 표적 세포와 결합할 수 있으며, 선택적으로 생체 내(in vivo) 및 시험관 내(in vitro)에서 CDCA1 펩티드를 제시하는 표적 세포를 효과적으로 사멸시키는 것을 매개할 수 있다.

[0100] 상기 TCR 서브유닛을 암호화하는 핵산 서열은 예를 들면 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)와 같은 적합한 벡터 내로 도입될 수 있다. 이러한 벡터들은 당업계에 잘 알려졌다. 상기 핵산 또는 이들을 포함하는 벡터는 T 세포, 예를 들면, 환자로부터 유래한 T 세포 내로 유용하게 전이될 수 있다. 유리하게, 본 발명은 우수한 암 세포 사멸 특성을 갖는 변형된 T 세포를 신속하고 용이하게 생성하게 할 수 있도록 환자 자신의 T 세포(또는 다른 포유류의 T 세포)를 신속하게 변형시키는 규격화된 조성물을 제공한다.

[0101] 또한, 본 발명은 HLA-A24의 문맥에서, 예를 들면, 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23의 CDCA1 펩티드와 결합하는 TCR 서브유닛 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로 형질도입함으로써 제조되는 CTLs을 제공한다. 상기 형질도입된 CTLs은 생체 내의 암 세포로 귀소할 수 있으며, 공지된 시험관 내 배양 방법에 의해 증폭될 수 있다(예를 들면, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461(1989)). 본 발명의 상기 T 세포는 치료 또는 보호를 필요로 하는 환자의 암을 치료 또는 방지하는데 유용한 면역원성 조성물을 제조하는데 사용될 수 있다(WO2006/031221).

[0102] 방지 및 예방은 질환으로부터 사망 또는 질병률의 부담을 감소시킬 수 있는 임의의 활동을 포함한다. 방지 및 예방은 "첫 번째, 두 번째, 및 세 번째 방지 단계"에서 발생할 수 있다. 첫 번째 방지 및 예방은 질병의 발생을 피할 수 있는 반면, 두 번째 및 세 번째 단계의 방지 및 예방은 기능 복구 및 질환 관련된 합병증을 감소시킴으로써 이미 확립된 질환의 부정적인 효과를 감소시킬 뿐만 아니라, 질병 및 위급한 증상의 발달의 방지 및 예방에 목표를 둔다. 대안적으로, 방지 및 예방은, 예를 들면, 종양의 증식 및 전이를 감소시키는, 신생혈관억제를 감소시키는, 특정 질환의 심화를 경감시키는 것을 목적으로 하는 다양한 종류의 예방적 치료법을 포함한다.

[0103] 암의 치료 및/또는 예방 또는, 및/또는 이의 수술후 재발의 방지는 암 세포의 수술적 제거, 암성 세포 성장의 억제, 종양의 퇴화 또는 퇴행, 암 발생의 차도 및 억제의 유도, 종양 감소, 및 전이의 감소 또는 억제와 같은 하기의 단계의 임의의 것을 포함한다. 효과적으로 암을 치료 및/또는 예방하는 것은 사망률을 감소시키고, 암을 가진 개인의 예후를 개선시키며, 혈액 내 종양 마커의 수준을 감소시키며, 암에 동반되는 지각할 수 있는 증상들을 감소시킨다. 예를 들면, 증상의 감소 또는 개선은 효과적으로 치료를 구성하며 및/또는 상기 예방은 10%, 20%, 30% 또는 그 이상의 감소, 또는 안정적인 질환을 포함한다.

[0104] VIII. 약학적 제제 또는 조성물

[0105] CDCA1 발현은 정상 조직에 비해서 유방암, 방광암, 식도암, 소세포폐암(SCLC) 및 비소세포폐암(NSCLC)을 포함한, 다양한 암 종에서 특이적으로 증가하므로(Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21):10339-48, WO2005/028676, WO2005/089735, WO2006/085684, WO2007/013665, WO2007/013671), 본 발명의 펩티드 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방, 및/또는 수술 후 재발을 방지하기 위해서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 암 또는 종양의 치료 및/또는 예방, 및/또는 이의 수술 후 재발을 방지하는 약학적 제제 또는 조성물을 제공하며, 이는 하나 또는 다수의 본 발명의 펩티드, 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 활성 성분으로 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 펩티드는 상기 엑소좀 또는 약학적 제제 또는 조성물로서 사용되는 APCs와 같은 세포의 임의의 표면에서 발현될 수 있다. 추가로, 상기 언급한 본 발명의

임의의 펩티드를 표적으로 하는 세포독성 T 세포는 또한 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물의 활성 성분으로서 사용될 수 있다.

[0106] 또한, 또 다른 실시예에서, 본 발명은 암 또는 종양의 치료를 위한 약학적 조성물 또는 약제를 제조하는데 있어서, 하기 중 선택되는 활성 성분의 용도를 제공한다:

[0107] (a) 본 발명의 펩티드,

[0108] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 기재된 펩티드를 암호화하는 핵산,

[0109] (c) 본 발명의 APC 또는 본 발명의 펩티드를 그 표면으로 제시하는 엑소솜, 및

[0110] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0111] 대안적으로, 본 발명은 암 또는 종양을 치료하는데 사용하기 위한 하기 중 선택되는 활성 성분을 추가로 제공한다:

[0112] (a) 본 발명의 펩티드,

[0113] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 기재된 펩티드를 암호화하는 핵산,

[0114] (c) 본 발명의 APC 또는 본 발명의 펩티드를 그 표면으로 제시하는 엑소솜, 및

[0115] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0116] 대안적으로, 본 발명은 활성 성분으로서 하기 중 선택되는 활성 성분과 약학적 또는 생리학적으로 허용가능한 담체를 제형화하는 단계를 포함하는, 암 또는 종양을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 제제를 제조하는 방법 또는 과정을 추가로 제공한다:

[0117] (a) 본 발명의 펩티드,

[0118] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 기재된 펩티드를 암호화하는 핵산,

[0119] (c) 본 발명의 APC 또는 본 발명의 펩티드를 그 표면으로 제시하는 엑소솜, 및

[0120] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0121] 또한, 또 다른 실시예에서, 본 발명은 하기 중 선택되는 활성 성분과 약학적 또는 생리학적으로 허용가능한 담체를 상기 활성 성분과 혼합하는 단계를 포함하는, 암 또는 종양을 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 약제를 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공한다:

[0122] (a) 본 발명의 펩티드,

[0123] (b) 발현할 수 있는 형태로 본 명세서에 기재된 펩티드를 암호화하는 핵산,

[0124] (c) 본 발명의 APC 또는 본 발명의 펩티드를 그 표면으로 제시하는 엑소솜, 및

[0125] (d) 본 발명의 세포독성 T 세포.

[0126] 대안적으로, 상기 본 발명의 약학적 조성물 또는 약제는 암 또는 종양의 예방 및 이의 수술 후 재발을 방지하기 위한 방법 중 어느 하나 또는 둘 모두를 위해서 사용될 수 있다.

[0127] 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 백신으로서의 용도를 확인하였다. 본 발명의 문맥에 있어서, 상기 구문 "백신"("면역원성 조성물"도 의미함)은 동물에 주사되어 항종양 면역력을 유도하는 기능을 갖는 물질을 일컫는다.

[0128] 상기 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 암 또는 종양의 치료 및/또는 방지에 사용될 수 있으며, 및/또는 개체 또는 인간을 포함한 환자 및 특히 산업적으로 중요한 동물 또는 가축 동물인, 마우스, 쥐, 기니아 피그(guinea-pig), 토끼, 고양이, 개, 양, 염소, 돼지, 소, 말, 원숭이, 비비원숭이(baboon), 및 침팬지에 한정하지 않지만, 이를 포함하는 임의의 다른 포유류 동물에서 이의 수술 후 재발을 방지하는데 사용될 수 있다.

