



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0123134
(43) 공개일자 2020년10월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/08 (2019.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/08 (2019.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7024053
- (22) 출원일자(국제) 2019년02월08일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년08월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/053168
- (87) 국제공개번호 WO 2019/162110
국제공개일자 2019년08월29일
- (30) 우선권주장
10 2018 103 944.1 2018년02월21일 독일(DE)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
이매티스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 튀빙겐 파울-울리히-스트라체 15
- (72) 발명자
슈스터 헤이코
독일 72074 튀빙겐 도르파커스트라세 22
호프가르트 프란치스카
독일 72070 튀빙겐 슈베르츠로허 스트라세 64
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

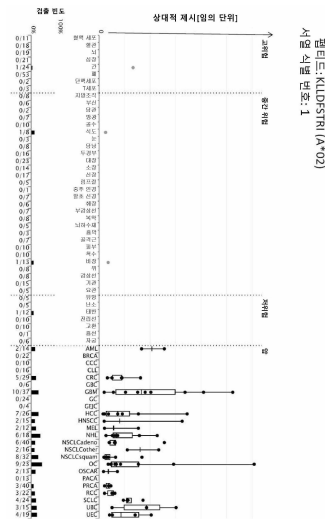
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 여러 유형의 암에 대한 면역요법에 사용하기 위한 펩티드, 및 비정규 기원의 펩티드의 조합

(57) 요약

본 발명은 면역요법 방법에 사용하기 위한 펩티드, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독 또는, 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학 성분으로 역할가능한 기타 중앙-연관 펩티드와 조합으로 항종양 면역 반응을 자극하거나 T 세포를 생체의 자극하여 환자로 이전하기 위한 중앙-연관 T 세포 에피톱에 관한 것이다. 구조적 적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 펩티드 자체는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/4748 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

프리체 옌스

독일 72144 두슬링겐 래르헨베크 11

슈르 올리버

독일 72074 튀빙겐 아이히할덴스트라세 19

바인헨크 토니

독일 73773 아이히발트 임 모르겐라인 15

코발레브스키 다니엘

독일 72074 튀빙겐 덴첸베르거스트라세 29

저우 치-치양

미국 텍사스주 77584 펄랜드 스프링테일 드라이브
3130

(30) 우선권주장

62/633,325 2018년02월21일 미국(US)
10 2018 107 224.4 2018년03월27일 독일(DE)

명세서

청구범위

청구항 1

서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 대해 88% 이상의 상동성을 갖는 이의 변이체 서열을 포함하되, 상기 변이체가 구조적 적합 복합체(MHC) 분자에 결합하고/거나 상기 변이체 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는, 전장 폴리펩티드가 아닌 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서,

클래스 I 또는 II MHC 분자에 결합하는 능력을 갖고, MHC와 결합할 때 CD4 및/또는 CD8 T 세포에 의해 인식될 수 있는 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101 중 어느 하나에 따른 아미노산의 연속적인 신장을 포함하는, 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 더욱 바람직하게는 8 내지 16개의 아미노산의 전체 길이를 갖고, 가장 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되는 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함하는 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질의 일부, 특히 HLA-DR 항원-연관 불변 쇠(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질의 일부인 펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합할 때 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체를 특이적으로 인식하는 항체, 특히 가용성 또는 막-결합된 항체, 바람직하게는 단클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합할 때 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체인 HLA 리간드와 반응성인 T 세포 수용체, 바람직하게는 가용성 또는 막-결합된 T 세포 수용체 또는 이의 단편.

청구항 9

제8항에 있어서,

리간드의 아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101 중 어느 하나에 대해 88% 이상의 동일성을 갖거나, 리간드의 아미노산 서열이 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101 중 어느 하나로 구성되는, T 세포 수용체.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

가용성 분자로서 제공되고, 임의적으로 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가 효과기 기능을 갖는 T 세포 수용체.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 바람직하게는 MHC 분자에 결합하는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체를 특이적으로 인식하는 압타머.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편을 인코딩하고, 임의적으로 이중 프로모터 서열에 연계된 핵산, 또는 상기 핵산을 발현하는 발현 벡터.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 또는 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포로서, 바람직하게는 수지상 세포, T 세포 또는 NK 세포와 같은 항원-제시 세포로부터 선택되는 재조합 숙주 세포.

청구항 14

T 세포를 적절한 항원-제시 세포 또는 항원-제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에 발현된 항원-로딩된 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자와 상기 T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하기에 충분한 시간 동안 시험관 내에서 접촉시키는 단계

를 포함하되, 상기 항원이 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 펩티드인, 활성화된 T 림프구의 시험관내 생산 방법.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제14항에 따른 시험관내 생산 방법에 의해 생산되는 활성화된 T 림프구.

청구항 16

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 및 제15항에 따른 활성화된 T 림프구로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 성분, 또는 접합되거나 표지된 활성 성분, 및 약학적으로 허용가능한 담체, 및 임의적으로 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 안정화제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 또는 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편의 생산 방법으로서,

제13항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

상기 펩티드 또는 이의 변이체, 상기 항체 또는 이의 단편, 또는 상기 T 세포 수용체 또는 이의 단편을 상기 숙

주 세포 및/또는 이의 배양 배지로부터 단리하는 단계
를 포함하는 생산 방법.

청구항 18

의약에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 또는 제15항에 따른 활성화된 T 림프구.

청구항 19

표적 세포가 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제시하는 환자에서 표적 세포를 괴사시키는 방법으로서,

효과적인 수의 제15항에 따른 활성화된 T 림프구를 상기 환자에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 20

암의 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한 또는 암에 대한 약제의 제조에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 또는 제15항에 따른 활성화된 T 림프구.

청구항 21

암이 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종, 자궁 및 자궁 내막암, 및 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 따른 펩티드가 유래되는 단백질의 과발현을 나타내는 기타 종양으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 제20항에 정의된 용도.

청구항 22

(a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 이의 변이체, 제7항에 따른 항체 또는 이의 단편, 제8항 또는 제9항에 따른 T 세포 수용체 또는 이의 단편, 제11항에 따른 압타머, 제12항에 따른 핵산 또는 발현 벡터, 제13항에 따른 숙주 세포, 또는 제15항에 따른 활성화된 T 림프구를 용액 또는 동결건조된 형태로 함유하는 약학 조성물을 포함하는 용기;

(b) 임의적으로, 희석제, 또는 동결건조된 제형을 위한 재구성 용액을 함유하는 제2 용기;

(c) 임의적으로, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 103으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드; 및

(d) 임의적으로, (i) 용액의 사용, 또는 (ii) 동결건조된 제형의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 23

제22항에 있어서,

(iii) 완충액, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘, 및 (vii) 주사기 중 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

청구항 24

a) 개별 환자로부터의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 동정하는 단계;

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

c) 개별 환자에서 동정된 TUMAP와 일치하는 하나 이상의 펩티드를 상기 창고로부터 선택하는 단계; 및

d) 단계 c)에 근거하여 개인화된 백신, 또는 화합물-기반 또는 세포 치료제를 생산하고/거나 제형화하는 단계를 포함하는, 개별 환자를 위한 개인화된 항암 백신, 또는 화합물-기반 및/또는 세포 치료제의 생산 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

TUMAP가

- a1) 종양 샘플의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플로부터의 발현 데이터와 비교하여 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질을 동정하는 단계; 및
- a2) 상기 발현 데이터와 종양 샘플에서 클래스 I 및/또는 클래스 II MHC 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열의 상관관계 결정에 의해 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래하는 MHC 리간드를 동정하는 단계에 의해 동정되는, 생산 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

MHC 리간드의 서열이 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키는 단계; 및 용출된 리간드를 서열결정(sequencing)하는 단계에 의해 동정되는, 생산 방법.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직이 동일한 환자로부터 수득되는, 생산 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

참고에 포함된 펩티드가

- aa) 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 과발현된 유전자의 동정을 포함하는, 마이크로어레이 또는 서열결정-기반의 발현 프로파일링(profiling)과 같은 고도의 병렬 방법(parallel method)에 의한 게놈-전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 수행하는 단계;
 - ab) 단계 aa)에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드를 선택하는 단계; 및
 - ac) 건강한 공여자 또는 환자로부터의 인간 T 세포를 사용하는 시험관내 면역원성 검정을 포함하는, 선택되는 펩티드에 의한 생체내 T 세포 반응의 유도를 결정하는 단계; 또는
 - ba) 질량 분광분석법을 사용하여 종양 샘플로부터 HLA 리간드를 동정하는 단계;
 - bb) 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 과발현된 유전자의 동정을 포함하는, 마이크로어레이 또는 서열결정-기반의 발현 프로파일링과 같은 고도의 병렬 방법에 의한 게놈-전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 수행하는 단계;
 - bc) 동정된 HLA 리간드를 유전자 발현 데이터와 비교하는 단계;
 - bd) 단계 bc)에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드를 선택하는 단계;
 - be) 종양 조직 상에 존재하고 건강한 조직에서 결여되거나 드물게 검출되는, 단계 bd)로부터 선택되는 TUMAP를 재검출하고, mRNA 수준에서 과발현의 관련성을 확인하는 단계; 및
 - bf) 건강한 공여자 또는 환자의 인간 T 세포를 사용하는 시험관내 면역원성 검정을 포함하는, 선택되는 펩티드에 의한 생체내 T 세포 반응의 유도를 결정하는 단계
- 에 따라 동정되는, 생산 방법.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

참고에 포함된 펩티드의 면역원성이 시험관내 면역원성 검정, 개별 HLA 결합에 대한 환자 면역모니터링, MHC 펩티드 염색, ELISPOT 검정 및/또는 세포내 사이토킨 염색을 포함하는 방법에 의해 결정되는, 생산 방법.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

참고가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 103으로 구성되는 군으로부터 선택되는 복수의 펩티드를 포함하는, 생산 방법.

청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

개별 환자로부터의 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양 샘플에 고유한 하나 이상의 돌연변이를 동정하고, 상기 돌연변이와 상관관계가 있는 펩티드를 백신에 포함시키거나 세포 치료제를 생성하기 위해 선택하는 단계를 추가로 포함하는 생산 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

하나 이상의 돌연변이가 전체 게놈 서열결정에 의해 동정되는, 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역요법 방법에서 사용을 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단독 또는 예를 들어 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 역할가능한 기타 종양 연관 펩티드들과 병용하여 항종양 면역 반응을 촉진하거나 세포를 생체의 촉진하여 환자로 이전하기 위한 종양 연관 T 세포 에피토프에 관한 것이다. 구조적 적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

[0002] 본 발명은 항종양 면역 반응을 이끌어내는 백신 조성물에서 또는 약학적/면역학적 활성 화합물 및 세포의 개발을 위한 표적으로 사용할 수 있는 인간 종양 세포의 HLA 클래스 I 분자로부터 유래하는 여러 신규 펩티드 서열 및 이들의 변이체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세계보건기구(WHO)에 따르면, 2012년 암은 세계적으로 4가지 주요 비전염성 치명적 질병에 속했다. 같은 해 동안, 고소득 국가들에서 대장암, 유방암 및 호흡기도 암들이 10대 사망 원인에 포함되었다.

[0004] GBM은 가장 흔한 중추신경계 악성 종양으로서 미국내 연령 조절 발생률은 거주자 100,000명 중 3.19명이다. GBM은 예후가 매우 불량하며 1년 생존율이 35%이고 5년 생존율은 5% 미만이다. 남성, 높은 연령 및 민족이 GBM의 위험 인자인 것으로 보인다(Thakkar et al., 2014).

[0005] CLL은 서구 세계에서 가장 흔한 백혈병이며 모든 백혈병의 약 3분의 1을 차지한다. 발생률은 미국과 유럽에서 유사하며 연간 신규 건수는 16,000건으로 추정된다. CLL은 아프리카인보다 백인에서 더 흔하며 히스패닉과 미국 원주민에서는 더 드물고 아시아인에서는 거의 없다. 아시아계의 경우 CLL 발생률은 백인보다 3배 더 낮다 (Gunawardana et al., 2008). CLL 환자의 5년 전체 생존율은 약 79%이다.

[0006] AML은 성인과 아동 모두에서 진단되는 두 번째로 흔한 유형의 백혈병이다. 미국에서 추정된 신규 사례는 1년에 약 21,000건이다. AML 환자의 5년 생존율은 약 25%이다.

[0007] 폐암은 세계적으로 가장 흔한 유형의 암이며 다수 국가에서 첫 번째 사망 원인이다. 폐암은 소세포 폐암과 비소세포 폐암으로 세분화된다. NSCLC에는 선암종, 편평 세포 암종 및 대세포 암종의 조직학적 유형들이 포함되며 미국의 모든 폐암의 85%를 차지한다. NSCLC의 발생률은 현재 및 과거 흡연자 등의 흡연율과 밀접한 상관관계가

있으며 5년 생존율은 15%로 보고되었다(World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

- [0008] 암 치료와 연관된 심한 부작용과 비용을 고려할 때, 일반적인 암, 특히 급성 골수성 백혈병(AML), 유방암(BRCA), 담관세포 암종(CCC), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 대장암(CRC), 담낭암(GBC), 교모세포종(GBM), 위암(GC), 위-식도 접합부 암(GEJC), 간세포 암종(HCC), 두경부 편평세포 암종(HNSCC), 흑색종(MEL), 비호지킨 림프종(NHL), 비소세포 폐암(NSCLC), 난소암(OC), 식도암(OSCAR), 췌장암(PACA), 전립선암(PRCA), 신세포 암종(RCC), 소세포 폐암(SCLC), 방광 암종(UBC) 및 자궁내막암(UEC)의 치료에 사용가능한 요인들을 확인할 필요가 있다. 또한 더 나은 진단과 예후의 평가 및 치료 성공의 예측을 유도하는 일반적인 암, 특히 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 바이오마커를 대표하는 요인들을 확인할 필요가 있다.
- [0009] 암의 면역요법은 부작용을 최소화시키는 반면 암 세포에 대한 특이적 표적화의 옵션을 나타낸다. 암 면역요법은 종양 관련 항원의 존재를 이용한다.
- [0010] 종양 관련 항원(TAA)의 현재 분류는 다음과 같은 주요 그룹을 포함한다:
- [0011] a) 암-고환 항원: 제일 처음으로 T 세포에 의해 인식된 TAA는 이 종류에 속하며, 이는 그 멤버들의 발현이 조직학적으로 인간 종양과 다르며, 정상 조직 중, 고환의 정모 세포/정원 세포에서만 있으며, 때로는 태반에서도 있기 때문에 암-고환(CT)이라고 최초로 불려졌다. 고환의 세포들이 클래스 I 또는 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에, 이 항원들은 정상 세포에 있는 T 세포에 의해 인식될 수 없으며 면역학적으로 종양-특이적이라고 간주될 수 있다. CT 항원의 잘 알려진 예로는 MAGE 계열 구성원들 및 NY_ESO_1이 있다.
- [0012] b) 다른 항원들: 이 TAA는 종양과 그 종양이 발생한 정상 조직 사이에 공유된다. 대부분의 알려진 분화 항원들은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 이러한 멜라닌 세포 혈통 관련 단백질의 다수는 멜라닌의 생합성에 관련되어 있으며, 그러므로 종양 특이적이지 않지만 암 면역요법에 널리 사용된다. 예로는, 티로시나아제 및 흑색종을 위한 멜란-A/MART-1 또는 전립선암을 위한 PSA가 포함되지만 이로 국한되지 않는다.
- [0013] c) 과발현된 TAA: 일반적으로 낮은 발현 수준이 있는 많은 정상 조직뿐만 아니라 조직학적으로 다른 유형의 종양에서 유전자 인코딩에서 널리 발현된 TAA가 발견된다. 정상 조직에 의해 처리되고 잠재적으로 제시되는 많은 에피토프가 T 세포 인식의 임계치 수준보다 낮을 수 있고, T 세포의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 확립된 내성을 중단시켜 항암 반응을 개시할 수 있다. 이 클래스 TAA의 두드러진 예로는 Her-2/neu, 서바이빈, 텔로머라제 또는 WT1가 있다.
- [0014] d) 종양 특이적 항원: 이러한 독특한 TAA는 정상 유전자의 변이로써 발생한다(β -카테닌, CDK4 등). 이러한 분자 변경의 일부는 종양 변이 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양 특이적 항원은 일반적으로 강한 면역 반응을 정상 조직에 대한 자기 면역 반응에 대한 위험성 없이 유도할 수 있다. 반면에, 대부분의 경우 TAA는 발견되어 일반적으로 많은 개별 종양에서 대개 공유되지 않은 해당 종양에만 적절하다. 종양 특이적(연관된) 아형을 갖는 단백질의 경우 펩티드가 종양(관련) 엑손으로부터 비롯된다면 펩티드의 종양 특이성(또는 연관성) 또한 발생할 수 있다.
- [0015] e) 비정상 번역 후 변형에서 발생하는 TAA: 이러한 TAA는 특이적이지 않고 과발현되지도 않는 단백질에서 발생할 수 있지만 종양에서 주로 활동적인 번역 후 과정에 의해 종양과 관련된다. 이 클래스의 예는 종양 특이적일 수도 있고 아닐 수도 있는 분해 과정 동안 단백질 스플라이싱과 같은 이벤트 또는 MUC1의 경우 종양의 새로운 에피토프로 이끄는 변화된 당화 패턴에서 발생한다.
- [0016] f) 종양 바이러스 단백질: 이러한 TAA는 종양발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 바이러스 단백질이며, 그들이 이질적이기 때문에(인간 태생이 아닌), T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이런 단백질의 예로는 인간 유두종 타입 16 바이러스 단백질, 및 경부 암종에서 발현하는 E6와 E7이 있다.
- [0017] 인간 프로테오믹의 상당 부분은 대안의 오픈 리딩 프레임(altORF, (Vanderperre et al., 2013)), 내인성 레트로 바이러스 요소와 같은 비정규 출처로부터 유래하거나 추가의 전사 후(RNA의 대체 스플라이싱(Nilsen and Graveley, 2010)) 또는 번역 후 처리(번역 후 변형(Khoury et al., 2011), 프로테아솜 스플라이싱(Liepe et al., 2016)) 단계가 관여된다. 이 세대의 비정규 단백질과 펩티드에 관여하는 세포 과정의 다수가 암 세포에서 빈번하게 변경되므로 프로테오믹의 이 부분은 TAA에 대한 풍부한 출처를 제시한다(Laumont and Perreault, 2018).

- [0018] 다수의 전령 RNA(mRNA)는 기준 오픈 리딩 프레임(ORF) 외에도 비전통적인 대체 오픈 리딩 프레임(altORF, (de Klerk and 't Hoen, 2015))을 포함한다. 이러한 추가의 코딩 서열은 크기가 대개 100개 미만(소형 오픈 리딩 프레임; sORF(Olexiouk et al., 2016))에서 수백 개의 코돈까지 다양할 수 있으며 상류, 하류에 위치하거나 심지어 기준 ORF와 중복될 수 있다. 이러한 altORF의 번역은 여러 번역 개시 부위로부터 발생하며 기준 ORF와 다른 리딩 프레임에서 발생할 수 있다. 소형 오픈 리딩 프레임의 존재는 mRNA에 제약되지 않으며 이전에 비코드(ncRNA, (Nam et al., 2016))로 생각되었던 기타 조절 RNA에 대해서도 기술된 바 있다. 다수의 긴 비코드 RNA(lncRNA)와 microRNA(miRNA)가 작은 펩티드를 인코딩하며 광범위하게 번역하는 것으로 나타났다(Anderson et al., 2015; Aspden et al., 2014).
- [0019] 인간 내인성 레트로바이러스(HERV)는 인간 게놈의 상당한 부분(약 8%)을 차지한다. 이러한 바이러스 요소들은 수백만 년 전에 게놈에 통합되었으며, 그 이후 수 세대를 통해 수직으로 전파되었다. HERV의 거의 대부분은 돌연변이나 절단을 통해 기능적 활성도를 상실했지만, HERV-K 클레이드의 구성원과 같은 일부 내인성 레트로바이러스는 여전히 기능적 유전자를 인코딩하며 레트로바이러스 유사 입자를 형성하는 것으로 나타났다(Subramanian et al., 2011). HERV 프로바이러스의 전사는 후생유전적으로 제어되며 정상 생리적 조건하에서 침묵된다. 하지만 바이러스 단백질의 활성적 번역을 초래하는 재활성화 및 과발현이 일부 질환과 특히 여러 유형의 암에 대해 기술된 바 있다(Gonzalez-Cao et al., 2016; Kassiotis and Stoye, 2017). 이러한 HERV 유래된 단백질의 중앙 특이적 발현은 여러 유형의 암 면역요법을 위해 활용될 수 있다(Krishnamurthy et al., 2015; Schiavetti et al., 2002).
- [0020] T 세포 기반의 면역요법은 중앙 관련 또는 중앙 특이적 단백질로부터 유래된 펩티드 에피톱을 표적으로 하며, 이는 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 중앙 특이적 세포 독성 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피톱은, 발현되고 같은 원조의 변형없는 세포들에 비해서, 각각의 중앙의 대개 상향조절된 세포인 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 분자일 수 있다.
- [0021] MHC 분자에는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 두 클래스가 있다. MHC 클래스 I 분자는 알파 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린으로 구성되어 있고, MHC 클래스 II 분자는 알파와 베타 쇠로 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유결합에 사용된다.
- [0022] MHC 클래스 I 분자는 대부분의 유핵 세포에서 찾을 수 있다. 이는 대부분 내인성 단백질, 결손 리보솜 생성물(DRIP)과 보다 큰 펩티드의 단백질분해성 절단으로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. 하지만 엔도솜 구획이나 외생 출처로부터 유래된 펩티드 또한 MHC 클래스 I 분자에서 발견된다. 이러한 비고전적 방식의 클래스 I 제시를 문헌에서는 교차 제시라고 칭한다(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). MHC 클래스 II 분자는 대부분 전문적인 항원 제시 세포(APC)에서 찾아볼 수 있으며, 이들은 주로 APC에 의해 섭취된 외인성 또는 막횡단 단백질의 펩티드를 제시하며(예컨대, 세포내이입 동안), 이는 차후에 처리된다.
- [0023] 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적절한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8 양성 T 세포에 의해서 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4 양성 조력 T 세포에 의해 인식된다. TCR, 펩티드 및 MHC가 이로써 1:1:1의 화학량적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.
- [0024] CD4-양성 보조 T 세포는 CD8-양성 세포 독성 T 세포에 의한 효과적인 반응을 유도하고 지속하는 데 중요한 역할을 한다. 중앙 연관 항원(TAA)에서 유도된 CD4 양성 T 세포 에피톱의 동정은 항중앙 면역 반응을 일으키기 위한 의약품의 개발에 아주 중요하다(Gnjatic et al., 2003. 중앙 부위에서, 보조 T 세포는, 세포독성 T 세포(CTL) 친화적 사이토킨 주위 환경을 지원하고(Mortara et al., 2006), 효과기 세포, 예를 들어 CTL, 자연 살해(NK) 세포, 대식 세포, 과립구를 유치한다(Hwang et al., 2007).
- [0025] 염증이 없는 경우, MHC 클래스 II 분자의 발현은 주로 면역계의 세포, 특히 전문적 항원-나타내는 세포(APC)로 제한된다, 예를 들어, 단핵 세포, 단핵 세포-유도된 세포, 대식 세포, 모수식 세포. 암 환자에서, 중앙의 세포는 MHC 클래스 II를 발현하는 것으로 밝혀졌다(Dengjel et al., 2006).
- [0026] 본 발명의 연장된(더 기다란) 펩티드는 MHC 클래스 II 활성 에피톱으로 작용할 수 있다.
- [0027] MHC 클래스 II에 의해 활성화된 조력 T 세포는 항중앙 면역에서 CTL 효과기 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. CD8 양성 킬러 T 세포의 TH1 유형 지원 효과기 기능의 조력 T 세포 반응을 일으키는 조력 T 세포 에피톱은, 세포 표면에 중앙 관련 펩티드/MHC 복합체를 보이는 중앙 세포에 대한 세포 독성 기능을 포함한다. 이런 식으로 중앙 관련 조력 T 세포 펩티드 에피톱은, 따로 또는 다른 중앙 관련 펩티드와 함께, 항중앙 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 원료로 사용될 수 있다.

- [0028] 예를 들어, 생쥐 같은 포유류 동물 모델에서는 심지어 CD8 양성 T 림프구의 부재하에서도, CD4 양성 T 세포가 인터페론-감마(IFN γ)의 분비에 의한 혈관신생의 저해를 통해 종양 발현을 억제하는 데 충분한 것으로 나타났다 (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). CD4 T 세포가 직접적 항종양 작용기라는 증거가 있다 (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).
- [0029] 이전에는 HLA 클래스 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 세포로 제한되기 때문에, 클래스 II 펩티드를 원발성 종양에서 직접 분리하는 것은 가능하지 않다고 간주되었다. 그러나, Dengjel 등은 MHC 클래스 II 에피톱을 종양에서 직접적으로 식별하는 데 성공했다(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).
- [0030] CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 함께 상승작용에 의해 항종양 효과에 기여하므로, CD8+ T 세포(리간드:MHC 클래스 I 분자 + 펩티드 에피톱) 또는 CD4 양성 조력 T 세포(리간드:MHC 클래스 II 분자 + 펩티드 에피톱)에 의해 인식되는 종양 관련 항원의 식별 및 특성화가 종양 백신의 개발에 중요하다.
- [0031] MHC 클래스 I 펩티드가 세포 면역 반응을 촉발(유도)하려면 MHC 분자에도 결합해야 한다. 이 과정은 MHC 분자의 대립형질 그리고 그 펩티드의 아미노산 서열의 특정적 다형성에 의존한다. MHC 클래스 I 결합 펩티드는 대개 길이가 8 내지 12개의 아미노산 잔기이며 또한 대개 그 서열 내에 MHC 분자의 상응하는 결합 홈과 상호작용하는 두 개의 유지되는 잔기("고정부")를 포함하고 있다. 이렇게 함으로써 각 MHC 대립형질은 어떤 펩티드가 결합 홈에 특이적으로 결합할 수 있는지 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다.
- [0032] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 추후 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.
- [0033] 종양 특이 또는 연관 항원으로서 T 림프구에 의해 단백질이 인식되고, 치료에 사용되려면, 특정한 전체 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되어야 하며 비교적 소량일지라도 건강한 정상 조직에 의해서 발현되어서는 안 된다. 바람직한 구현에서, 펩티드는 건강한 정상 조직과 비교하여 종양 세포에 의해 과다 제시되어야 한다. 더 바람직하게는, 각각의 항원이 하나의 유형의 종양에서뿐만 아니라 높은 농도로 나타나는 것이다(즉 세포 마다 펩티드의 각각의 카피 수). 종양 특이 및 종양 관련 항원은 흔히 기능(예컨대, 세포 주기 조절 또는 세포자멸사의 억제) 때문에 정상 세포를 종양 세포로 전환하는 것과 직접 관련된 단백질에서 유도된다. 또한, 변환을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있으며, 따라서 간접적으로 종양과 연관될 수 있다. 이러한 간접적 종양 관련 항원은 백신 접근법의 표적이 될 수도 있다(Singh-Jasuja et al., 2004). 종양 관련 항원에서 유도된 그러한 펩티드("면역성 펩티드")가 시험관내 또는 생체내 T 세포 반응을 유도하도록 하기 위해서 에피톱이 항원의 아미노산 서열에 나타나는 것이 필수적이다.
- [0034] 기본적으로, MHC 분자에 결합할 수 있는 모든 펩티드는 T 세포 에피톱으로서 기능할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 T 세포 반응의 유도의 전체 조건은 상응하는 TCR이 있는 T 세포의 존재와 이 특정 에피톱에 대한 면역성 내성의 부재이다.
- [0035] 그러므로, TAA는 종양 백신으로 제한되지 않지만 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다. TAA의 식별과 특성화의 방법은 대개 환자 또는 건강한 대상에서 단리될 수 있는 CTL의 사용에 기반하거나, 다른 전송 프로파일 또는 종양과 정상 조직 사이의 차등 전사 프로파일이나 차등 펩티드 발현 패턴의 생성에 기반한다. 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현되거나 그런 조직 또는 세포주에서 선택적으로 발현되는 유전자의 식별은 면역 요법에서 이런 유전자에서 전사된 항원의 이용에 대한 정밀한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 상응하는 TCR이 있는 T 세포가 나타나야 하고 이 특정 에피톱에 대한 면역 내성이 없거나 최소화되어야 하므로 이러한 항원의 에피톱의 개개의 하위집단만이 그런 응용에 적합하기 때문이다. 따라서 본 발명의 매우 바람직한 구현에서, 기능성 T 세포가 있는 MHC 분자와 관련이 있게 나타나는 과다 발현된 그런 펩티드 또는 선택적으로 발현된 단백질만 선택하는 것은 중요하다. 그런 기능성 T 세포는 특정 항원에 의해 자극되었을 때 클론적으로 확대되고 효과기 기능("효과기 T 세포")을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다.
- [0036] 본 발명에 따른 특정 TCR(예컨대, 가용성 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(골격)에 의해 펩티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 펩티드의 면역원성은 이차적인 것이다. 이러한 경우 그 제시가 결정 요인이다.