[0129] 본 발명에 따르면, 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 HLA-A24 제한적 에피토프 펩티드 또는 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 후보자라는 것을 발견하였다. 따라서, 서열번호: 3, 4, 11, 14, 22 및 23의 아미노산 서열을 갖는 이러한 임의의 폴리펩티드를 포함하는 본 발명의 약학적 제제는 특히 HLA 항원이 HLA-A24인 개체에 투여되는 것이 더욱 적합하다. 동일한 것이 이

러한 폴리펩티드의 어느 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 제제 또는 조성물에 적용된다.

[0130] 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물에 의해서 치료되어야 하는 암 또는 종양은 CDCA1이 관련된, 예를 들면, 유방암, 방광암, 식도암, 소세포폐암(SCLC) 및 비소세포폐암(NSCLC)을 포함하는 모든 종류의 암 또는 종양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0131] 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 추가로 상기 언급한 활성 성분, 암성 세포에 대하여 CTL을 유도할 수 있는 능력이 가진 다른 펩티드, 상기 다른 펩티드를 암호화하는 다른 폴리뉴클레오티드, 상기 다른 펩티드를 제시하는 다른 세포 등을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, 암성 세포에 대하여 CTL을 유도할 수 있는 능력을 갖는 상기 다른 펩티드는 암 특이적 항원(예를 들면, 동정된 TAAs)에 의해서 예시화되나, 이에 한정되지 않는다.

[0132] 만약 필요하다면, 본 발명의 상기 약학적 제제 또는 조성물은 예를 들면, 본 발명의 임의의 펩티드와 같이, 물질이 활성 성분의 항종양 효과를 저해하지 않는 한, 선택적으로 활성 성분으로서 다른 치료학적 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 제형은 항염증성 약제, 진통제, 화학요법제 등을 포함할 수 있다. 약제 자체 내의 다른 치료학적 물질을 포함하는 것에 추가로, 본 발명의 상기 약제는 또한 하나 또는 다수의 다른 약학적 제제와 연속적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 약제 및 약학적 제제의 양은 예를 들면, 어떤 종류의 약학적 제제(들)가 사용되었는지, 치료되어야 할 질환, 및 투여 일정 및 경로 등에 따른다.

[0133] 특히, 본 명세서에 언급된 성분에 추가로, 본 발명의 상기 약학적 제제 또는 조성물은 논의가 되는 형태의 제형을 갖는 당업계의 종래 다른 제제를 포함할 수 있다고 이해된다.

[0134] 본 발명의 하나의 실시예에서, 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 제조의 물품 및 예를 들면, 암과 같은 치료될 질환의 병리학적인 조건을 치료하는데 유용한 물질을 포함하는 키트에 포함될 수 있다. 상기 제조의 물품은 라벨(label)을 갖는 본 발명의 임의의 약학적 제제 또는 조성물의 용기(container)를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 병, 바이얼(vial), 및 테스트 튜브를 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플리스틱과 같은, 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 상기 용기 위의 라벨은 상기 약제가 하나 또는 다수 조건의 질병의 치료 또는 예방을 위해서 사용된다는 것을 나타내야 한다. 또한, 상기 라벨은 투여 등에 대한 지시를 나타낼 수 있다.

[0135] 상기 기재된 용기에 추가적으로, 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물을 포함하는 키트는 약학적으로 허용가능한 희석제가 들어 있는 두 번째 용기를 선택적으로 추가하여 포함할 수 있다. 이는 다른 버퍼, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 이용을 위한 지시가 있는 사용 설명서를 포함하는 상업적 및 사용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0136] 상기 약학적 제제 또는 조성물은, 가능하다면, 활성 성분을 포함하는 하나 또는 다수의 유닛 복용량 형태를 포함하는 팩(pack) 또는 디스펜서(dispenser) 장치에 제시될 수 있다. 상기 팩은, 예를 들면, 금속 또는 브리스터 팩(blister pack)과 같은, 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 투여를 위한 지시서와 수반될 수 있다.

[0137] (1) 활성 성분으로서 상기 펩티드를 포함하는 약학적 제제 또는 조성물

[0138] 본 발명의 상기 펩티드는 약학적 제제 또는 조성물로서, 만약 필요하다면, 종래의 제형 방법에 의해서 제형화된 것으로 직접적으로 투여될 수 있다. 후자의 경우, 본 발명의 펩티드에 추가로, 약물에 일반적으로 사용되는 담체, 첨가제 등을 특정한 제한 없이 포함할 수 있다. 이러한 담체의 예는 멸균수, 생리식염수, 인산 완충액, 배양액 등이 있다. 더욱이, 상기 약학적 제제 또는 조성물은 필요에 따라, 안정화제(stabilizer), 현탁액(suspension), 보존제(preservative), 계면활성제(surfactant) 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 제제 또는 조성물은 항암 목적으로 사용될 수 있다.

[0139] 본 발명의 펩티드는 생체 내(in vivo)에서 CTL을 유도하기 위하여, 본 발명의 펩티드 둘 또는 그 이상으로 구성된 조합으로서 제조될 수 있다. 상기 펩티드 조합은 칵테일(cocktail)의 형태를 취할 수 있으며 또는 표준 기술을 이용하여 서로 결합될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 화학적으로 연결되거나 또는 단일 융합 폴리펩티드 서열로서 발현될 수 있다. 상기 조합 내의 펩티드는 동일하거나 다를 수 있다.

[0140] 본 발명의 펩티드를 투여함으로써, 상기 펩티드는 APCs의 HLA 항원에 의하여 높은 농도로 제시된 뒤, 상기 나타난 펩티드와 HLA 항원 사이에 형성된 복합체에 대하여 특이적으로 반응하는 CTL이 유도된다. 대안적으로, 본 발명의 펩티드로 개체로부터 유래된 APCs(예를 들면, DCs)의 자극에 의해 수득될 수 있는, 본 발명의 임의의 펩티드를 그 세포 표면에 제시하는 APCs는 개체에 투여될 수 있고, 그 결과, CTLs이 개체내에서 유도되고 암 세포에 대한 공격성이 증가할 수 있다.

[0141] 또한, 본 발명의 펩티드를 활성 성분으로 포함하는, 암 또는 종양의 치료 및/또는 방지를 위한 약학적 제제 또는 조성물은, 세포의 면역력을 효과적으로 확립시킨다고 알려진 보조제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 약학적 제제 또는 조성물은 다른 활성 성분과 함께 투여되거나 또는 과립으로 제조되어 투여될 수 있다. 보조제는 면역학적 활성을 갖는 단백질과 함께(또는 연속적으로) 투여되었을 때 상기 단백질에 대한 면역 반응을 강화시키는 화합물을 일컫는다. 본 명세서에서 보조제는 하기의 문헌에 기재된 바를 포함한다(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). 적합한 보조제의 예로는 인산 알루미늄(aluminum phosphate), 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide), 명반(alum), 콜레라 독소(cholera toxin), 살모넬라 독소(salmonella toxin) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0142] 더욱이, 상기 펩티드가 미세한 마이크로미터 직경의 비드에 결합되어 있는 리포솜(liposome) 제형, 과립 제형, 및 지질이 상기 펩티드에 결합되어 있는 제형이 일반적으로 사용될 수 있다.