발명의 내용

- [0037] 본 발명의 제 1 양태에서, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 관한 것

으로, 상기 변이체는 MHC에 결합 및/또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며, 상기 펩티드는 기저의 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0038] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 대해 적어도 77%, 바람직하게는 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드나 변이체가 갖는 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.

[0039] 다음 표에는 본 발명에 따른 펩티드들과 각각의 서열 식별 번호 그리고 이 펩티드들의 장래의 출처(기저) 유전자들이 나와 있다. 표 3의 펩티드는 소위 "대안적" 또는 "짧은" 오픈 리딩 프레임으로부터 유래된 펩티드이다. 각각의 펩티드 서열에 대하여, 하나의 예시적 출처 전사물 ID(Ensemble(Aken et al., 2016) 또는 RefSeq(O'Leary et al., 2016) 주석)가 제시된다. 펩티드는 더 나아가 여기에 나열되지 않은 추가적 또는 대안적 전사물로부터 유래할 수 있다.

[0040] 표 3에서, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 71의 펩티드는 HLA-A*02에 결합한다. 표 4의 펩티드는 인간 내인성 레트로바이러스로부터 유래하는 펩티드이다. 각 펩티드마다 하나의 예시적 염색체 위치가 제시된다. 펩티드는 더 나아가 여기에 나열되지 않는 추가적 또는 대안적 염색체 위치에 맵핑될 수 있다. 표 4에서, 서열 식별 번호 72 내지 서열 식별 번호 74의 펩티드는 HLA-A*02에 결합하며, 서열 식별 번호 75 내지 서열 식별 번호 95의 펩티드는 다른 HLA-클래스 I에 결합한다(HLA 대립유전자 참조). 표 5의 펩티드는 인간 게놈에 대한 직접 참조가 없는 펩티드이다. 표 5에서, 서열 식별 번호 96 내지 서열 식별 번호 101의 펩티드는 HLA-A*02에 결합한다.

[0041] [표 3]

[0042] 대안적 또는 짧은 오픈 리딩 프레임에서 본 발명에 따른 펩티드.

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드	예시적 출처 전사물 ID
1	KLLDFSTRI	NUDCD2-001	ENST00000521797
2	ALLDVLVKL	COLPDG-001	ENST00000225964
3	FLLVPSPIWQL	altORF-001	ENST00000430553
4	YLGDSHVLL	altORF-002	ENST00000356971
5	LVWEVVESV	altORF-003	ENST00000425076
6	ALHDSPVYL	altORF-004	ENST00000584912
7	ALWEEVKATSL	altORF-005	ENST00000361298
8	ILQSLVPAA	altORF-006	ENST00000595125
9	FLQEGDLISV	altORF-007	ENST00000463488
10	SLLDKLSGI	altORF-008	ENST00000374472
11	ALLPHAPEAV	altORF-009	ENST00000621654
12	HLDSMNVSI	altORF-010	ENST00000558088
13	FLDEGSLLRL	altORF-011	ENST00000484411
14	LLIEVSEEL	altORF-012	ENST00000561317

[0043]

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드	예시적 출처 전사물 ID
15	NLVMPLLHI	altORF-013	ENST00000326799
16	ALLDAEQSPVAL	altORF-014	ENST00000559705
17	VLWDLRPSSLI	altORF-015	ENST00000503454
18	KMMTFFQGL	altORF-016	ENST00000559195
19	MLLPWLPKL	altORF-017	ENST00000568176
20	VLISLPGKV	altORF-018	ENST00000342308
21	FVFISPSFL	altORF-019	ENST00000579991
22	SLYDVPVGA	altORF-020	ENST00000540839
23	GLEVLDAALL	altORF-021	ENST00000344922
24	TLTSLNILL	altORF-022	ENST00000451303
25	ISVLNLSAI	altORF-023	ENST00000490069
26	KLWTSLVNL	altORF-024	ENST00000513284
27	IAAGVPNTDA	altORF-025	ENST00000447802
28	SQLEKPETA	altORF-026	ENST00000412585
29	LLWEFPSMA	altORF-027	ENST00000465527
30	LLRLTLLPL	altORF-028	XM_005265671
31	VVLPIVITL	altORF-029	ENST00000335507
32	VLSVSAVLGA	altORF-030	ENST00000414310
33	FASERPPSV	altORF-031	ENST00000617924
34	LLNVEPAGA	altORF-032	ENST00000525179
35	VLLNSNYPV	altORF-033	ENST00000433310
36	FQVTRTTGV	altORF-034	ENST00000406361
37	KILDEFYNV	altORF-035	ENST00000464456
38	SLSAWLPSL	altORF-036	ENST00000430083
39	YIYEDEVRL	altORF-037	ENST00000603198
40	FTLPFLVNL	altORF-038	ENST00000522371
41	LMASEGIWESSL	altORF-039	ENST00000233242
42	WITPVIPAL	altORF-040	ENST00000421212
43	AIWSTILIA	altORF-041	ENST00000420453
44	WLIPRQLAAA	altORF-042	ENST00000367145
45	ALYHQSPLL	altORF-043	ENST00000555447
46	AMVEIIPKV	altORF-044	ENST00000425544
47	ALLPGVPGL	altORF-045	ENST00000434646
48	MLAEIHPKA	altORF-046	ENST00000558952
49	FLWDPRDVVL	altORF-047	ENST00000491641
50	GLASYLDRV	altORF-048	ENST00000411618
51	GLLTQVHIL	altORF-049	ENST00000521282
52	LAFVSHVLI	altORF-050	ENST00000361835
53	TISISLSSV	altORF-051	ENST00000254627

[0044]

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드	예시적 출처 전사물 ID
54	GLSPDQVFL	altORF-052	ENST00000394904
55	MVQQEKLFV	altORF-053	ENST00000611855
56	IITNLIVNI	altORF-054	ENST00000263321
57	YVLMTSLLL	altORF-055	ENST00000414195
58	MIISHRALEL	altORF-056	ENST00000452840
59	LAASTTFLGV	altORF-057	ENST00000605962
60	LLLATLENL	altORF-058	ENST00000484275
61	VLPWQPLLL	altORF-059	ENST00000492470
62	SLLGKPLTI	altORF-060	ENST00000359318
63	LSFKRSLSI	altORF-061	ENST00000469017
64	LLLALRLSL	altORF-062	ENST00000375105
65	IAISQLTFV	altORF-063	ENST00000473984
66	ILNELLNSI	altORF-064	ENST00000505646
67	ALKELMGPA	altORF-065	ENST00000308370
68	KLLADAFKV	altORF-066	ENST00000569593
69	LLCPVVLQL	altORF-067	ENST00000497492
70	LLLQIEPAA	altORF-068	ENST00000624543
71	WLMPVMPAL	altORF-069	ENST00000473202

[0045]

[0046]

[표 4]

[0047]

인간 내인성 레트로바이러스에서 본 발명에 따른 추가의 펩티드.

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드	HLA 대립유전자	예시적 염색체 위치
72	YLSFIKILL	HERVK-001	A*02	GRCh38:3:1:198295559:1 위치: 75551556-75551582
72	YLSFIKILL	HERVK-001	A*02	GRCh38:3:1:198295559:1 위치: 75551556-75551582
73	STTHNLIL	HERVK-002	A*02	GRCh38:22:1:50818468:1 위치: 18946733-18946759
74	TLLSYSIPL	HERVK-003	A*02	GRCh38:19:1:58617616:1 위치: 58312367-58312399
75	TTQEAELLER	HERVK-004	A*68 /A*03	GRCh38:19:1:58617616:1 위치: 58312301-58312330
76	TEQGPTGVTM	HERVK-005	B*40/B*44/B*49	GRCh38:3:1:198295559:1 위치: 101694496-101694528
77	VPAGVDVITEY	HERVK-006	A*29/B*35/B*07	GRCh38:19:1:58617616:1 위치: 58312250-58312276
78	GLLPPVRAM	HERVK-007	B*15	GRCh38:22:1:50818468:1 위치: 23540302-23540328
79	KIQDPGTAF	HERVK-008	A*03	GRCh38:8:1:145138636:1 위치: 42918854-42918828

[0048]

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드	HLA 대립유전자	예시적 염색체 위치
80	RDQIVTVSV	HERVK-009	B*41/B*44	GRCh38:7:1:159345973:1 위치: 4587989-4587954
81	SLLGAATVEPPK	HERVK-010	A*03	GRCh38:6:1:170805979:1 위치: 28690343-28690369
82	LAPQMIAL	HERVK-011	B*15/B*51	GRCh38:7:1:159345973:1 위치: 141755441-141755418
83	KPRGPTPL	HERVK-012	B*08	GRCh38:20:1:64444167:1 위치: 32723848-32723877
84	RLCPAAPSEK	HERVK-013	A*03	GRCh38:20:1:64444167:1 위치: 32717605-32717631
85	VYLLTFPPL	UNKN-007	A*24	GRCh38:10:1:133797422:1 위치: 6825699-6825676
86	LMIGKRIL	HERVK-014	B*08	GRCh38:4:1:190214555:1 위치: 9130103-9130138
87	LNLVSETEAMVK	HERVK-015	A*11 (A*03)	GRCh38:1:1:248956422:1 위치: 150635421-150635392
88	DEQETDAFL	HERVK-016	B*18/B*44	GRCh38:6:1:170805979:1 위치: 77721912-77721889
89	MIFYVLQK	HERVK-017	A*03	GRCh38:4:1:190214555:1 위치: 190112774-190112748
90	YLRDFKIKR	HERVK-018	A*31 (A*03)	GRCh38:4:1:190214555:1 위치: 190107560-190107534
91	SSHFILVTF	HERVK-019	A*24	GRCh38:3:1:198295559:1 위치: 75556001-75556027
92	ELVAVTSVL	HERVK-020	B*13	GRCh38:8:1:145138636:1 위치: 145025405-145025379
93	WQKNSMRL	HERVK-021	B*15	GRCh38:20:1:64444167:1 위치: 34135051-34135074
94	MGRRRNLY	HERVK-022	B*15	GRCh38:4:1:190214555:1 위치: 165000827-165000850
95	QVKIVTLL	HERVK-023	B*52	GRCh38:12:1:133275309:1 위치: 34627138-34627115

[0049]

[0050]

[표 5]

[0051]

본 발명에 따른 인간 게놈에 대한 직접 참조가 없는 본 발명에 따른 추가의 펩티드.

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드
96	KIIEDLANTV	KRT18-001
97	GLIDDKGTIKL	CDC2-006
98	SLMEVTHDL	LARS-001
99	ALMDGSESFFV	BSG-001
100	SLGPPVGV	CIZ1-001
101	KLPEGHLPEV	AHNAK2-003

[0052]

[0053]

[표 6]

[0054]

예를 들어, 개인별 맞춤형 암 요법에 유용한 본 발명에 따른 펩티드.

서열 식별 번호	서열	펩티드 코드
102	GLDPTQFRV	POLA1-003
103	SLVSYLDKV	KRT16P-001

[0055]

[0056]

놀랍게도 본 발명의 맥락에서 대안적 오픈 리딩 프레임이 효과적인 종양 연관 항원의 출처인 것으로 나타났다. 지금까지 매우 소수의 보고서만이 그러한 항원, 예를 들어, gp75(Wang et al., Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. J Exp Med. 1996 Mar 1;183(3):1131-40) 및 NY-ESO-1/LAGE-1 ORF2(Mandic, et al., The alternative open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive CD4+ T cells, Cancer Res. 2003 Oct 1;63(19):6506-15)로부터 유래한 항원을 기술하고 있다. 비슷하

게, 매우 소수의 보고서만이 중앙 연관 항원의 실제 출처로 내인성 레트로바이러스(HERV) 서열을 논의했다 (Mullins CS and Linnebacher M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Jul;61(7):1093-100; 및 Attermann AS, et al., Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer. *Ann Oncol.* 2018 Nov 1;29(11):2183-2191). HERV가 면역학적 인식에 대해 암 세포를 감각시키는 가능성이 "내재성 보강제"로 또는 다발성 경화증과 정신분열증과 같은 신경정신 질환에서 자가면역성 유도가 가능한 자가 항원으로 제안되고 있다(Tu X, et al., Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope(HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses. *Virol Sin.* 2017 Aug;32(4):280-289).

- [0057] 본 발명은 더 나아가 일반적으로 증식성 질병, 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0058] 특히 바람직하기로는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101로 구성되는 군으로부터 선택되는 본 발명에 따른 펩티드들의 하나 또는 그 조합이다. 더 바람직하기로는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 14, 서열 식별 번호 72 내지 서열 식별 번호 81, 서열 식별 번호 96 내지 서열 식별 번호 101(표 3, 표 4 및 표 5 참조)로 구성되는 군으로부터 선택되는 펩티드들의 하나 또는 그 조합이며 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암에서 이들의 사용이다.
- [0059] 따라서 본 발명의 또 다른 양태는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁 및 자궁 내막암의 군으로부터 선택되는 증식성 질병의 바람직하게는 병용 치료를 위한 본 발명에 따른 펩티드의 사용에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명은 또한 인간 주조직 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 길 이 변이체와 같은 연장된 형태의 MHC 클래스 II 의 분자와 결합하는 능력을 가진 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 (각각) 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 따른 아미노산으로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0062] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로 상기 펩티드는 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0063] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 융합 단백질의 일부이며 특히 HLA-DR 항원 연관된 불변쇄(Ii)에 융합되거나 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 그 서열 안으로) 융합된다.
- [0064] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0065] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있고/거나 발현하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명은 질병의 치료 및 의학 특히 암의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드 또는 본 발명에 따른 상기 펩티드와 MHC의 복합체에 대해 특이적인 항체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명은 또한 T 세포 수용체(TCR), 특히 융해성 TCR(sTCR) 및 자가조직이나 동종이형 T 세포 안으로 조작된 클론된 TCR 그리고 이들은 물론 NK 세포나 상기 TCR을 포함하거나 상기 TCR과 교차 반응하는 다른 세포들을 만드는 방법에 관한 것이다.
- [0069] 항체 및 TCR은 현재 본 발명에 따른 펩티드의 면역요법 사용에 대한 추가적 예이다.
- [0070] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 이전에 기술한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본

발명은 또한 항원 제시 세포이며 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.