[0143] 일부 실시예에서, 상기 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 CTL을 개시하는(prime) 성분을 추가로 포함할 수 있다. 지질은 생체 내에서 바이러스 항원에서 CTL을 개시할 수 있는 제제로서 확인되었다. 예를 들면, 팔미트산(palmitic acid) 잔기는 엡실론(epsilon) -및 라이신 잔기의 알파-아미노 그룹에 붙을 수 있으며, 그 뒤 본 발명의 펩티드에 연결될 수 있다. 상기 리피드 펩티드는 그런 다음 리포솜에 결합되거나, 또는 보조제에 유화되어 미셀(micelle) 또는 입자(particle)로 직접적으로 투여될 수 있다. CTL 반응의 리피드 제조의 또 다른 예로서, 트리팔미토일-S-글리세릴시스테인리세릴-세린(tripalmitoyl-S-glycerylcysteinlyseryl-serine, P3CSS)과 같은 E. coli 지질단백질은 적절한 펩티드에 공유 결합되었을 때, CTL을 개시하는데 사용될 수 있다(예를 들면, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4 참조).

[0144] 투여의 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 등, 및 표적 위치에 근접한 곳에 전신 투여 또는 국소 투여할 수 있다. 상기 투여는 단일 투여 또는 다수의 투여에 의해서 부스팅되어 수행될 수 있다. 본 발명의 펩티드의 복용량은 치료되는 질병, 환자의 나이, 체중, 투여 방법 등에 따라 적절하게 조절될 수 있으며, 보통 0.001 ㎎ 내지 1000 ㎎, 예를 들면, 0.001 ㎎ 내지 1000 ㎎, 예를 들면, 0.1 ㎎ 내지 10 ㎎이며, 며칠 내지 몇 달에 한 번씩 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 복용량을 적절하게 선택할 수 있다.

[0145] (2) 유효 성분으로서 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 제제 또는 조성물

[0146] 또한, 상기 본 발명의 약학적 제제 또는 조성물은 본 명세서에 기재된 발현할 수 있는 형태의 펩티드를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 여기서, 상기 구문 "발현할 수 있는 형태"는 상기 폴리뉴클레오티드가 세포에 도입되었을 때, 항종양 면역력을 유도하는 폴리뉴클레오티드로서 생체 내(in vivo)에서 발현할 수 있음을 의미한다. 예시된 실시예에서, 관심있는 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열은 상기 폴리뉴클레오티드의 발현에 필요한 조절 요소(regulatory element)를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드(들)는 표적 세포의 게놈 내에 안정적으로 삽입되기 위하여 구비될 수 있다(예를 들면, 상동성 재조합 카세트 벡터에 대한 기술을 위한 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 참조). 예를 들면, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 미국 특허 제 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 및 WO 98/04720을 참조한다. DNA 기반한 전달 기술의 예로는 "네이키드 DNA(naked DNA)", 촉진된(부피바카인(bupivacaine), 폴리머(polymer), 펩티드-매개) 전달, 양이온성 지질 복합체, 및 입자-매게("유전자 총(gene gun)") 또는 압력-매개 전달(예를 들면, 미국 출원 제 5,922,687호 참조)을 포함한다.

[0147] 또한, 본 발명의 펩티드는 바이러스 또는 박테리아 벡터에 의해서 발현될 수 있다. 발현 벡터의 예는 백시니아(vaccinia) 또는 계두(fowlpox)와 같은 강화된 바이러스 숙주를 포함한다. 이러한 접근은, 예를 들면, 상기 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터와 같은, 백시니아 바이러스의 이용을 수반한다. 숙주에 도입한 후, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 상기 면역원성 펩티드를 발현하고, 이로 인하여 면역 반응이 유발된다. 면역화 프로토콜에 있어서 유용한 백시니아 벡터 및 방법은 예를 들면, 미국 특허 제 4,722,848호에 기재된다. 또 다른 벡터는 BCG(Bacille Calmette Guerin)이다. BCG 벡터는 Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60에 기재된다. 치료학적 투여 또는 면역화에 유용한 다양한 다른 벡터, 예를 들면, 아데노(adeno) 및 아데노 관련(adeno-associated) 바이러스 벡터, 레트로바이러스(retroviral) 벡터, 살모넬라 티피(Salmonella typhi) 벡터, 무독화시킨 탄저균 독소(detoxified anthrax toxin) 벡터 등이 명백할 것이다. 예를 들면, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85를 참조한다.

[0148] 폴리뉴클레오티드의 환자에게로의 전달은, 상기 환자가 폴리뉴클레오티드를 운반하는 벡터에 직접적으로 노출되는 직접적, 또는 세포가 우선 시험관 내에서 관심있는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 형질전환된 후, 상기 세포

를 개체에게 이식하는 간접적으로 될 수 있다. 이러한 두 가지 접근은 각각 생체 내(in vivo) 및 생체 외(ex vivo) 유전자 치료법으로서 알려져 있다.

[0149] 유전자 치료 방법에 대한 일반적인 리뷰는, Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215를 참조한다. 본 발명에서 또한 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술 분야의 일반적으로 알려진 방법은 eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 및 Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990에 기재된다.

[0150] 투여의 방법은 경구, 피내, 피하, 정맥 주사 등을 할 수 있으며, 표적 위치에 근접한 곳에 전신 투여 또는 국소 투여의 용도를 발견한다. 상기 투여는 단일 투여 또는 다수의 투여에 의해서 부스팅되어 수행될 수 있다. 적합한 수용체 내 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포의 양은 치료되는 질병, 환자의 나이, 체중, 투여 방법 등에 따라 적절하게 조절될 수 있으며, 보통 0.001 ㎎ 내지 1000 ㎎이며, 예를 들면, 0.001 ㎎ 내지 1000 ㎎, 예를 들면, 0.1 ㎎ 내지 10 ㎎이며, 며칠 내지 몇 달에 한 번씩 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 복용량을 적절하게 선택할 수 있다.

[0151] <u>Ⅸ. 펩티드, 엑소솜, APCs 및 CTLs을 사용한 방법</u>

[0152] 본 발명의 펩티드 및 이러한 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 APCs 및 CTLs을 유도하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 엑소솜 및 APCs는 CTLs을 유도하는데 사용될 수 있다. 상기 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 엑소솜 및 APCs는 화합물이 이들의 CTL 유도성을 억제하지 않는 한, 임의의 다른 화합물과 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 언급한 임의의 약학적 제제 또는 조성물은 CTLs을 유도하는데 사용될 수 있으며, 이에 추가적으로, 상기 펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 제제 또는 조성물은 또한 하기 기재된 APCs를 유도하는데 사용될 수 있다.

[0153] (1) 항원 제시 세포(APCs)를 유도하는 방법

[0154] 본 발명은 본 발명의 펩티드 또는 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 APCs를 유도하는 방법을 제공한다. 상기 APCs의 유도는 "Ⅵ. 항원 제시 세포" 부분에 기재된 바에 따라 수행될 수 있다. 또한, 본 발명은 높은 수준의 CTL 유도성을 갖는 APCs를 유도하는 방법을 제공하며, 상기 유도성은 또한 "Ⅵ. 항원 제시 세포"의 항목하에 언급되었다.

[0155] (2) CTLs을 유도하는 방법

[0156] 더욱이, 본 발명은 본 발명의 펩티드, 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 엑소솜 또는 상기 펩티드를 제시하는 APCs를 사용하여 CTLs을 유도하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 상기 펩티드 및 HLA 항원의 복합체를 인식하는 T 세포 수용체(TCR) 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 CTLs을 유도하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, CTLs을 유도하는 방법은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 단계를 포함한다:

[0157] a: CD8-양성 T 세포를 HLA 항원과 본 발명의 상기 펩티드의 복합체를 그 표면에 제시하는 항원 제시 세포 및/또는 엑소솜과 접촉하는 단계, 및

[0158] b. 본 발명의 상기 펩티드와 HLA 항원의 복합체를 인식하는 TCR 서브유닛을 형성할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 CD8 양성 T 세포내로 도입하는 단계.

[0159] 본 발명의 펩티드를 개체에 투여하였을 때, CTL은 개체의 체내에서 유도되며, 상기 종양 세포를 표적하는 면역반응의 힘을 강화시킨다. 대안적으로, 상기 펩티드 및 상기 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 생체 외(ex vivo) 치료 방법으로 사용될 수 있으며, 이는 개체 유래 APCs 및 CD8-양성 세포, 또는 말초혈액 단핵구 백혈구를 시험관 내에서 본 발명의 펩티드를 이용하여 접촉(자극)하고, CTL을 유도한 후, 상기 활성화된 CTL 세포는 개체로 돌아온다. 예를 들면, 상기 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0160] a: 개체로부터 APCs를 수집하는 단계;

[0161] b: 단계 a의 APCs와, 상기 펩티드를 접촉시키는 단계;

[0162] c: 단계 b의 APCs와 CD^{8+} T 세포를 혼합하고, CTLs을 유도하기 위하여 공동 배양하는 단계; 및

[0163] d: 단계 c의 공동 배양으로부터 CD^{8+} T 세포를 수집하는 단계.

[0164] 대안적으로, 본 발명에 따르면, CTLs을 유도하는 약학적 제제 또는 조성물을 제조하기 위한 본 발명의 펩티드의 용도가 제공된다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용가능한 수용체를 함께 혼합하거나 제형화하는 단계를 포함한, CTLs을 유도하는 약학적 제제 또는 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 과정을 제공한다. 더욱이, 본 발명은 또한 CTLs을 유도하기 위한 본 발명의 펩티드를 제공한다.

[0165] 단계 d에 의해 수득된 세포독성 활성을 갖는 상기 CD^{8+} T 세포는 백신으로서 개체에 투여될 수 있다. 또한, 상기 단계 c에서 상기 CD^{8+} T 세포와 혼합된 APCs는 상기 "VI. 항원 제시 세포" 부분에 기재된 바와 같이, 본 발명의 펩티드를 암호화하는 유전자를 APCs 내로 전이시킴으로써 제조될 수 있으나; 이에 한정되지 않는다. 따라서, 본 발명의 펩티드를 효과적으로 제시하는 임의의 APC 또는 엑소솜은 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

[0166] 하기 실시예들은 본 발명을 예시하고, 당업자가 이를 만들고 사용하는 것을 도와주기 위하여 제시된다. 이러한 실시예는 본 발명의 범위를 어느 방법으로든 한정하려는 의도가 아니다.

[0167] **실시예**

[0168] 재료 및 방법

[0169] 세포주

[0170] A24 림포블라스토이드 세포주(A24 lymphoblastoid cell line, A24LCL) 세포는 엡스테인 바(Epstein-bar) 바이러스를 HLA-A24 양성 인간 B 림프구에 형질전환함으로써 확립하였다.

[0171] CDCA1로부터 유래된 펩티드의 후보자 선택

[0172] HLA-A*2402에 결합하는 CDCA1으로부터 유래된 9머(9-mer) 및 10-머(10-mer) 펩티드는 결합 예측 소프트웨어 "BIMAS"(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)를 사용하여 측정되었으며, 이 알고리즘은 Parker KC et al.(J Immunol 1994, 152(1): 163-75) 및 Kuzushima K et al.(Blood 2001, 98(6): 1872-81)에 기재되어 있다. 이러한 펩티드는 표준 고체상 합성 방법에 따라 American Peptide Company Inc. (Sunnyvale, CA)에 의해서 합성되었으며, 역상 고속액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatographym, HPLC)에 의해서 정제되었다. 상기 펩티드의 순도(>90%) 및 동정은 각각 분석적인 HPLC 및 질량분석법 분석에 의하여 측정되었다. 펩티드는 20 mg/㎖ 디메틸폭시화물(dimethylsulfoxide, DMSO)에 녹인 뒤 -80℃에 보관하였다.

[0173] 시험관 내(In vitro) CTL 유도

[0174] 단핵구 유래 수지상 세포(DCs)는 인간 백혈구 항원(HLA)에 제시된 펩티드에 대하여 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 유도하기 위하여, 항원 지시 세포(APCs)로서 사용되었다. DCs는 하기 기재된 바와 같이 시험관 내에서 생성되었다(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). 구체적으로, 정상 지원자(HLA-A*2402 양성)로부터 피콜-플라크(Ficoll-Plaque)(Pharmacia) 용액에 의해서 분리된 말초 혈액 단핵구 세포(PBMCs)는 단핵구 분획을 강화시키기 위하여, 플라스틱 조직 배양 디쉬(Becton Dickinson)에 부착에 의해서 분리하였다. 상기 단핵구가 강화된 집단은 2% 열-불활성화 자가조직 유래의 혈청(AS)을 포함하는 AIM-V 배지(Invitrogen)에서 과립구-대식세포 콜리니-자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)(R&D System) 1000 U/㎖ 및 인터루킨(interleukin, IL)-4(R&D System) 1000 U/㎖의 존재하에 배양되었다. 배양 7일 후, 상기 사이토카인 유도된 DCs는 37℃에서 3시간 동안 베타 2-마이크로불린(beta2-microglobulin) 3 micro g/㎖의 존재하에 AIM-V 배지에서 20 micro g/㎖의 각각의 합성된 펩티드를 사용하여 펄스되었다. 상기 생성된 세포는 이러한 세포의 표면에, CD80, CD83, CD86 및 HLA 클래스 Ⅱ와 같은 DC-관련된 분자를 발현한다고 나타났다(결과는 보이지 않음). 그리고 이러한 펩티드 펄스된 DCs는 미토마이신 C(Mitomycin C, MMC)(30분 동안 30 micro g/㎖)에 의해서 비활성화되었으며 CD8 양성 분리 키트(Dynal)를 이용한 양성 선택에 의해서 획득된, 자가 조직의 CD8+ T 세포와 1:20의 비율로 혼합되었다. 이러한 배양은 48-웰 플레이트(Corning)에 셋팅되었다; 각각의 웰에는 1.5×10^4 펩티드 펄스된 DCs, 3×10^5 CD8+ T 세포 및 10 ng/㎖ IL-7(R&D System)이 있는 0.5 ㎖ AIM-V/2% AS 배지가 포함되었다. 3일이 지난 후, 이러한 배양은 최종 농도가 20 IU/㎖이 되도록 IL-2(CHIRON)을 첨가하였다. 7일 및 14일에, 상기 T 세포는 상기 자가의 펩티드 펄스된 DCs를 사용하여 추가적으로 자극되었다. 상기 DCs는 상기 기재된 방법에 의해서 매번 제조되었다. CTL은 21일째 펩티드 자극 3

회 이후, 펩티드 펄스된 A24LCL 세포에 대하여 실험하였다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0175] CTL 증폭 과정

[0176] CTLs은 Riddell et al.에 의해서 기재된 방법과 유사한 방법을 사용하여, 배양액에서 증폭되었다(Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). 전체 5 × 10^4 CTLs은 항-CD3 단일클론 항체(Pharmingen) 40 ng/㎖의 존재하에서, MMC에 의해서 비활성화된 2 종류의 인간 B-림포블라스토이드(lymphoblastoid) 세포주를 이용하여 AIM-V/5% AS 배지 25 ㎖에 현탁하였다. 상기 배양 시작 이후 첫째 날, IL-2 120 IU/㎖을 상기 배양액에 첨가하였다. 상기 배양액은 5, 8 및 11일에, IL-2 30 IU/㎖을 포함하는 신선한 AIM-V/5% AS 배지가 공급되었다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0177] CTL 클론의 확립