- [0071] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드 제조 방법에 관한 것으로, 그 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양과 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터 펩티드의 분리를 포함한다.
- [0072] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 상기 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0073] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 그 항원 제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 14, 서열 식별 번호 72 내지 서열 식별 번호 81, 서열 식별 번호 96 내지 서열 식별 번호 101, 또는 변이체 아미노산 서열을 함유한다.
- [0074] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화 T 세포에 관한 것이다.
- [0075] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 효과적인 숫자의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0076] 본 발명은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에 있어서, 설명된 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 본 발명에 따른 활성화 T 림프구, T 세포 수용체 또는 기타 펩티드 및/또는 펩티드 MHC 결합 분자의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 약제가 암에 대해 활성화이다.
- [0077] 바람직하게는 상기 약제가 세포 요법, 백신 또는 가용성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질이다.
- [0078] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 용도에 관한 것으로, 상기 암 세포가 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암이며, 바람직하게는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 세포이다.
- [0079] 본 발명은 더 나아가 암, 바람직하게는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 진단에 사용될 수 있는, 여기서 "표적"이라 불리는, 본 발명에 따른 펩티드에 기반한 바이오마커에 관한 것이다. 이 표지자는 펩티드(들) 자체의 과다제시 또는 상응하는 유전자(들)의 과발현일 수 있다. 이 표지자는 또한 치료, 바람직하게는 면역요법, 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 확인된 동일한 표적을 표적화하는 면역요법의 성공의 확률을 예측하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 가용성 TCR은 관심 대상의 MHC와 복합체인 펩티드의 존재 검출을 위해 종양의 일부를 염색하는 데 사용할 수 있다.
- [0080] 선택적으로, 항체는 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 작용기 기능을 보유한다.
- [0081] 본 발명은 또한 암 치료의 환경에서 이러한 신규 표적들의 용도에 관한 것이다.
- [0082] **발명의 상세한 설명**
- [0083] 면역 반응 자극은 숙주 면역계가 외부 물질로 인식하는 항원의 존재에 의존한다. 종양 연관 항원의 발견은 숙주의 면역계를 종양 성장에 개입하는 데 사용할 가능성을 제기했다. 면역계의 체액성 그리고 세포성 지류를 이용하는 다양한 기전이 현재 암 면역 치료에서 탐색되고 있다.
- [0084] 세포 면역 반응의 특정 요소는 종양 세포를 특정하게 인식하고 파괴하는 능력이 있다. 종양 침윤 세포 모집단 또는 말초 혈액으로부터 T 세포의 분리는 그러한 세포가 암에 대한 자연 면역 방어에서 중요한 역할을 수행함을 시사한다. 특히 CD8-양성 T 세포는 세포질에 위치한 단백질이나 결손 리보솜 산물들(DRIPS)로부터 유래된 보통 8 내지 10개의 구조적 적합 복합체(MHC)-포함 펩티드의 클래스 I 분자를 인지하며, 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC 분자는 또한 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다.

- [0085] 별도로 설명되지 않은 이상 본원에 사용된 모든 용어는 아래와 같이 정의된다.
- [0086] "T 세포 반응"이란 용어는 특이적 증식과 시험관 내에서 또는 생체 내에서 유도되는 작용기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 독성 T 세포의 경우, 효과기 기능이 펩티드 펄스, 펩티드 전조 펄스 또는 자연적 펩티드 제시 표적 세포들의 용해, 사이토킨의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 인터페론-감마, TNF-알파, 또는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.
- [0087] "펩티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 알파 아미노와 카보닐기 사이에 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 펩티드는 아미노산 9개의 길이가 바람직하지만 짧게는 아미노산 8개일 수도 있고 길게는 10, 11 또는 12개 이상일 수도 있으며, MHC 클래스 II 펩티드의 경우(본 발명의 펩티드의 연장된 변이) 그 길이가 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산일 수 있다.
- [0088] 더욱이 "펩티드"라는 용어는 알파 아미노기와 이웃 아미노산의 카보닐기 사이의 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 그 염은 예를 들어 염화물 또는 아세트산(삼불화아세트산) 염과 같은 약학적으로 허용가능한 펩티드의 염이다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 펩티드가 염의 형태가 아니거나 생체내 반대이온과 연관되지 않으므로 생체내 상태의 펩티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.
- [0089] "펩티드"라는 용어는 "올리고펩티드"도 포함한다. 여기에서 "올리고펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기 및 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 올리고펩티드의 길이는 정확한 에피토프 또는 에피토프들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고펩티드는 일반적으로 약 30개 아미노산 잔기보다 길이가 짧고, 15개 아미노산보다 길다.
- [0090] "폴리펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기 및 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 발명에서 폴리펩티드의 길이는 정확한 에피토프들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고 펩티드와 다르게, 폴리펩티드는 약 30개 아미노산 잔기 이상의 분자를 가지고 있는 것을 지칭한다.
- [0091] 이런 분자의 펩티드, 올리고펩티드, 단백질, 또는 폴리뉴클레오티드 코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역성"(따라서 본 발명에서의 "면역원")이다. 본 발명의 경우, 면역성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정하게 정의된다. 그러므로, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자이고, 본 발명의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 분자이다. 다른 양태에서, 면역원은 펩티드, 펩티드와 MHC의 복합체, 올리고펩티드 및/또는 특정 항체나 항체에 대한 TCR을 높이는데 사용되는 단백질일 수 있다.
- [0092] 클래스 I T 세포 "에피토프"는 적당한 친화력을 가진 MHC/펩티드 혼합물에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼항 혼합물(MHC 클래스 I 알파 쇄, 베타-2-미세글로블린 및 펩티드)을 생성하는 클래스 I 또는 II MHC 수용체에 결합하는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드는 일반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 가장 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.
- [0093] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 인코딩하는 세 개의 유전자 좌가 있다(인간의 MHC-분자는 또한 지정된 인간 백혈구 항원이다(HLA)): HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 및 HLA-A*07은 이러한 유전자 좌에서 발현할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.
- [0094] 표 7은 HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 및 HLA-B*44 혈청형의 발현 빈도 F이다. 일배체형 빈도 Gf는 미국에서 650만 명이 넘는 자원 공여자의 레지스트리로부터 얻은 HLA형 결정 데이터를 사용한 연구에서 유래한다(Gragert et al., 2013). 일배체형 빈도란 개별 염색체 상의 뚜렷한 대립유전자의 빈도를 말한다. 포유동물 세포 내의 이배수 염색체 조합으로 인해, 이 대립유전자의 유전형 발생 빈도가 더 높으며 하디-와인버그 원칙($F = 1 - (1-Gf)^2$)을 사용하여 계산할 수 있다.

[0095] [표 7]

대립유전자	집단	대립유전자 빈도로부터 계산된 표현형(F)
A*02	아프리카인(N=28557)	32.3%
	유럽 백인(N=1242890)	49.3%
	일본인(N=24582)	42.7%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	46.1%
	동남 아시아인 (N=27978)	30.4%
A*01	아프리카인(N=28557)	10.2%
	유럽 백인(N=1242890)	30.2%
	일본인(N=24582)	1.8%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	14.0%
	동남 아시아인 (N=27978)	21.0%
A*03	아프리카인(N=28557)	14.8%
	유럽 백인(N=1242890)	26.4%
	일본인(N=24582)	1.8%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	14.4%
	동남 아시아인 (N=27978)	10.6%
A*24	아프리카인(N=28557)	2.0%
	유럽 백인(N=1242890)	8.6%
	일본인(N=24582)	35.5%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	13.6%
	동남 아시아인 (N=27978)	16.9%
B*07	아프리카인(N=28557)	14.7%
	유럽 백인(N=1242890)	25.0%
	일본인(N=24582)	11.4%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	12.2%
	동남 아시아인 (N=27978)	10.4%
B*08	아프리카인(N=28557)	6.0%
	유럽 백인(N=1242890)	21.6%
	일본인(N=24582)	1.0%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	7.6%
	동남 아시아인 (N=27978)	6.2%
B*44	아프리카인(N=28557)	10.6%

[0096]

	유럽 백인(N=1242890)	26.9%
	일본인(N=24582)	13.0%
	히스패닉, 남미 + 중미(N=146714)	18.2%
	동남 아시아인 (N=27978)	13.1%

[0097]

[0098]

본 발명의 펩티드는 바람직하게 본 발명의 백신에 포함되면 여기서 설명된 바와 같이 A*02에 결합한다. 백신은 또한 범결합 MHC 클래스 II 펩티드를 포함할 수 있다. 그러므로 본 발명의 백신은 A*02 양성인 환자에서 암의 치료에 사용할 수 있는 반면, 이러한 펩티드의 범결합 성격으로 인해 MHC 클래스 II 동종이형에 대한 선택이 필요하지 않다.

[0099]

본 발명의 A*02 펩티드가 다른 대립유전자, 예를 들어 A*24에 결합하는 펩티드와 합쳐지면, MHC 클래스 I 대립자만을 해결하는 것에 비해 더 높은 비율의 환자 모집단을 치료할 수 있다. 하나의 대립 유전자로는 대부분의 모집단에서 50% 미만의 환자를 해결할 수 있는 반면, HLA-A*24 및 HLA-A*02 에피토프를 포함하는 백신은 모든 관련된 모집단에서 60% 이상의 환자를 치료할 수 있다. 구체적으로 다양한 지역에서 이러한 대립유전자의 적어도 하나에 양성인 환자의 비율은 다음과 같다: 미국 61%, 서유럽 62%, 중국 75%, 대한민국 77%, 일본

86%(www.allelefrequencias.net으로부터 계산했음).

[0100] [표 8]

[0101] 유럽 백인 인구에서 HLA 대립유전자의 범위(계산 출처: (Gragert et al., 2013)).

	범위(적어도 하나의 A-대립유전자)	B*07 와 조합	B*44 와 조합	B*07 및 B*44 와 조합
A*02 / A*01	70%	78%	78%	84%
A*02 / A*03	68%	76%	76%	83%
A*02 / A*24	61%	71%	71%	80%
A*01 / A*03	52%	64%	65%	75%
A*01 / A*24	44%	58%	59%	71%
A*03 / A*24	40%	55%	56%	69%
A*02 / A*01 / A*03	84%	88%	88%	91%
A*02 / A*01 / A*24	79%	84%	84%	89%
A*02 / A*03 / A*24	77%	82%	83%	88%
A*01 / A*03 / A*24	63%	72%	73%	81%
A*02 / A*01 / A*03 / A*24	90%	92%	93%	95%

[0102]

[0103] 한 바람직한 구현에서 "뉴클레오티드 서열"이란 용어는 디옥시리보뉴클레오티드의 이중중합체를 말한다.

[0104]

특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 인코딩하는 DNA 분절은 cDNA 단편들과 짧은 올리고뉴클레오티드 링커, 또는 올리고뉴클레오티드의 연속에서 미생물이나 바이러스 오피론에서 유도된 규제 요소를 가진 재조합 모사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공하기 위해서 조립된다.

[0105]

본원에 사용된 용어 "펩티드를 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 예를 들어, 수지상 세포 또는 TCR 제조에 유용한 다른 세포계에 의해 서열이 발현되는 생물학적 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.

[0106]

본원에 사용된 핵산 서열에 대한 지칭에는 한 가닥 및 두 가닥 핵산 모두가 포함된다. 그러므로, 예를 들어 DNA의 경우 특정 서열이란 환경에서 대안적으로 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 한 가닥 DNA, 보완이 있는 이러한 서열의 중복(두 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보완을 지칭한다.

[0107]

용어 "코딩 영역"은 자연적인 계층 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분을 지칭한다(즉, 유전자 본래의 발현 생성물에 대한 생체내 영역 코딩).

[0108]

코딩 영역은 비변이("정상")이거나 변이 또는 개조된 유전자로부터 유래할 수 있거나, 심지어 DNA 서열, 또는 실험실에서 DNA 합성의 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자로부터 유래할 수 있다.

[0109]

용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 제품인 폴리펩티드 또는 단백질 또는 유전적 코딩 퇴화로 인해 결과된 어떤 핵산 서열 코딩과 상응하며 그러므로 같은 아미노산을 코딩한다.

[0110]

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

[0111]

용어 "DNA 분절"은 최소한 하나의 상당히 순수한 형태로 분리되는 DNA에서 유도된 별도의 단편 또는 큰 DNA 구성의 구성 요소로서의 형태의 DNA 중합체를 말한다, 예를 들어, 내생 오염이 없고 분절의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도이며 그의 표준 생화학 방법에 따른 구성 요소 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어, 복제 벡터이다. 이러한 분절은 일반적으로 진행 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 코딩 영역의 조작이나 발

현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.

- [0112] 용어 "프라이머"는 하나의 표준 DNA와 짝을 이룰 수 있는 짧은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라아제가 더욱 시리보뉴클레오티드 채 합성을 시작하는 유리 3'-OH 말단을 제공한다.
- [0113] 용어 "프로모터"는 전사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라아제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.
- [0114] 용어 "단리"는 물질이 원래의 환경(예컨대, 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들어, 자연 발생하는 살아 있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 분리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된다. 그런 폴리뉴클레오티드는 벡터의 부분이고/거나 그런 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 구성의 한 부분일 수 있으며, 그런 벡터 또는 구성이 자연 환경의 한 부분이 아닐 때 여전히 단리될 수 있다.
- [0115] 본 발명에 의거해 밝혀지는 폴리뉴클레오티드 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정제" 상태일 수도 있다. 용어 "정제"는 절대 순도를 필요로 하지 않고; 오히려, 그것은 상대적인 정의로 만들어 졌으며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로서 상당히 정제된 제제 또는 오직 부분적으로 정제된 제제를 포함할 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리에서 단리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 최소한 한자리 수, 바람직하게 두자리 또는 세자리 수, 더 바람직하게는 네자리 또는 다섯자리 수의 시작 또는 자연의 물질의 정제는 명시적으로 심사숙고된다. 또한 바람직하게는 99.999 중량%, 또는 최소한 99.99 중량% 또는 99.9 중량%; 및 심지어 99 중량%보다 큰 정제도를 가진 제시된 폴리펩티드는 명시적으로 심사숙고된다.
- [0116] 본 발명에서 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물뿐만 아니라, 그런 핵산 및/또는 그런 폴리펩티드를 가진 발현 벡터는 "강화된 형태"일 수 있다. 본원에 사용된 것처럼, 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도의(예를 들어) 최소한 2, 5, 10, 100, 또는 1000 배 정도이고, 유리하게 0.01 중량%, 바람직하게는 최소한 약 0.1 중량% 정도이다. 약 0.5 중량%, 1 중량%, 5 중량%, 10 중량%, 및 20 중량% 강화된 제제도 심사숙고된다. 서열, 구성, 벡터, 클론, 및 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 단리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은 예를 들어 토끼 또는 쥐, 및 인간을 포함한 포유류 같은 동물에게 단독으로 또는 임의적으로 적당한 보조제와 함께 투여했을 때 면역 반응을(즉, 면역성 활동이 있는) 생성하는 단편이고, 상기 면역 반응은 인간과 같은 수용체 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 펩티드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.
- [0117] 본원에 사용된 "부분", "분절" 및 "단편"이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 언급한다. 예를 들어, 만약에 폴리펩티드가 트립신이나 키모트립신 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해 생성된 생성물을 지칭한다.
- [0118] 본 발명에 따라, 서열을 말할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동등한"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 말한다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:
- [0119] 백분율 동일성 = $100 [1 - (C/R)]$
- [0120] 여기서 C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이다. 또한,
- [0121] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산, 및
- [0122] (ii) 기준 서열의 각 차이, 및
- [0123] (iii) 비교 서열의 정렬된 기초 또는 아미노산과 다른 기준 서열에서 각 정렬된 염기 또는 아미노산은 차이를 구성하며,
- [0124] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 하고;
- [0125] R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 공백도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.