[0178] 96 둥근 바닥 마이크로 타이터 플레이트(96 round-bottomed micro titer plate)(Nalge Nunc International)에 0.3, 1, 및 3 CTLs/웰이 되도록 희석하였다. CTLs은 5% AS가 포함된 총 150 micro l/웰의 AIM-V 배지에서 1 × 10^4 세포수/웰의 2 종류의 인간 B-림포블라스토이드 세포주, 항-CD3 항체 30 ng/㎖ 및 IL-2 125 U/㎖과 함께 배양하였다. 125 U/㎖ IL-2로 최종 농도를 맞추기 위하여 10일 뒤 50 micro l/웰의 IL-2를 상기 배지에 첨가하였다. CTL 활성은 14일째 날에 측정하였고, CTL 클론은 상기 기재된 같은 방법을 사용하여 증폭하였다(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0179] 특이적 CTL 활성

[0180] 특이적 CTL 활성을 검사하기 위하여, 인터페론(IFN)-감마 효소-결합 면역스팟(ELISPOT) 분석 및 IFN-감마 효소-결합 면역흡착검사(ELISA)를 수행하였다. 구체적으로, 펩티드 펄스된 A24LCL(1 × 10^4/웰)은 자극(stimulator) 세포로서 제조되었다. 48 웰에서 배양된 세포는 반응(responder) 세포로서 사용되었다. IFN-감마 ELISPOT 분석 및 IFN-감마 ELISA 분석은 제조사의 과정에 따라 수행되었다.

[0181] 표적 유전자 및 HLA-A24 중 어느 하나 또는 모두를 강하게 발현하는 세포의 확립

[0182] 표적 유전자의 전사해독틀(open reading frame) 또는 HLA-A24를 암호화하는 cDNA는 PCR에 의해 증폭하였다. 상기 PCR-증폭된 산물을 pCAGGS 벡터내로 클로닝하였다. 플라스미드는, 상기 표적 유전자 및 HLA-A24가 없는 세포주인, COS7내로 제조사의 제안된 과정에 따라 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용하여 형질감염하였다. 형질감염한 후 2일 뒤, 상기 형질전환된 세포는 versene(Invitrogen)으로 수득하였고 CTL 활성 분석을 위한 표적 세포(5 × 10^4 세포수/웰)로서 사용하였다.

[0183] 결과

[0184] CDCA1으로부터 유래된 HLA-A24 결합 펩티드의 예측

[0186] *표 1은 높은 결합 친화성 순서대로 CDCA1의 HLA-A*2402 결합 펩티드를 나타낸다. 에피토프 펩티드를 결정하기 위하여 잠재적인 HLA-A24 결합 활성을 갖는 총 40개의 펩티드들이 선별 및 검사되었다.

표 1

CDCA1으로부터 유래된 HLA-A24 결합 펩티드

시작 위치	아미노산 서열	결합 수치	서열번호
36	LYPNPKPEVL	300	1
74	MYPHLMEGFL	300	2
119	RFLSGIINFI	25.2	3
335	KTEENSFKRL	17.28	4
432	KYHDGIEKAA	16.8	5
181	KQLSDGIQEL	15.84	6
64	FYMMPVNSEV	11.55	7
295	LYQKKIQDLS	10.5	8
309	KLASILKESL	9.6	9
146	KSSADKMQQL	9.6	10
48	IYMRALQIVY	9	11
185	DGIQELQQSL	8.64	12
231	VSLKEIQESL	8.4	13
5	SFPRYNVAEI	8.25	14
394	INQEIQKIKL	7.92	15
322	DQIESDESEL	7.92	16
87	NLVTHLDSFL	7.2	17
368	QYKRTVIEDC	7	18
295	LYQKKIQDL	360	19
278	IYGDSVDCL	240	20
74	MYPHLMEGF	180	21
8	RYNVAEIVI	150	22
56	VYGIRLEHF	100	23
422	IFLNLKTAL	36	24
119	RFLSGIINF	30	25
144	QYKSSADKM	27.5	26
418	KSQEIFLNL	24.192	27
197	DFHQKTIVL	20	28
275	KYEIYGDSV	15	29
432	KYHDGIEKA	13.2	30
387	VYERVTTIN	10.5	31
186	GIQELQQSL	10.368	32
48	IYMRALQIV	9	33

시작위치는 CDCA1의 N-말단으로부터의 아미노산 잔기의 수를 나타낸다.
결합수치는 "BIMAS"로부터 유래한다.

[0187]

[0188] HLA-A*2402에 의해 제한된 CDCA1으로부터 유래한 예측되는 펩티드에 의한 CTL 유도 및 CDCA1 유래 펩티드로 자극된 CTL 라인 확립

[0189] 이러한 CDCA1으로부터 유래된 펩티드에 대한 CTL은 "재료 및 방법"에 기재된 프로토콜에 따라 생성되었다. 펩티드 특이적 CTL 활성은 IFN-감마 ELISPOT 분석(도 1a~f)에 의해 결정되었다. CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3), CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4), CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11), CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14), CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22) 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)은 대조군 웰에 비하여 강력한 IFN-감마 생성을 나타냄을 보였다. 더욱이, CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3)로 자극된 양성 웰 번호 #8, CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4)로 자극된 #1, CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11)로 자극된 #1, CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14)로 자극된 #4, CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22)로 자극된 #2 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)으로 자극된 #2에 있는 세포는 증폭되어 CTL 라인을 확립하였다. 상기 CTL 라인의 CTL 활성은 IFN-감마 ELISA 분석에 의해 측정되었다(도

2a~f). 모든 CTL 라인이 펩티드 펄스 하지 않은 표적 세포에 비하여, 이에 상응하는 펩티드로 펄스된 표적 세포에 대하여 강력한 IFN-감마 생성을 나타냄을 보였다. 반면에, 상기 펩티드가 HLA-A*2402와 결합 활성을 가질 가능성이 있음에도 불구하고, 다른 펩티드를 이용한 자극에 의해서는 CTL 라인이 확립되지 않았다. 예를 들면, CDCA1-A24-10-74(서열번호: 2)로 자극된 CTL 반응의 전형적인 네거티브 데이타(negative data)는 도 1g 및 도 2g에 나타냈다. 상기 본 명세서의 결과는 CDCA1으로부터 유래된 6 개의 펩티드가 강력한 CTL 라인 유도능을 가짐을 나타낸다.

[0190] CDCA1 특이적 펩티드에 대한 CTL 클론의 확립

[0191] CTL 클론은 "재료 및 방법"에 기재된 CTL 라인으로부터 제한적인 희석에 의해 확립되었고, 펩티드가 펄스된 표적 세포에 대한 CTL 클론으로부터 IFN-감마의 생성은 IFN-감마 ELISA분석에 의해 측정되었다. 강력한 IFN-감마 생성이 도 3에서 서열번호: 23으로 자극된 CTL 클론으로부터 결정되었다.

[0192] CDCA1 및 HLA-A*2402를 외인성으로 발현하는 표적 세포에 대한 특이적 CTL 활성

[0193] 이러한 펩티드에 대해 발생한 상기 확립된 CTL 라인을 CDCA1 및 HLA-A*2402 분자를 외인성으로 발현하는 표적 세포를 인식하는 그들의 능력에 대해 검사하였다. 전장의 CDCA1 및 HLA-A*2402 분자 유전자(CDCA1 및 HLA-A*2402 유전자를 외인성으로 발현하는 표적 세포에 대한 특이적 모델) 모두를 형질감염시킨 COS7 세포에 대하여 특이적 CTL 활성을 상응하는 펩티드에 의해 발생된 CTL 라인을 이펙터 세포로 사용하여 시험하였다. 전장의 CDCA1 유전자 또는 HLA-A*2402 중 하나로 형질감염된 COS7 세포는 대조군으로써 제작되었다. 도 4에 있어서, 서열번호: 23으로 자극된 CTLs은 CDCA1 및 HLA-A*2402를 모두 발현하는 COS7 세포에 대한 강력한 CTL 활성을 나타냈다. 반면에, 상기 대조군에 대해서는 유의적인 특이적 CTL 활성이 검출되지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 서열번호: 23의 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 HLA-A*2402 분자와 함께 표적 세포에서 자연적으로 발현되고 상기 CTLs에 의해 인식된다는 것을 명확하게 나타낸다. 상기 결과는 CDCA1로부터 유래된 이러한 펩티드가 암 면역치료법, 특히 CDCA1이 발현되는 종양을 갖는 환자에 대한 암 백신에 활용될 수 있을 것임을 나타낸다.