- [0126] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 큰 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.
- [0127] 위에서 언급된 바와 같이, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 대해 88% 상동성인 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 본 발명의 펩티드는 인간 구조조직 합 복합체(MHC) 클래스 I의 분자에 결합하는 능력 또는 연장된 버전의 상기 펩티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0128] 본 발명에서, "상동"이라는 용어는 두 개의 아미노산 서열, 즉, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 일치 정도를 일컫는다. 전술한 "상동"은 비교될 두 개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하여 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는 예를 들어 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용이 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.
- [0129] 이 분야의 당업자는 특정 펩티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 펩티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).
- [0130] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"에 의해, 발명자들은 예를 들어, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변경되어 그 펩티드가 여전히 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101의 아미노산 서열로 구성된 펩티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다(예를 들어 그들을 자연적으로 발생하는 다른 아미노산 잔기 또는 다른 측쇄로 펩티드로 구성된다). 예를 들어, 펩티드 변형에 의해 HLA-A*02 또는 -DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 홈과 상호 작용하여 결합하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있으며 이에 따라 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 향상시키지 않더라도 적어도 유지한다.
- [0131] 이 T 세포들은 그 결과로 본 발명의 한 양태에서 정의가 된 바 있는 같은 혈족의 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 상호 반응을 하고 그 세포들을 죽인다. 과학 문헌 및 데이터 베이스(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며 이는 결합 홈을 이루고 있는 폴리펩티드의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 따라서 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 정해진 아미노산을 변형할 수 있을 것이며 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 결정할 수 있어야 한다. 이 본 발명의 변이체는 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 유지하고, 이는 그 결과로 본 발명의 양태에서 같은 혈족의 펩티드라고 정의가 된 자연 아미노산 서열을 포함하고 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 상호반응을 하고 이들을 죽인다.
- [0132] 여기에서 밝혀진 본래(변형되지 않은) 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 다른, 아마도 선택적인, 펩티드 쇠의 부위의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게 이러한 치환은 아미노산 쇠의 끝에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들어, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 한 아미노산이 구조 및 특성이 유사한 아미노산에 의해 치환됨으로써 그 성격이 보존적일 수 있다. 심지어 더 보존적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종족에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 용납되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성, 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"를 정의하는 데 기본이 된다.
- [0133] 여기서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 그룹 중 하나의 교환으로 정의된다: 그룹 1: 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2: 극성, 음전하를 가진 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3: 극성, 양전하를 가진 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4: 큰, 지방족, 비극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5: 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).
- [0134] 한 양태에서, 보존적 치환은 "The Atlas of Protein Sequence and Structure.Vol.5", *Nat1.Biomedical Research*에서 Dayhoff에 기술된 것을 포함할 수 있으며, 그 전문이 참조문헌으로 본원에 포함된다. 예를 들어, 한 양태에서, 다음 그룹 중 하나에 속하는 아미노산들은 서로 교환될 수 있으므로 보존적 치환이 된다: 그룹 1:

알라닌(A), 프롤린(P), 글리신(G), 아스파라긴(N), 세린(S), 트레오닌(T); 그룹 2: 시스테인(C), 세린(S), 티로신(Y), 트레오닌(T); 그룹 3: 발린(V), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 알라닌(A), 페닐알라닌(F); 그룹 4: 리신(K), 아르기닌(R), 히스티딘(H); 그룹 5: 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W), 히스티딘(H); 및 그룹 6: 아스파르트산(D), 글루탐산(E). 한 양태에서, 상보적 아미노산 치환은 다음으로부터 선택될 수 있다: T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G 및/또는 T→S.

[0135] 한 양태에서, 보존적 아미노산 치환에는 같은 클래스의 다른 아미노산에 의한 아미노산의 치환이 포함될 수 있으며, 예를 들어 클래스는 다음과 같다: (1) 비극성: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) 비하전 극성: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; 및 (4) 염기성: Lys, Arg, His. 다른 보존적 아미노산 치환은 다음과 같이 이루어질 수도 있다: (1) 방향성: Phe, Tyr, His; (2) 양성자 주개: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp 및 (3) 양성자 받개: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln(예를 들어 미국 특허 10,106,805를 참조하며, 그 전문이 참조문헌으로 본원에 포함된다).

[0136] 다른 양태에서, 보존적 치환은 표 1에 따라 이루어질 수 있다. 단백질 변형에 대한 내성의 예측 방법은 예를 들어, Guo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101(25):9205-9210 (2004)에서 찾을 수 있으며, 그 전문이 참조문헌으로 본원에 포함된다.

[0137] [표 1]

보존적 아미노산 치환	
아미노산	치환(다른 치환은 당업계에 알려져 있음)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[0138]

[0139] 다른 양태에서, 보존적 치환은 표 2에서 "보존적 치환"이란 제목 하에 있는 것들을 포함할 수 있다. 그러한 치환이 생물학적 활성도의 변경을 초래하는 경우, 표 2에서 "예시적 치환"으로 분류된 보다 실질적인 변경이 개입될 수 있으며 필요에 따라 그 생성물이 선별될 수 있다.

[0140] [표 2]

아미노산 치환		
원래 잔기 (자연적으로 발생하는 아미노산)	보존적 아미노산 치환	예시적 치환
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신
Leu (L)	Ile	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신

[0141]

[0142] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보존적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.

[0143] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구조를 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산이 본 발명의 항원 펩티드에서 흔히 발견되지만 여기에서 아직 공개가 되어야하는 L-아미노산을 치환할 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질성 아미노산이 아닌) 역시 본 발명에 따라 면역원과 면역원성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환 목적으로 사용될 수 있다.

[0144] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 펩티드의 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 펩티드의 항원성에 추가적 효과 또는 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 테스트된다. 최대한으로, 펩티드의 4개가 넘는 위치에서 동시에 치환될 수 없을 것이다.

[0145] 여기서 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 펩티드는, 인간 주조직 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받지 않고, 하나 또는 두 개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환될 수 있다. 또 다른 구현에서, 여기서 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성되는 펩티드에 있어서, 비변형 펩티드에 비해 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스-I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 상당히 변경되거나 부정적으로 영향을 받지 않고, 하나 또는 두 개의 아미노산이 해당되는 상보적 교환 파트너들(아래 참조)과 교환될 수 있다.

[0146] T 세포 수용체와의 상호작용에 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은, 이와 결합됨으로써 T 세포의 반응성에 큰 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있

다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본 발명의 펩티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는(발명자들이 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다고 일컫는) 어떠한 펩티드가 될 수도 있다.

[0147] [표 9]

[0148] 다음 서열 식별 번호에 따른 펩티드의 변이체 및 모티프: 4, 8, 72, 74, 96 및 97.

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 4	Y	L	G	D	S	H	V	L	L		
변이체									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
	Q							I			
	Q										
	Q							A			
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 8	I	L	Q	S	L	V	P	A	A		
변이체									V		
									I		
									L		
		M							V		
		M							I		
	M							L			

[0149]

		Q							I		
		Q									
		Q							A		
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
서열 식별 번호 74	T	L	L	S	Y	S	I	P	L		
변이체									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
	Q							I			
	Q										
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
서열 식별 번호 96	K	I	I	E	D	L	A	N	T	V	
변이체		L									
		L								I	
		L								L	
		L								A	
		M									
		M								I	
		M								L	
	M								A		

[0151]

	A										
	A								I		
	A								L		
	A								A		
	V										
	V								I		
	V								L		
	V								A		
	T										
	T								I		
	T								L		
	T								A		
	Q										
	Q								I		
	Q								L		
	Q								A		
위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
서열 식별 번호 97	G	L	I	D	D	K	G	T	I	K	L
변이체											V
											I
											A
	M										V
	M										I
	M										
	M										A
	A										V
	A										I
	A										
	A										A
	V										V
	V										I
	V										
	V										A
	T										V
	T										I
	T										
	T										A
	Q										V
	Q										I

[0152]

	Q										
	Q										A

[0153]

[0154]

더 긴(연장된) 펩티드도 적합할 수 있다. 또한 대개 길이가 8 내지 11개의 아미노산이지만, MHC 클래스 I 에피토프가 더 긴 펩티드로부터 처리되는 펩티드 또는 실제 에피토프를 포함하는 단백질에 의해 생성될 가능성도 있다. 실제 에피토프가 양측에 있는 장기는 처리 동안 실제 에피토프를 노출하는 데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기이다.

[0155]

본 발명의 펩티드는 4개까지의 아미노산만큼 연장할 수 있는데, 즉, 1, 2, 3 및 4개의 아미노산이 4:0과 0:4 사이에서 일체의 조합으로 양쪽 어디로든 추가될 수 있다. 본 발명에 따른 연장의 조합은 표 10에서 찾아볼 수 있다:

[0156]

[표 10]

[0157] 본 발명의 펩티드 연장의 조합.

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

[0158]

[0159] 연장/확장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드나 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은 펩티드의 안정성이나 가용성 강화를 위해 사용될 수 있다.

[0160] 따라서, 본 발명의 에피톱은 자연적으로 발생하는 종양 관련 또는 종양 특이적 에피톱과 동일하거나 실질상 동등한 항원적 활성력을 가지고 있는 한, 참조 펩티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피톱을 포함한다.

[0161] 다른 구현에 있어서 펩티드는 한쪽 또는 양쪽에서 4개가 넘는 아미노산으로 연장되며, 바람직하게는 최대 30개의 아미노산 길이로 연장된다. 이는 MHC 클래스 II 결합 펩티드로 이어질 수 있다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법으로 시험할 수 있다.

[0162] 따라서, 본 발명은 MHC 클래스 I 에피톱의 펩티드와 변이체를 제공하며 여기서 펩티드 또는 변이체는 전체 길이가 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개이고, 이는 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이다. 연장된 클래스 II 결합 펩티드의 경우 그 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 아미노산일 수도 있다.

[0163] 물론, 본 발명에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 구조적 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖게 된다. 펩티드 또는 변이체의 MHC 복합체에 대한 결합은 당업계의 방법에 의해 시험할 수 있다.

[0164] 바람직하게는, 본 발명에 따른 펩티드 특정 T 세포가 치환 펩티드에 대해 시험될 때, 치환 펩티드가 배경에 상대적으로 세포 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 펩티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μM 이하, 더 바람직하게 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게 약 100 pM 이하, 및 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 펩티드가 1명 이상, 최소 2명 및 더 바람직하게는 3명의 개인으로부터의 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.

[0165] 본 발명의 특히 바람직한 구현에서 그 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.

[0166] "본질적으로 구성되는"이란 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101의 어느 서열 또는 이 변이체 외에도 본 발명에 따른 추가적인 N- 및/또는 C-말단에 위치하고 있는 아미노산이 MHC 분자 에피톱에 대한 에피톱으로 기능하는 펩티드의 한 부분을 반드시 형성하지 않는 펩티드를 일컫는다.

[0167] 그럼에도 불구하고, 이 길이의 아미노산은 본 발명에 따르면 세포 안으로의 효율적인 펩티드의 도입에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현에서는, 펩티드는 예를 들어 NCBI, GenBank Accession-number X00497에서 유도된 것처럼 HLA-DR 항원-결합 불변 쇠(p33, 다음의 "Ii")의 80개 N-말단 아미노산을 포함하고 있는 융합 단백질의 일부이다. 다른 융합에서는, 본 발명의 펩티드는 항체에 의해 특이적으로 표적이 될 수 있도록 여기서 설명된 상기 항체나 그 기능적 일부 특히 항체의 서열에 대해 또는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체에 대해 또는 그 안으로 융합될 수 있다.

[0168] 추가적으로, 펩티드 또는 변이체는 안정성 및/또는 MHC 분자와의 결합성을 높여 더 강한 면역 반응을 일으킬 수 있도록 변형될 수 있다. 펩티드 서열의 최적화를 위한 방법은 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어 반대 펩티드 결합 또는 비-펩티드 결합을 도입하는 것이 있다.

[0169] 반대 펩티드 결합에서는 아미노산 잔기가 펩티드(-CO-NH-) 연결로 결합되어 있지 않으나 펩티드 결합이 반대로

되어있다. 이러한 역-인버스 펩티드 모방형 물질은 이 분야에서 잘 알려진 방법으로 생성될 수 있으며, 이 방법의 예는 이 문헌의 참조문헌으로 포함된 Meziere 등(1997)(Meziere et al., 1997)이다. 이 방법은 백본의 변경을 포함하지만, 측쇄의 방향을 바꾸지 않는 유사펩티드를 만드는 것을 포함한다. Meziere 등(Meziere et al., 1997)은 MHC 결합과 T 조력 세포 반응에서 이 유사펩티드가 유용하다는 것을 보여준다. CO-NH 대신에 NH-CO 결합을 포함하고 있는 역-인버스 펩티드는 단백질 가수 분해에 대한 저항력이 훨씬 높다.

[0170] 비-펩티드 결합의 예는 $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, 및 $-CH_2SO-$ 이다. 미국 특허 4,897,445는 기본 과정을 거쳐 합성된 폴리펩티드와 아미노 알데히드와 아미노산을 $NaCNBH_3$ 의 존재 하에 반응시켜 생성된 비-펩티드 결합을 포함한 폴리펩티드 쇄의 비-펩티드 결합($-CH_2-NH$) 고체상 합성의 방법을 제공한다.

[0171] 위에서 기술된 서열을 가지고 있는 펩티드는 안정성, 생물가용성, 및/또는 펩티드의 결합을 증가시키기 위해 추가적인 화학기를 아미노 및 또는 카복시 말단에 결합할 수도 있다. 예를 들어, 카보벤족실, 단실, 또는 t-부틸옥시카보닐 기 등의 소수성 기가 펩티드의 아미노 말단에 추가될 수 있다. 비슷하게, 아세틸기 또는 9-플루오레닐메톡시-카보닐기가 펩티드의 아미노 말단에 위치할 수도 있다. 또한, 소수성 기, t-부틸옥시카보닐, 또는 아미도기 또한 펩티드의 카복시 말단에 추가될 수 있다.

[0172] 또한, 이 발명의 펩티드는 그들의 입체 배치를 변화시키기 위해 생성될 수도 있다. 예를 들어, 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 D-이성질체가 보통의 L-이성질체 대신에 사용될 수도 있다. 더 나아가서, 발명의 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-자연적으로 일어나는 아미노산 잔기와 치환될 수도 있다. 이와 같은 변화는 안정성, 생물가용성, 및/또는 본 발명의 펩티드의 결합을 증가시킬 수 있다.