[0194] 항원 펩티드의 상동성 분석

[0195] CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3), CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4), CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11), CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14), CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22) 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)으로 자극된 CTLs은 유의적이고 특이적인 CTL 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3), CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4), CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11), CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14), CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22) 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)의 서열이 인간 면역 체계를 민감하게 하는 것으로 알려진 다른 분자로부터 유래된 펩티드와 상동적인 사실 때문일 수 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위하여, 상동성 분석은 이러한 펩티드 서열에 대하여 유의한 상동성을 가진 서열이 없다는 것을 밝힌 BLAST 알고리즘(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)을 쿼리(query)로 사용하여 수행하였다. 이러한 상동성 분석의 결과는 CDCA1-A24-10-119(서열번호: 3), CDCA1-A24-10-335(서열번호: 4), CDCA1-A24-10-48(서열번호: 11), CDCA1-A24-10-5(서열번호: 14), CDCA1-A24-9-8(서열번호: 22) 및 CDCA1-A24-9-56(서열번호: 23)의 서열은 유일하다는 것을 나타내고, 따라서 이러한 분자들은 몇몇의 관련되지 않은 분자들에 대한 의도하지 않은 면역 반응을 유발할 가능성이 거의 없다는 것을 의미한다.

[0196] 결과적으로, 신규한 CDCA1로부터 유래된 HLA-A24 에피토프 펩티드가 동정되었으며, 암 면역 치료법으로서 활용될 수 있다는 것을 증명하였다.

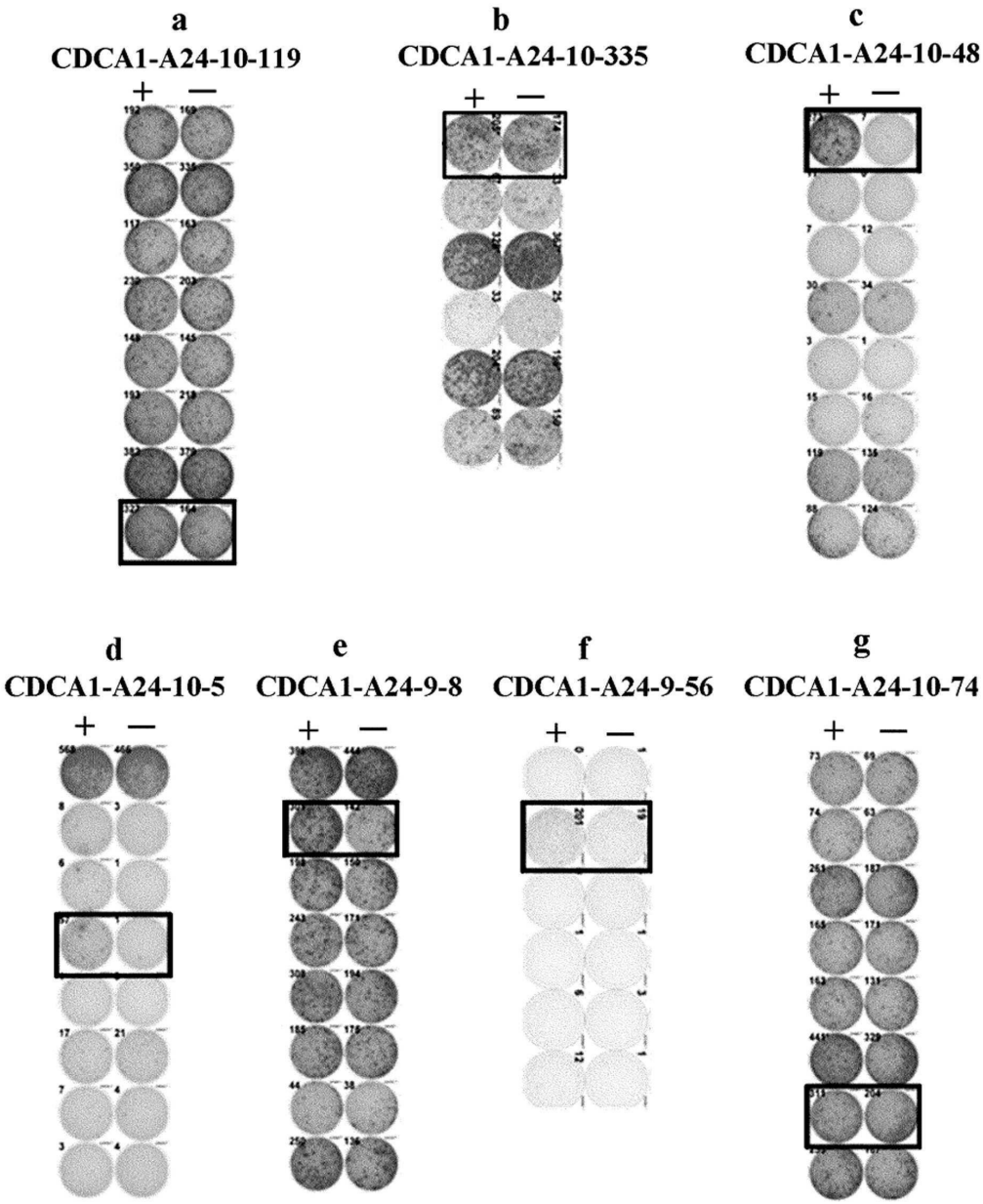
산업상 이용가능성

[0198] 본 발명은 신규한 TAAs에 대해서 기술하고 있으며, 구체적으로 강력하고 특이적인 항-종양 면역 반응을 유도하고 다양한 암 형태에 적용가능한 CDCA1으로부터 유래한 TAAs에 대해서 기술하고 있다. 이러한 TAAs는 또한 예를 들면, 암, 보다 구체적으로, 고환암, 췌장암, 방광암, 비소세포폐암, 소세포폐암 및 식도암과 같은, CDCA1과 관련된 질환에 대한 펩티드 백신으로서 개발을 정당화한다.

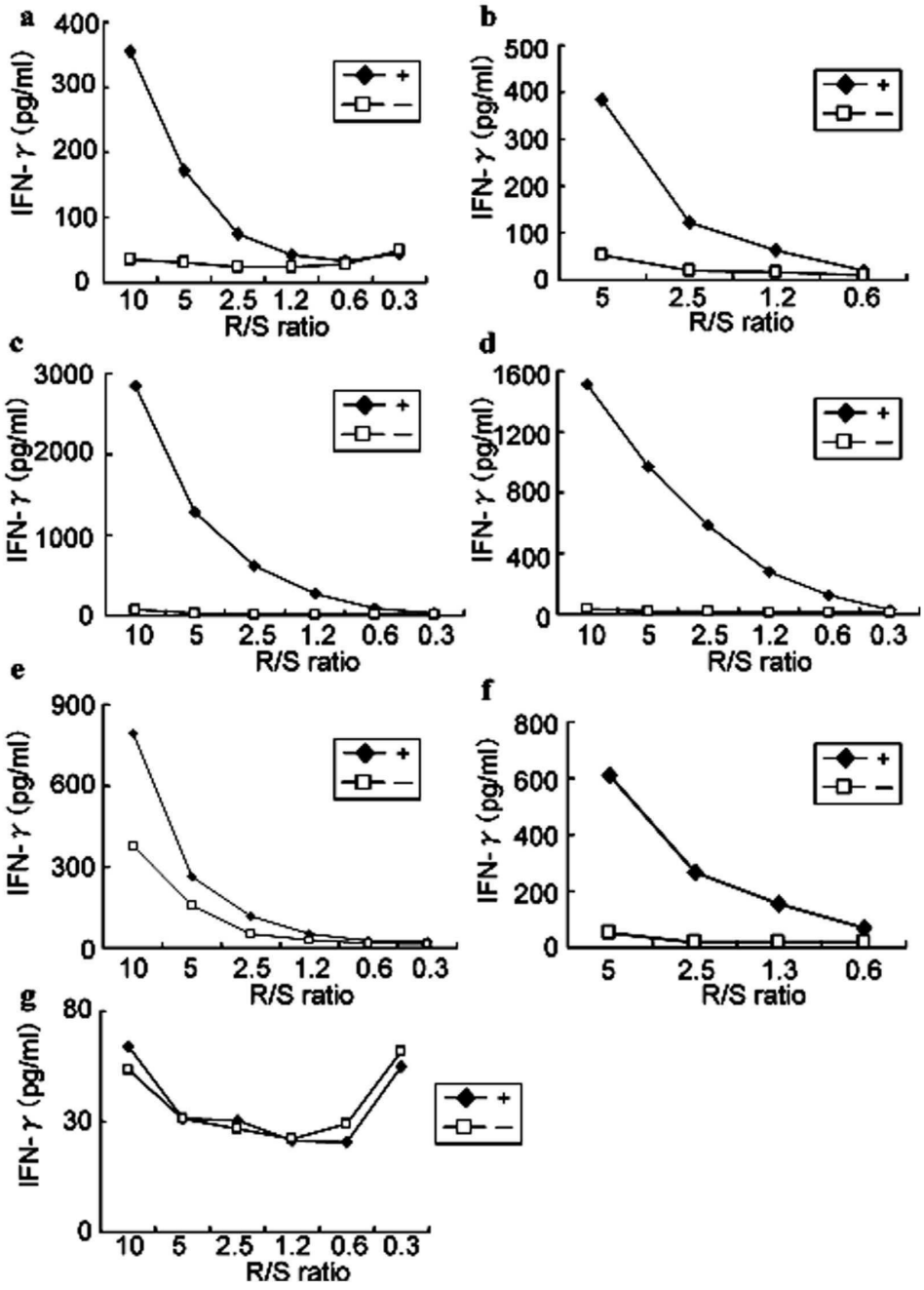
[0199] 본 발명은 명세서에서 상세하고, 이의 특이적인 실시예를 참조로 기재되어 있으나, 앞서 기술한 설명은 본질적으로 예시 및 설명이며, 본 발명과 이의 바람직한 실시예를 예시하는 바로 이해될 수 있다. 일반적인 실험을 통해, 당업자는 다양한 변화 및 변형이 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있으며, 본 발명의 목적 및 한계는 첨부된 청구항에 의해서 정의된다는 것을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

도면

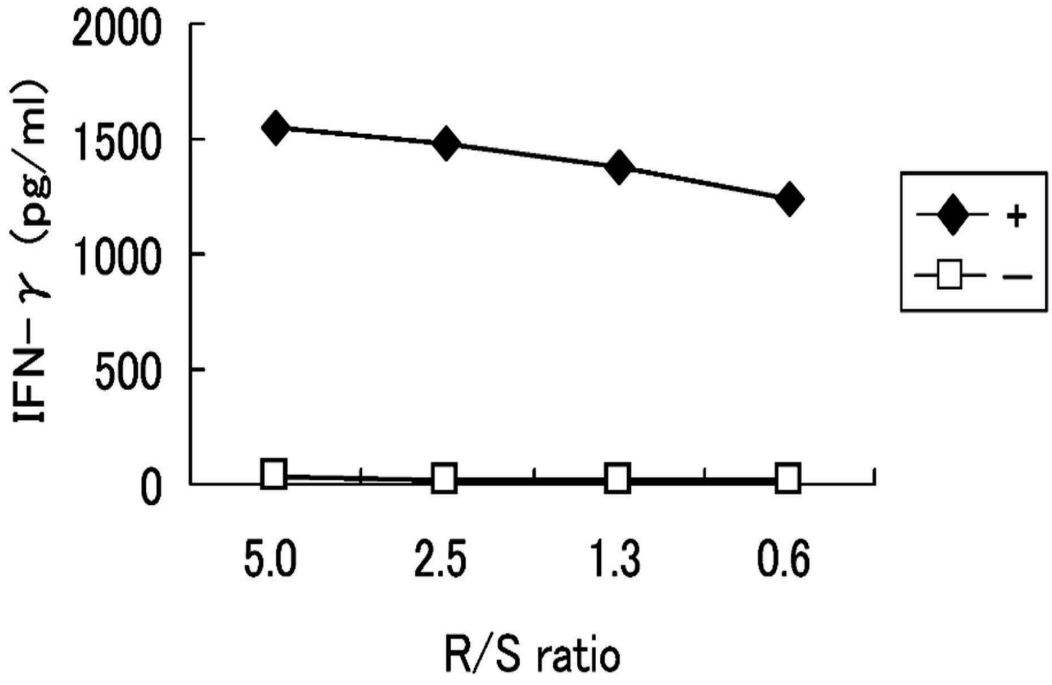
도면1


a
CDCA1-A24-10-119
+ —
b
CDCA1-A24-10-335
+ —
c
CDCA1-A24-10-48
+ —
d
CDCA1-A24-10-5
+ —
e
CDCA1-A24-9-8
+ —
f
CDCA1-A24-9-56
+ —
g
CDCA1-A24-10-74
+ —