[0173] 유사하게, 이 발명의 펩티드 또는 변이체는 특정한 아미노산을 펩티드 생성 전 또는 후에 반응시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예는 이 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어 이 문헌의 참조문헌에 포함되어 있는 R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004(Lundblad, 2004)에 잘 묘사되어 있다. 아미노산의 화학 변형은 아실화, 아미딘화, 리신의 피리독실화, 환원성 알킬화 반응, 아미노산의 2,4,6-트리니트로벤젠 설포화(TNBS)에 의한 트라이니트로 벤질화, 카복실기의 아미드 변형 및 퍼포민산에 의한 설피드릴 변형, 시스틴의 시스테릭산으로의 산화, 머큐리얼 유도체 생성, 다른 티올 합성의 다이설피드 생성, 말레이미드와의 반응, 요오드화 아세트산 또는 요오드 아세트 아미드에 의한 카복시메틸화 및 시안산 염에 알칼리성 산도에서의 의한 카바미드화를 포함하지만 이에 국한되지 않은 변형을 말한다. 이에 관해서, 당업자는 더 광대한 단백질의 화학 변형에 대한 방법론에 대해서는 *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000)(Coligan et al., 1995)의 15장을 참조하길 바란다.

[0174] 간단히 말하면, 예를 들어 단백질의 아르기닌 잔기는 흔히 페닐글리옥산, 2,3-부탄디온 및 1,2-사이클로헥산디온과 같은 인접한 디카르보닐 화합물과의 반응에 근거하여 부가물을 형성한다. 다른 예는 메틸글로옥살과 아르기닌 잔기와의 반응이다. 시스테인은 리신과 히스티딘과 같은 다른 친핵성 좌의 동시 변형 없이 변형시킬 수 있다. 그 결과 다수의 시약들이 시스테인 변형에 사용가능하다. Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)와 같은 회사들의 웹사이트에서는 특정한 시약에 관한 정보를 제공하고 있다.

[0175] 단백질에서 이황화 결합의 선택적 환원 또한 흔하다. 단백질에서 이황화 결합은 생물약제의 열 처리 동안 형성되어 산화될 수 있다. 우드워드와 시약 K는 특정 글루탐산 잔기의 변형에 사용될 수 있다. N-(3-디메틸아미노)프로필-1-N'-에틸카르보다이미드를 사용하여 리신 잔기와 글루탐산 잔기 사이의 분자 내 가교를 형성할 수 있다. 예를 들어 디메틸카보네이트는 단백질에서 히스티딘 잔기의 변형을 위한 시약이다. 히스티딘은 4-하이드록시-2-노네날을 사용하여 변형시킬 수 있다. 리신 잔기와 다른 α -아미노기의 작용은, 예를 들어, 펩티드의 표면 결합 또는 단백질/펩티드들의 가교에 유용하다. 리신은 폴리(에틸렌)글리콜의 부착의 부위이며 단백질의 당화에서 중요 변형 부위이다. 단백질에서 메티오닌 잔기는 예를 들어 이오도아세트아미드, 브로모에틸아민 및 클로르아민 T를 사용하여 변형시킬 수 있다.

[0176] 테트라니트로메탄 및 N-아세틸이미다졸은 티로신 잔기의 변형에 사용할 수 있다. 디티로신의 형성을 통한 가교 형성은 과산화 수소/구리 이온으로써 성취할 수 있다.

[0177] 트립토판의 변형에 대한 최근의 연구에서는 N-브로모숙신이미드, 브롬화 2-하이드록시-5-니트로벤질 또는 3-브로모-3-메틸-2-(2-니트로페닐메카프토)-3H-인돌(BPNS-스카톨)이 사용된 바 있다.

[0178] PEG를 이용한 치료용 단백질과 펩티드의 성공적인 변형은 흔히 동시 순환 반감기의 증가를 시키는 것과 연관되

어 있는 반면, 단백질과 글루타르알데히드, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 및 포름알데히드와 교차 결합이 히드로젤의 제조에 사용된다. 면역 치료를 위한 알레르겐의 화학적 변형은 종종 칼륨 시안산염의 카바미드화와 관련이 있다.

[0179] 펩티드 또는 변이체, 여기에서 펩티드는 변환되었거나 비-펩티드 결합을 포함하는 것이 본 발명 구현에서 바람직하다.

[0180] 본 발명의 또 다른 구현은 비자연적으로 발생하는 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되며 약학적으로 허용가능한 염으로 합성적으로 생산되었다(예컨대, 합성되었다). 펩티드를 합성적으로 생성하는 방법들은 당업계에서 잘 알려져 있다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 생체내 상태(들)에서의 펩티드와 실질적으로 다르며, 이는 생체 내에서 생성된 펩티드는 염이 아니기 때문이다. 펩티드의 비자연적 염 형태는 특히 예를 들어 여기서 공개된 펩티드 백신과 같이 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 맥락에서 상기 펩티드의 용해도를 매개한다. 치료할 시험대상자에게 펩티드를 효율적으로 제공하기 위해서는 충분하며 적어도 실질적인 펩티드(들)의 용해도가 요구된다. 바람직하게, 상기 염은 펩티드의 약학적으로 허용가능한 염이다. 본 발명에 따른 이러한 염에는 음이온으로 PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- , 그리고 양이온으로 NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 및 Ba^{2+} 를 포함하는 호프마이스터 계열의 염과 같은 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 염이 포함된다. 특히 염은 $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4CH_3COO , NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , Rb_4CH_3COO , Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , $KClO_4$, KI , $KSCN$, Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , $NaCH_3COO$, $NaCl$, $NaBr$, $NaNO_3$, $NaClO_4$, NaI , $NaSCN$, $ZnCl_2$, Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , $CsCH_3COO$, $CsCl$, $CsBr$, $CsNO_3$, $CsClO_4$, CsI , $CsSCN$, Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , $LiCH_3COO$, $LiCl$, $LiBr$, $LiNO_3$, $LiClO_4$, LiI , $LiSCN$, Cu_2SO_4 , $Mg_3(PO_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $Mg(H_2PO_4)_2$, Mg_2SO_4 , $Mg(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$, $MgBr_2$, $Mg(NO_3)_2$, $Mg(ClO_4)_2$, MgI_2 , $Mg(SCN)_2$, $MnCl_2$, $Ca_3(PO_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $Ca(H_2PO_4)_2$, $CaSO_4$, $Ca(CH_3COO)_2$, $CaCl_2$, $CaBr_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Ca(ClO_4)_2$, CaI_2 , $Ca(SCN)_2$, $Ba_3(PO_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $Ba(H_2PO_4)_2$, $BaSO_4$, $Ba(CH_3COO)_2$, $BaCl_2$, $BaBr_2$, $Ba(NO_3)_2$, $Ba(ClO_4)_2$, BaI_2 및 $Ba(SCN)_2$ 로부터 선택된다. 특히 바람직하기로는 예를 들어 염화물 또는 아세트산(트리플루오로아세트산) 염과 같은 NH 아세테이트, $MgCl_2$, KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , $NaCl$ 및 $CaCl_2$ 이다.

[0181] 보통, 펩티드와 변이체(적어도 펩티드 링크를 아미노산 잔기 사이에 포함하는 것들)는 Lukas et al. 및 그 문헌의 참조 자료에서 기술된 바처럼 고체상 펩티드 합성의 Fmoc-폴리아미드 모드에서 합성될 수 있다(Lukas et al., 1981). 그리고 여기에 인용된 참조문헌에서 공개된 Fmoc-폴리아미드 방식의 고체상 펩티드 합성에 의해 합성될 수 있다. 일시적인 N-말단 기 보호는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc)에 의해 제공된다. 이렇게 염기 불안정한 보호기의 반복적인 절단은 N,N-디메틸포름아미드의 20% 피페리딘을 이용하여 이루어진다. 측쇄 기능은 부틸 에터(세린, 트레오닌 및 티로신의 경우), 부틸 에스터(글루탐산 및 아스파르트산의 경우), 부틸옥시카보닐 변이체(리신과 히스티딘의 경우), 트라이틸 변이체(아르기닌의 경우) 그리고 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠술폰닐 유도체(아르기닌의 경우)로서 보호될 수 있다. 글루타민 또는 아스파라긴이 C-말단의 잔기인 경우, 4,4'-디메톡시벤즈히드릴이 사용되어 측쇄 아미도 기능을 보호한다. 고체형 보조제는 디메틸아크릴아미드(백본-모노머), 비스아크릴로일에틸렌 디아민(가교 결합) 및 아크릴로일사르코신 메틸 에스터(기능 작용제)의 3개의 모노머로 만들어진 폴리디메틸-아크릴아미드 중합체에 기반을 둔다. 펩티드 대 레진 절단가능 연결 작용제로 사용되는 것은 산-불안정 4-하이드록시메틸-페녹시아세트산 유도체이다. 모든 아미노산 유도체는 역 N,N-디사이클로헥실-카보다이이미드/1-하이드록시벤조트리아졸에 의한 커플링 과정에 의해 추가되는 아스파라긴과 글루타민을 제외하여 미리 생성된 대칭의 무수물 유도체로서 추가된다. 모든 커플링과 탈보호 반응은 닐히드린, 트리니트로벤젠 술폰산 또는 이소틴 실험 과정에 의해 모니터링된다. 합성 완성 시에, 펩티드는 레진 기반에서 50% 스캐빈저 믹스를 포함한 95% 트리플루오로아세트산에 의한 측쇄 보호기 제거와 동시에 절단된다. 일반적으로 사용되는 스캐빈저에는 에탄디올, 페놀, 아니솔 및 물이 포함되며, 정확한 선택은 합성되는 펩티드를 구성하는 아미노산에 따라 달라진다. 또한 펩티드의 합성에서 고체상 및 용액상의 조합 방식도 가능하다(예를 들어 (Bruckdorfer et al., 2004) 및 여기에 인용된 참조 문헌 참고).

[0182] 트리플루오로아세트산은 진공하 증발에 의해 제거되며 그 이후 디에틸 에터에 의한 분쇄로 조 펩티드를 얻는다.

존재하는 일체의 스캐빈저는 수성상의 냉동건조로써 스캐빈저가 없는 조 펩티드를 생성하는 간단한 추출 과정에 의해 제거된다. 펩티드 합성 시약들은 일반적으로 예를 들어 Calbiochem-Novabiochem(Nottingham, 영국)으로부터 얻을 수 있다.

- [0183] 정제는 재결정화, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 예를 들어 아세토니트릴/물 구배 분리를 사용하는 (대개) 액상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 기법의 하나 또는 그 조합에 의해 수행할 수 있다.
- [0184] 펩티드의 분석은 박막 크로마토그래피, 전기 이동, 특히 모세관 전기 이동, 고체상 추출(CSPE), 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 산 가수분해 후 아미노산 분석 및 고속 원자 폭격 질량 분광분석, 및 MALDI와 ESI-QTOF 질량 분광분석 등에 의해 이루어진다.
- [0185] 과도 제시된 펩티드를 선택하기 위해, 중간값 샘플 제시는 물론 복제 변이를 보여주는 제시 프로필이 계산된다. 이 프로필은 관심 대상의 종양 객체 샘플을 정상 조직 샘플의 기준에 병치된다. 다음은 선형 혼합 효과 모형 (Pinheiro et al., 2015)의 P 값을 계산하되 위발견율(Benjamini and Hochberg, 1995)에 의해 다중 검증에 대해 조절함으로써 이러한 프로필을 하나씩 과다제시 점수로 강화시킬 수 있다(비교: 실시예 1, 도 1).
- [0186] 질량 분석에 의한 HLA 리간드의 식별 및 상대적 정량화를 위해, 충격 동결된 조직 샘플에서 얻어진 HLA를 정제화하고 HLA-연관 펩티드를 분리했다. 단리된 펩티드는 분리하여 그 서열을 온라인 나노-전기분무-이온화(nanoESI) 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS) 실험으로 식별했다. 얻어진 펩티드 서열을 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 샘플(N = 490 샘플)로부터 기록된 자연적 종양 관련 펩티드(TUMAP)의 단편화 패턴과 동일한 서열을 갖는 상응하는 합성 참조 펩티드의 단편화 패턴과 비교하여 확인했다. 이 펩티드들이 원발성 종양의 HLA 분자의 리간드로 직접 식별되었으므로, 이 결과는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 환자들로부터 얻어진 원발성 암 조직 상에서 식별된 펩티드의 자연적 처리 및 제시에 대한 직접적 증거를 제공하는 것이다.
- [0187] 발견 파이프라인 XPRESIDENT[®] v2.1(예를 들어 전체가 본원에 포함되는 US 2013-0096016을 참고)은 몇 가지 다른 비암성 조직 및 기관에 비해 암 조직에 대한 HLA-제한 펩티드 수준의 직접적인 상대적 정량화를 기준으로 관련 있는 과도-제시된 펩티드 백신 후보의 식별과 선택을 허용한다. 이는 서열 식별, 스펙트럼 집락화, 전화 이온 계수화, 정제 시간 정렬, 상태 디컨볼루션 및 정상화에 필요한 알고리즘을 조합시킨 독점 데이터 분석 파이프라인에 의해 처리하여 획득한 LC-MS 데이터를 사용한 label-free 차등 정량화의 개발에 의해 성취되었다.
- [0188] 공개 출처(Olexiouk et al., 2016; Subramanian et al., 2011)의 추가 서열 정보가 XPRESIDENT[®] 발견 파이프라인에 통합되어 비정규 출처의 TUMAP에 대한 식별이 가능하게 되었다. XPRESIDENT[®]에 의해 결정된 종양 특이적 스펙트럼 클러스터의 펩티드 서열을 식별하기 위해 직교성 데이터베이스 비의존 검색 전략에서 드누보(De-novo) 서열 분석법을 채택했다. 그리하여 인간 게놈이나 프로테오믹 데이터베이스에 대한 직접적 참조가 없는 신규 TUMAP를 식별할 수 있었다. 펩티드와 샘플 각각에 대한 오류 측정치 등 제시 수준이 확립되었다. 종양 조직에 배타적으로 제시된 펩티드 그리고 종양에서 과도-제시된 펩티드 대비 비암성 조직 및 기관이 식별된 바 있다.
- [0189] 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 조직의 샘플에서 얻은 HLA-펩티드 복합체를 정제하고 HLA 관련 펩티드를 분리한 다음 LC-MS로 분석했다(실시예 1 참조). 본 출원서에 포함된 모든 TUMAP를 이 접근방식을 이용하여 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 샘플에 대해 식별하여, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암에 대한 제시가 확

인되었다.