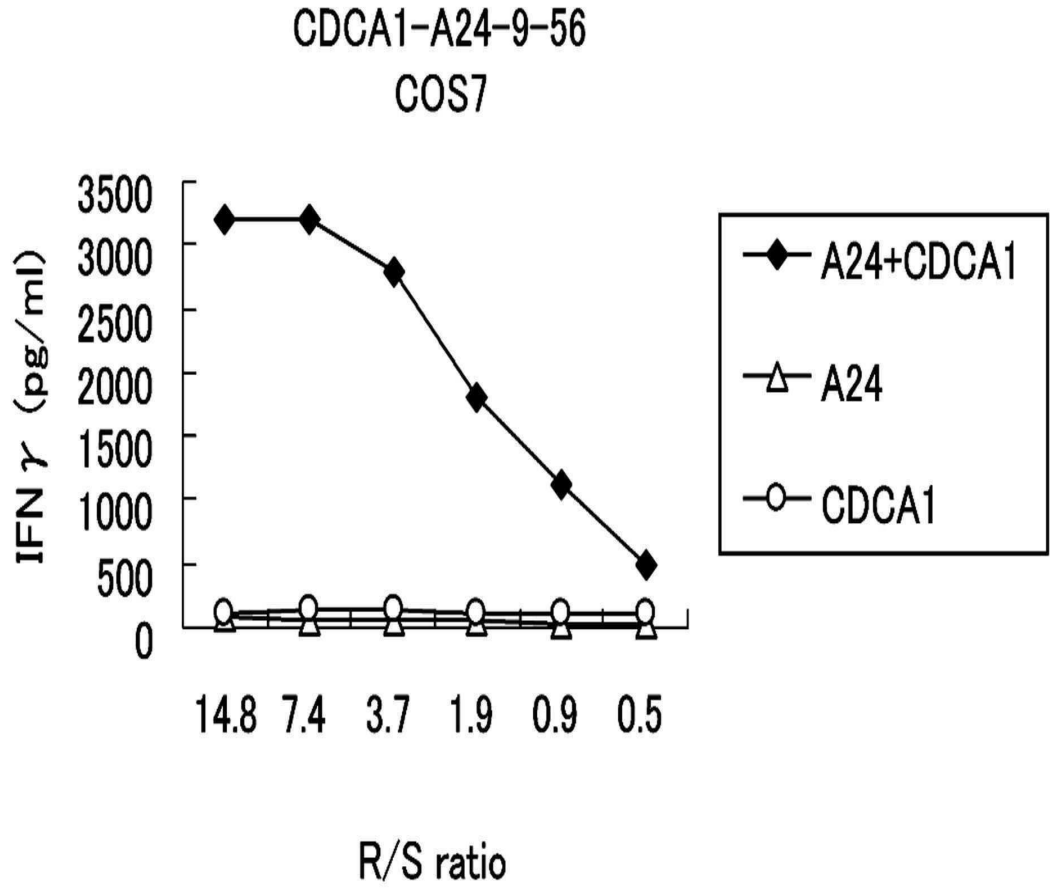
도면2


a
IFN-γ (pg/ml)
400
300
200
100
0
10 5 2.5 1.2 0.6 0.3
R/S ratio
+
−
b
IFN-γ (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
5 2.5 1.2 0.6
R/S ratio
c
IFN-γ (pg/ml)
3000
2000
1000
0
10 5 2.5 1.2 0.6 0.3
R/S ratio
d
IFN-γ (pg/ml)
1600
1200
800
400
0
10 5 2.5 1.2 0.6 0.3
R/S ratio
e
IFN-γ (pg/ml)
900
600
300
0
10 5 2.5 1.2 0.6 0.3
R/S ratio
f
IFN-γ (pg/ml)
800
600
400
200
0
5 2.5 1.3 0.6
R/S ratio
g
IFN-γ (pg/ml)
80
30
0
10 5 2.5 1.2 0.6 0.3
R/S ratio

도면3


2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/ml)
5.0
2.5
1.3
0.6
R/S ratio
+
–

도면4


CDCA1-A24-9-56
COS7
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IFN γ (pg/ml)
14.8
7.4
3.7
1.9
0.9
0.5
R/S ratio
A24+CDCA1
A24
CDCA1

서 열 목 록

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> CDCA1 EPITOPE PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME

<130> 16fpi-09-027

<150> US 61/074,062

<151> 2008-06-19

<150> US 61/197,599

<151> 2008-10-28

<160> 35

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 1

Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 2

Met Tyr Pro His Leu Met Glu Gly Phe Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 3

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 4

Lys Thr Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 5

Lys Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 6

Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 7

Phe Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 8

Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 9

Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 10

Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 11

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 12

Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln Ser Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 13

Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 14

Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 15

Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 16

Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 17

Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 18

Gln Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 19

Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 20

Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 21

Met Tyr Pro His Leu Met Glu Gly Phe

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 22

Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 23

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 24

Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 25

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 26

Gln Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 27

Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 28

Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 29

Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 30

Lys Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400

> 31

Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 32

Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln Ser Leu

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 33

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val

1 5

<210> 34

<211> 1980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (301)..(1692)

<400> 34

gcggaatggg gcgggacttc cagtaggagg cggcaagttt gaaaagtgat gacggttgac 60

gtttgctgat ttttgacttt gcttgtagct gctccccgaa ctcgccgtct tcctgtcggc 120

ggccggcact gtaggtgagc gcgagaggac ggaggaagga agcctgcaga cagacgcctt 180

ctccatccca aggcgcgggc aggtgccggg acgctgggcc tggcggtgtt ttcgtcgtgc 240

tcagcggtgg gaggaggcgg aagaaaccag agcctgggag attaacagga aacttccaag 300

atg gaa act ttg tct ttc ccc aga tat aat gta gct gag att gtg att 348

Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile

1 5 10 15

cat att cgc aat aag atc tta aca gga gct gat ggt aaa aac ctc acc 396

His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr

20 25 30

aag aat gat ctt tat cca aat cca aag cct gaa gtc ttg cac atg atc 444

Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile

35 40 45

tac atg aga gcc tta caa ata gta tat gga att cga ctg gaa cat ttt 492

Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe

50 55 60

tac atg atg cca gtg aac tct gaa gtc atg tat cca cat tta atg gaa 540

Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu

65 70 75 80

ggc ttc tta cca ttc agc aat tta gtt act cat ctg gac tca ttt ttg 588
Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu
85 90 95
cct atc tgc cgg gtg aat gac ttt gag act gct gat att cta tgt cca 636
Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro
100 105 110
aaa gca aaa cgg aca agt cgg ttt tta agt ggc att atc aac ttt att 684

Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile
115 120 125
cac ttc aga gaa gca tgc cgt gaa acg tat atg gaa ttt ctt tgg caa 732
His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln
130 135 140
tat aaa tcc tct gcg gac aaa atg caa cag tta aac gcc gca cac cag 780
Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln
145 150 155 160

gag gca tta atg aaa ctg gag aga ctt gat tct gtt cca gtt gaa gag 828
Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu
165 170 175
caa gaa gag ttc aag cag ctt tca gat gga att cag gag cta caa caa 876
Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln
180 185 190
tca cta aat cag gat ttt cat caa aaa acg ata gtg ctg caa gag gga 924

Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly
195 200 205
aat tcc caa aag aag tca aat att tca gag aaa acc aag cgt ttg aat 972
Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn
210 215 220
gaa cta aaa ttg tcg gtg gtt tct ttg aaa gaa ata caa gag agt ttg 1020
Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu

225 230 235 240

aaa aca aaa att gtg gat tct cca gag aag tta aag aat tat aaa gaa 1068
Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu
245 250 255

aaa atg aaa gat acg gtc cag aag ctt aaa aat gcc aga caa gaa gtg 1116
Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val
260 265 270

gtg gag aaa tat gaa atc tat gga gac tca gtt gac tgc ctg cct tca 1164

Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser
275 280 285

tgt cag ttg gaa gtg cag tta tat caa aag aaa ata cag gac ctt tca 1212
Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser
290 295 300

gat aat agg gaa aaa tta gcc agt atc tta aag gag agc ctg aac ttg 1260
Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu
305 310 315 320

gag gac caa att gag agt gat gag tca gaa ctg aag aaa ttg aag act 1308
Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr
325 330 335

gaa gaa aat tcg ttc aaa aga ctg atg att gtg aag aag gaa aaa ctt 1356
Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu
340 345 350

gcc aca gca caa ttc aaa ata aat aag aag cat gaa gat gtt aag caa 1404

Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln
355 360 365

tac aaa cgc aca gta att gag gat tgc aat aaa gtt caa gaa aaa aga 1452
Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg
370 375 380

ggt gct gtc tat gaa cga gta acc aca att aat caa gaa atc caa aaa 1500
Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys

385 390 395 400

att aaa ctt gga att caa caa cta aaa gat gct gct gaa agg gag aaa 1548
Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys
405 410 415
ctg aag tcc cag gaa ata ttt cta aac ttg aaa act gct ttg gag aaa 1596
Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys
420 425 430
tac cac gac ggt att gaa aag gca gca gag gac tcc tat gct aag ata 1644

Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile
435 440 445
gat gag aag aca gct gaa ctg aag agg aag atg ttc aaa atg tca acc 1692
Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr
450 455 460
tgattaac aaaattacat gtctttttgt aaatggcttg ccatctttta attttctatt 1750
tagaaagaaa agttgaagcg aatggaagta tcagaagtac caaataatgt tggcttcatc 1810

agtttttata cactctcata agtagttaat aagatgaatt taatgtaggc ttttattaat 1870
ttataattaa aataacttgt gcagctattc atgtctctac tctgcccctt gttgtaaata 1930
gtttgagtaa aacaaaacta gttacctttg aaatatatat attttttct 1980