[0190] 복수의 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 그리고 정상 조직에서 식별된 TUMAP를 무표지 LC-MS 데이터의 이온 계수화를 사용하여 정량화했다. 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플에 존재하는 풍부함과 상관관계가 있음을 가정한다. 다양한 LC-MS 실험에서 펩티드의 모든 정량적 신호들을 LS-MS 실험을 중심 경향에 근거하여 정상화하고 샘플 당 평균화하여 제시프로필이라 부르는 막대 도표에 통합시켰다. 이 제시 프로파일은 단백질 데이터베이스 검색, 스펙트럼 균락화, 충전 상태 디컨벌루션(방전) 및 시간 성격 및 정제 정상화와 같은 다른 분석 방법들을 통합시킨다.

[0191] 또한, 발견 파이프라인 XPRESIDENT[®]로 암 또는 다른 감염된 조직 상의 MHC, 바람직하게는 HLA 제한 펩티드 수준에 대한 직접 절대 정량화가 가능하다. 간단히 말하면 총 세포수를 분석한 조직 샘플의 DNA 총량으로부터 계산했다. 조직 샘플에서 TUMAP의 펩티드 총량을 천연 TUMAP와 TUMAP의 동위원소로 표지화된 버전의 알려진 양, 소위 내부 표준물질의 비율로서 nanoLC-MS/MS로 측정하였다. TUMAP 단리의 효율은 TUMAP 단리 절차의 가능한 가장 이른 시점에서 모든 선택되는 TUMAP의 펩티드:MHC 복합체를 조직 용해물로 스파이킹하여 측정했으며 펩티드 단리 절차의 완료 이후 nanoLC-MS/MS로 검출하였다. 총 세포수와 총 펩티드의 수량은 조직 샘플당 3회 반복 측정치로부터 계산했다. 펩티드 특이적 단리 효율은 각 3회 반복 측정된 9회의 스파이킹 실험의 평균으로 계산했다(실시에 6 및 표 15 참조).

[0192] 펩티드의 과다제시 외에도, 기저 유전자의 mRNA 발현을 시험했다. 정상 조직 및 암 조직의 RNASeq 분석을 통해 mRNA 데이터를 획득했다(실시에 2, 도 2 참조). 정상 조직 데이터의 추가 출처는 약 3000개 정상 조직 샘플로부터 공개적으로 이용가능한 RNA 발현 데이터의 데이터베이스였다(Lonsdale, 2013). 코딩 mRNA가 암 조직에서 고도로 발현되지만 필수 정상 조직에서는 매우 낮거나 부재하는 단백질들로부터 유래된 펩티드는 본 발명에 바람직하게 포함되었다.

[0193] 본 발명은 본 발명의 펩티드를 과다 또는 배타적으로 제시하는 암/종양, 바람직하게는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 치료에 유용한 펩티드를 제공한다. 이 펩티드들은 질량분석법에서 원발성 인간 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 샘플에서 HLA 분자에 의해 자연적으로 제시되는 것으로 나타났다.

[0194] 펩티드가 유래한 근원 유전자/단백질("전장 단백질"이나 "기저 단백질"로도 지정됨)의 다수는 정상 조직에 비해 고도로 과발현되는 것으로 나타났다 - 본 발명과 관련하여 "정상 조직"이란 건강한 혈액, 뇌, 심장, 간, 폐, 지방조직, 부신, 담관, 방광, 골수, 식도, 눈, 담낭, 두경부, 대장, 소장, 신장, 림프절, 중추 신경, 말초 신경, 췌장, 부갑상선, 복막, 뇌하수체, 흉막, 골격근, 피부, 척수, 비장, 위, 갑상선, 기관 및 요관 세포 또는 기타 정상 조직 세포를 의미하며 근원 유전자와 높은 정도의 종양 연관을 보여준다(실시에 2 참조). 더욱이 펩티드 자체가 종양 조직에서 강력히 과다제시된다 - 본 발명과 관련하여 "종양 조직"은 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암을 앓고 있는 환자의 샘플을 의미하며, 정상 조직에서는 과다제시되지 않는다(실시에 1 참조).

[0195] HLA 결합된 펩티드는 면역계 특히 T 림프구에 의해서 인식될 수 있다. T 세포는 인식된 HLA/펩티드 복합체를 제시하는 세포를 파괴할 수 있으며, 예를 들어 유래된 펩티드를 제시하는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 세포이다.

[0196] 본 발명의 펩티드는 T 세포 반응을 자극할 수 있고/거나 과다제시되는 것으로 나타났으므로, 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR 특히 sTCR의 생산에 사용될 수 있다(실시에 3 참조). 더욱이 해당되는 MHC와 복합된 펩티드는 본 발명에 따른 항체 및/또는 TCR 특히 sTCR의 생산에도 사용될 수 있다. 해당 방법들은 당업자에게 잘 알려져

있으며 해당 문헌에서도 찾을 수 있다(다음 참고). 그러므로, 본 발명의 펩티드는 환자의 종양 세포를 파괴할 수 있는 면역 반응을 생성하는 데 유용하다. 환자의 면역 반응은 설명된 펩티드의 직접적인 투여 또는 면역성을 강화할 수 있는 제제(즉, 보조제)와 섞인 적당한 전조 물질(예를 들어, 연장된 펩티드, 단백질, 또는 이러한 펩티드를 인코딩하는 핵산)을 환자에게 투여하는 것으로 유도될 수 있다. 이런 치료적 백신에서 생긴 면역 반응은 본 발명의 목적 펩티드가 비교가능한 카피 수로 정상 조직에서는 나타나지 않고, 환자의 정상 세포에 대한 기피되는 자기 면역 반응의 위험을 배제하기 때문에 종양 세포에 아주 특정할 수 있다.

- [0197] 본 발명은 알파 쇠 및 베타 쇠("알파/베타 TCR")를 포함하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 또한 MHC 분자에 의해 제시되는 경우 TCR 및 항체에 결합할 수 있는 펩티드가 제공된다.
- [0198] 본 발명은 또한 HLA 분자에 의해 제시될 때 본 발명에 따른 펩티드 항원에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 TCR의 단편들에 관한 것이다. 이 용어는 특히 예를 들어 막횡단 부분 및/또는 불변 부위가 누락된 TCR과 같은 가용성 TCR 단편, 단쇄 TCR 및 예를 들어 Ig와 같은 이에 대한 용합에 관한 것이다.
- [0199] 본 발명은 또한 본 발명의 TCR 및 펩티드를 발현하는 핵산, 벡터 및 숙주 세포; 그리고 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0200] 용어 "T 세포 수용체"(약자로 TCR)는 알파 폴리펩티드 쇠(알파 쇠) 및 베타 폴리펩티드 쇠(베타 쇠)를 포함하는 이질이합체 분자를 지칭하며, 여기서 이질이합체 수용체는 HLA 분자에 의해 제시된 펩티드 항원에 결합하는 능력이 있다. 이 용어는 소위 감마/델타 TCR 또한 포함한다.
- [0201] 한 구현에서, 본 발명은 여기서 기술된 대로 TCR의 생산 방법을 제공하며, 이 방법은 TCR의 발현 촉진에 적합한 조건 하에서 TCR을 발현시킬 수 있는 숙주 세포의 배양을 포함한다.
- [0202] 본 발명은 다른 양태에서 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 그 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩되거나 항원/클래스 I 또는 II MHC 복합체 단량체의 사량체화에 의해 그 항원이 클래스 I 또는 II MHC 사합체 위에 로딩된다.
- [0203] 알파/베타 TCR의 알파 및 베타 쇠 그리고 감마/델타 TCR의 감마 및 델타 쇠는 일반적으로 각각 2개의 "도메인" 즉, 가변 및 불변 도메인을 갖는 것으로 간주된다. 가변 도메인은 가변 영역(V) 및 결합 영역(J)의 연쇄로 구성된다. 가변 도메인은 리더 영역(L) 또한 포함할 수 있다. 베타 및 델타 쇠 또한 다양성 영역(D)을 포함할 수 있다. 알파 및 베타 불변 도메인은 또한 알파 및 베타 쇠를 세포막에 고정시키는 C-말단 막횡단(TM) 도메인을 포함할 수 있다.
- [0204] 감마/델타 TCR에 대하여, 본원에 사용된 용어 "TCR 감마 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 감마 V(TRGV) 영역과 TCR 감마 J(TRGJ) 영역의 연계를 지칭하며, 또한 용어 TCR 감마 불변 도메인은 세포의 TRGC 영역이나 C-말단 절단된 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 용어 "TCR 델타 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 델타 V(TRDV) 영역과 TCR 델타 D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연계를 지칭하며, 용어 "TCR 델타 불변 도메인"은 세포의 TRDC 영역이나 C-말단 절단된 TRDC 서열을 지칭한다.
- [0205] 본 발명의 TCR은 바람직하게는 결합 친화도(KD)가 약 100 μM 이하, 약 50 μM 이하, 약 25 μM 이하 또는 약 10 μM 이하인 펩티드-HLA 분자 복합체에 결합한다. 더욱 바람직하게는, 결합 친화도가 약 1 μM 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하를 갖는 고친화도 TCR이다. 본 발명의 TCR은 바람직한 결합 친화도 범위에 대한 제한되지 않는 예에는 약 1 nM 내지 약 10 nM, 약 10 nM 내지 약 20 nM, 약 20 nM 내지 약 30 nM, 약 30 nM 내지 약 40 nM, 약 40 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 60 nM, 약 60 nM 내지 약 70 nM, 약 70 nM 내지 약 80 nM, 약 80 nM 내지 약 90 nM 및 약 90 nM 내지 약 100 nM가 포함된다.
- [0206] 본 발명의 TCR와 관련하여 본원에 사용된, "특이적 결합" 및 그 문법적 변형어는 100 μM 이하의 펩티드-HLA 분자 복합체에 대한 결합 친화도(KD)를 갖는 TCR을 의미하는 것으로 사용된다.
- [0207] 본 발명의 알파/베타 이질이합체 TCR은 그 불변 도메인 사이에 도입된 이황화 결합을 가질 수 있다. 이러한 유형의 바람직한 TCR에는 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 갖는 것들이 포함되는데, TRAC의 Thr 48 및 TRBC1이나 TRBC2의 Ser 57이 시스테인 잔기로 교체는 경우는 예외로, 상기 시스테인은 TCR의 TRAC 불변 도메인 서열과 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 사이에 이황화 결합을 형성한다.
- [0208] 위에서 언급한 도입된 쇠간 결합의 유무에 관계 없이, 본 발명의 알파/베타 이질이합체 TCR은 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 가질 수 있으며, TCR의 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나

TRBC2 불변 도메인 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1이나 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이에 있는 자연 이황화 결합에 의해 연계될 수 있다.

- [0209] 본 발명의 TCR은 방사성핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성되는 군으로부터 선택되는 검출가능한 라벨을 포함할 수 있다. 본 발명의 TCR은 방사성핵종, 화학요법제, 독소와 같은 활성 치료제에 접합될 수 있다.
- [0210] 한 구현에서, 알파 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 갖고/거나 베타 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 갖는 본 발명의 TCR은 돌연변이되지 않은 TCR에 비해 변형된 당화를 갖는다.
- [0211] 한 구현에서, TCR 알파 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 갖고/거나 TCR 베타 쇠에 적어도 1개의 돌연변이를 갖는 TCR은 펩티드-HLA 분자 복합체에 대해 결합 친화도 및/또는 결합 민감기를 가지며, 이는 비돌연변이 TCR 알파 쇠 및/또는 비돌연변이 TCR 베타 쇠를 포함하는 TCR의 그것에 대해 적어도 2배이다. 종양 특이적 TCR의 친화도 강화 및 그 이용은 최적의 TCR 친화도에 대한 범위의 존재에 의존한다. 그러한 창의 존재는, 예를 들어 HLA-A2 제한 병원체에 특이적인 TCR의 KD 값이 HLA-A2 제한 종양 관련 자가 항원에 특이적인 TCR에 대해 일반적으로 약 10배 낮다는 관찰에 근거한다. 현재 종양은 개인 자체의 세포로부터 발생하기 때문에 종양 항원이 면역성일 수 있음에도 불구하고, 돌연변이된 단백질이나 변형된 번역 처리를 가진 단백질만이 면역계에 의해 이물질로 보이게 된다. 상향조절되거나 과발현되는 항원(소위 자가 항원)이 반드시 종양에 대한 기능적 면역 반응을 유도하지는 않을 것이다: 이러한 항원에 고도로 반응성인 TCR을 발현하는 T 세포는 중추 관용으로 알려진 과정에서 흉선 내부로부터 음적으로 선택되었을 것이며, 자가 항원에 대해 낮은 친화도 TCR을 갖는 T 세포만 남는다는 것을 의미한다. 그러므로 본 발명의 TCR이나 변이체에 대한 친화도는 다음에 설명된 바와 같이 당업계에서 잘 알려진 방법들로 강화되어 왔다.
- [0212] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 단리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/펩티드 단량체와 함께 배양, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 단리를 포함한다.
- [0213] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCR의 식별 및 단리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR $\alpha\beta$ 유전자 좌(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자 이식 마우스의 획득, 펩티드에 의한 마우스의 면역접종, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양, 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 단리를 포함한다.
- [0214] 한 양태에서, 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 본 발명의 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇠를 인코딩하는 핵산을 감마 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 시험했다. 다음에는 최종 생성물의 분취물을 사용하여 표적 T 세포 모집단(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제된)을 형질도입하며, 모집단은 환자에 주입하기 전에 팽창시킨다.
- [0215] 또 다른 양태에서, 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 당업계에서 알려진 기법(예컨대, 시험관내 전사 시스템)으로 TCR RNA를 합성한다. 다음에는 시험관 내에서 합성된 TCR RNA를 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇠의 재발현을 위하여, 전기천공에 의해 건강한 공여자로부터 얻은 일차 CD8+ T 세포 내로 도입시킨다.
- [0216] 이러한 발현을 증가시키려면, 본 발명의 TCR을 인코딩하는 핵산을 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포 바이러스(CMV), 쥐 줄기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세레이트 키나제(PGK), β -액틴, 유비퀴틴 및 원숭이 바이러스 40(SV40)/CD43 복합 프로모터, 연장 인자(EF)-1a, 비장 포커스-형성 바이러스(SFFV) 프로모터와 같은 강력한 프로모터에 작동하도록 연계시킬 수 있다. 바람직한 한 구현에서, 이 프로모터는 발현되고 있는 핵산에 대해 이종이다.
- [0217] 강력한 프로모터 외에도, 본 발명의 TCR 발현 카세트가 도입 유전자 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소를 포함할 수 있으며, 여기에는 렌티바이러스 구성(Follenzi et al., 2000)의 핵 전위를 촉진시키는 중추 폴리퓨린 관(cPPT), 그리고 RNA 안정성의 증가로 도입 유전자 발현을 증가시키는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절요소(wPRE)(Zufferey et al., 1999)가 포함된다.
- [0218] 본 발명의 TCR의 알파 및 베타 쇠는 별개의 벡터에 위치한 핵산에 의해 인코딩될 수 있거나 동일한 벡터에 위치한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다.

- [0219] 높은 수준의 TCR 표면 발현을 성취하려면 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠가 높은 수준으로 전사되는 것이 요구된다. 이를 위해서, 본 발명의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠를 단일 벡터에서 바이시스트로닉(bicistronic) 구성으로 클로닝할 수 있으며, 이는 이러한 장애를 극복할 수 있는 것으로 나타났다. TCR-알파 및 TCR-베타 쇠 사이의 바이러스성 내재 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용은 두 쇠의 조율된 발현을 초래하며, 이는 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠가 번역 도중 단일 전사체로부터 생성되어 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠의 동등한 몰비의 생산을 보장하기 때문이다(Schmitt et al., 2009).
- [0220] 본 발명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 코돈 최적화에 의해 숙주 세균의 발현을 증가시킬 수 있다. 유전자 코드의 반복성은 하나를 초과하는 코돈에 의해 일부의 아미노산 인코딩을 허용하지만, 일부 코돈은 다른 코돈에 비해 "최적" 미만이며 이것은 일치하는 tRNA 그리고 다른 요인들의 상대적 가용성 때문이다(Gustafsson et al., 2004). 각 아미노산이 포유류 유전자 발현을 위한 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 서열의 변경 그리고 mRNA 불안정성이나 잠재 스플라이스 부위의 제거는 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(Scholten et al., 2006).
- [0221] 더욱이, 도입된 TCR 및 내생 TCR 사이의 틀린 짝짓기는 자가면역성에 대해 유의한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래할 수 있다. 예를 들어, 혼합된 TCR 이합체의 형성은 적절하게 짝지어진 TCR 복합체의 형성에 이용할 수 있는 CD3 분자의 숫자를 감소시킬 수 있으므로, 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소시킬 수 있다(Kuball et al., 2007).
- [0222] 틀린 짝짓기를 감소하기 위해 도입된 쇠의 내생 TCR과의 짝짓기 능력은 감소시키면서 쇠간 친화도를 촉진시키기 위해 본 발명의 도입된 TCR 쇠의 C-말단 도메인을 변형시킬 수 있다. 이러한 전략에는 인간 TCR-알파 및 TCR-베타 C-말단 도메인을 이의 쥐 상대물(쥐 C-말단 도메인)로 교체, 두 번째 시스틴 잔기를 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠로 도입하여(시스틴 변형) C-말단 도메인의 두 번째 쇠간 이황화 결합의 생성, TCR-쇠 및 TCR-베타 쇠의 C-말단 도메인("놉-인-홀(knob-in-hole)")에서 상호작용하는 잔기의 교환, 그리고 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠의 가변 도메인을 CD3 ζ 에 직접 융합(CD3 ζ 융합) 등이 포함될 수 있다(Schmitt et al., 2009).
- [0223] 한 구현에서, 숙주 세포는 본 발명의 TCR을 발현하도록 공학제조된다. 바람직한 한 구현에서, 숙주 세포는 인간 T 세포나 T 세포 전구세포이다. 일부 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 암 환자로부터 얻는다. 다른 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 건강한 공여자로부터 얻는다. 본 발명의 숙주 세포는 치료할 환자에 대해 동종 또는 자가 세포이다. 한 구현에서, 숙주는 알파/베타 TCR을 발현하도록 형질전환된 감마/델타 T 세포이다.
- [0224] "약학 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에서 투여하기에 적합한 조성물이다. 바람직하게, 약학 조성물은 무균 상태이며 GMP 지침에 따라 생산된다.
- [0225] 약학 조성물은 유리 형태 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 된 펩티드를 포함한다(위의 내용 참조). 본원에 사용된 것처럼, "약학적으로 허용가능한 염"은 펩티드가 산 또는 염기의 염기 염을 만들며 변형되는 공개된 펩티드의 유도체를 말한다. 예를 들어, 산성 염은 적당한 산과의 반응을 가진 자유 염기(일반적으로 중성 NH₂기가 있는 약물의 중성 형태)로부터 제조된다. 산 염을 준비할 때 적당한 산은 예를 들어, 염산, 브롬화 수소산, 황산, 질산, 인산과 같은 같은 무기산뿐만 아니라 초산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 수산, 말산, 말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 맨델릭산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산같은 유기산을 포함한다. 반대로, 펩티드에서 나타날 수 있는 산성 모이어티의 염기 염의 제조는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 트리메틸아민과 같은 약학적으로 허용가능한 염기를 사용한다.
- [0226] 특별히 바람직한 약학 조성물의 구현은 초산(아세트산염), 삼불화 초산 또는 염산(염화물)의 염으로의 펩티드를 가진다.
- [0227] 바람직하게는, 본 발명의 약제는 백신과 같은 면역치료제이다. 이는 환자의 영향을 받은 기관에 직접적으로 투여될 수 있거나 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로서 전신에 투여되거나 환자에게서 또는 나중에 환자에게 투여될 인간 세포주에 생체 외로 적용될 수도 있거나 나중에 환자에게 다시 투여될 환자로 부터 유래하는 면역 세포의 부분 집단에 시험관 내로 사용될 수도 있다. 만약 핵산이 시험관 내에서 세포에 투여 되면, 인터루킨-2와 같은 면역 유도 사이토킨과 함께 발현되는 것이 유용할 수도 있다. 펩티드는 상당히 순도가 높을 수도 있고, 또는 면역-유도 보조제(아래 참조)와 합성되어 있거나 면역-유도 사이토킨과 함께 합성체로 사용되거나, 리포솜과 같은 적당한 전달 체계와 함께 투여될 수도 있다. 펩티드는 또한 keyhole limpet haemocyanin(KLH) 또는

mannan(WO 95/18145 및 (Longenecker et al(1993) 참조)과 같은 적당한 담체와 함께 복합될 수도 있다. 펩티드는 또한 꼬리표를 달거나, 융합 단백질이거나 혼성 분자일 수도 있다. 본 발명에 서열이 주어진 이 펩티드들은 CD4 또는 CD8 T 세포를 자극할 것으로 기대한다. 하지만 CD8 T 세포의 자극은 CD4 T 조력 세포에 의해 제공되는 조력의 존재에 더 효율적이다. 그러므로 CD8 CTL을 자극하는 MHC 클래스 I 에피토프의 경우, 융합 짝 또는 하이브리드 분자의 선택은 CD4-양성 T 세포를 자극한다. CD4-와 CD8-자극유도 에피토프는 이 분야에서 잘 알려졌고 본 발명에서 식별된 것들을 포함한다.

- [0228] 한 양태에서, 이 백신은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101을 명시하는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 펩티드 그리고 하나 이상의 추가적인 펩티드 바람직하게는 2개 내지 50개이고, 더 바람직하게는 2개 내지 25개이며, 보다 더 바람직하게는 2개 내지 20개이고 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 펩티드를 포함한다. 펩티드(들)는 하나 이상의 특정한 TAA에서 유도되었고 이는 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합할 수 있다.
- [0229] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 펩티드 또는 펩티드 변이체를 인코딩하는 핵산(예를 들어 폴리뉴클레오티드)에 대한 정보를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이의 조합일 수 있으며, 한 가닥 및/또는 이중 쇄로 되어 있을 수 있고, 또는 본래의 형일 수도 또는 예를 들어 포스포로티오에이트 백본을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드의 안정화된 형태로 되어 있을 수도 있으며, 펩티드를 코딩하는 한 인트론을 포함할 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 자연적으로 발생하는 펩티드 결합에 의해 결합이 된 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터에 대한 설명을 제공한다.
- [0230] 특히 DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를 예를 들어 보완 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들어, 보완 동종중합체 트랙트가 벡터 DNA에 삽입될 DNA 분절에 추가될 수 있다. 벡터와 DNA 분절은 이후 보완 동종중합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 재조합 DNA 분자를 형성할 수 있다.
- [0231] 하나 이상의 제한 부위를 포함하는 합성된 링커는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 링커는 상업적으로 International Biotechnologies Inc.(New Haven, CN, USA)를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.
- [0232] 본 발명에서 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 변환하는 바람직한 방법은Saiki RK 등(Saiki et al., 1988)에 의해 발표된 바 있는 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용한다. 이 방법은 예를 들어 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터로의 DNA 도입 또는 이 분야에서 알려져 있는 DNA를 다른 용도를 위해 변환하는 데에 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0233] DNA(또는 레트로 바이러스 벡터일 시, RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되며 이는 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 가지고 있는 폴리펩티드를 생성한다. 따라서, 본 발명의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 알려진 기술과 여기에서 배울 수 있는 것과 함께 적당히 사용되어 적당한 숙주 세포를 본 발명의 폴리펩티드를 발현하고 생성하는 것으로 형질전환을 시키는 데에 사용된다. 이러한 기법은 예를 들어 다음에 공개되어 있다: 미국 특허 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 및 4,810,648.
- [0234] 본 발명의 합성물을 만드는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적당한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법, 및 에피소말 유지 또는 통합이 필요한 지에 따라 결정될 것이다.
- [0235] 일반적으로, DNA는 플라스미드와 같은 발현 벡터로 발현을 위한 적합한 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이 제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)과 함께 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 발현 벡터에 필요한 형질전환된 세포에서 선택이 가능한 예를 들어, 항생제 저항력과 같은, 제어 요소를 통합시키는 것이다.
- [0236] 다른 방법으로는, 이러한 선택이 가능한 특성이 다른 벡터에 있을 수도 있으며, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시 형질전환하는 데에 사용된다.
- [0237] 발명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 충분한 시간 동안 적당한 상태에서 당업자에 의해서 배양되

고 이는 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복된다.

- [0238] 박테리아(예컨대, 대장균(*Escherichia coli*)과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들어 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들어 아스페르길스 스피시즈(*Aspergillus spec.*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC Cell Biology Collection에서 구할 수 있는 CHO 세포와 같은 포유류 세포일 수 있다.
- [0239] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항 표지자를 포함한다. 하나의 예는, Pharmacia(미국 뉴저지주 Piscataway)에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 또한 Pharmacia에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(미국 캘리포니아주 La Jolla 92037)에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(YIps)이며 이는 효소 선택 표지자 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416은 효모 동원체 플라스미드(Ycps)이다. (예를 들어 Sigma-Aldrich로부터 입수한), CMV 프로모터 기반 벡터는 일시적인 또는 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 조합으로 N-말단 또는 C-말단 표지 등을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 검출, 정제와 분석을 가능하게 한다. 듀얼-태깅된 융합은 검출의 유연성을 제공한다.
- [0240] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 구성적인 단백질 발현 수준을 높게는 COS 세포에서 1mg/L까지 구동시킨다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1mg/L 정도이다. SV40 복제 원점이 있음으로서 SV40, 복제를 가능하게 하는 COS 세포 DNA 복제의 수준이 높은 결과를 낳는다. CMV 벡터는 예를 들어 세균 세포에서의 복제를 위한 pMB1(pBR322의 유도체) 기원, 즉, 세균, hGH polyA 및 f1 원천에서 압피실린 내성 선택에 필요한 b-락타마아제를 포함할 수 있다. 프리-프로-트립신 리더(PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG 항체, 수지 및 플레이트를 사용하여 정제하기 위한 배양 배지로 분비하도록 방향을 정할 수가 있다. 다른 벡터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.
- [0241] 다른 구현에서는 본 발명의 2개 이상 펩티드나 펩티드 변이체가 인코딩됨으로써 연속적인 순서로 발현된다("줄로 엮은 유리알" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드나 펩티드 변이체는 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 피침에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있으며, 또한 그 사이에 추가의 펩티드 없이 연결될 수 있다. 이러한 구조들은 암 요법에서도 사용할 수 있으며 MHC I 및 MHC II 모두가 연관되는 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0242] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포이거나 진핵 세포일 수 있다. 세균 세포가 일부의 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있으며, 보통 예를 들어 Bethesda Research Laboratories Inc.(미국 메릴랜드주 Bethesda)에서 구할 수 있는 대장균 균주 DH5, 그리고 American Type Culture Collection(ATCC)(미국 메릴랜드주 Rockville, No ATCC 31343)의 RR1과 같은 대장균 균주이다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효모, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추 동물 세포가 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501을 포함하며, 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(미국 캘리포니아주 La Jolla, 92037)에서 구입이 가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입이 가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소 세포, CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장 유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배칼로바이러스 발현 벡터에 의해 세포로 감염될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들어 Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9 및 당해 분야의 숙련자에게 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.
- [0243] 적당한 세포 숙주를 본 발명의 DNA 구성으로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 벡터의 유형에 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 완성된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는 예를 들어 Cohen 등(Cohen et al., 1972) 및 (Green and Sambrook, 2012)을 참조한다. 효모 세포의 형질 전환은 Sherman 등(Sherman et al., 1986)에 나와 있다. Beggs의 방법 또한 유용하다(Beggs, 1978). 척추 동물 세포에 대해서는, 이러한 세포의 형질주입에 유용한 시약, 예를 들어 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포좀 공식에 대한 내용은 Stratagene Cloning Systems, 또는 Life Technologies Inc.(미국 메릴랜드주 Gaithersburg 20877)에 나와 있다. 전기 천공법 역시 형질전환 또는/및 세포를 감염시키는 데에 유용하며 이는 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충세포 및 척추동물 세

포 형질전환에 잘 알려져 있다.

- [0244] 성공적으로 형질전환이 된 세포는, 즉 본 발명의 DNA 구성을 가지고 있는 세포는, 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별된다. 다른 방법으로는, 상청액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 검출될 수 있다.
- [0245] 본 발명의 특정한 숙주 세포, 예를 들어 박테리아, 효소 및 곤충 세포와 같은 세포는 본 발명의 펩티드의 준비에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들어, 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포는 적당한 MHC 분자에 적체가 되도록 하는 본 발명의 펩티드를 발현하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 핵산 또는 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0246] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 전립선산 인산효소(PAP)를 포함하는 재조합 융합 단백질로써 적재된 APC가 무증상이나 최소 증상의 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료를 위해 2010년 4월 29일 미국 식품의약청(FDA)에 의해 승인되었다(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).
- [0247] 본 발명의 다른 양태는 펩티드 또는 그의 변이체의 숙주 세포를 배양하고 펩티드를 숙주 세포 또는 배지에서 분리하는 것을 포함한 생산 방법을 제공한다.
- [0248] 다른 구현에서는, 본 발명의 펩티드, 핵산 또는 발현 벡터가 의학에서 사용된다. 예를 들어, 펩티드나 그 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사용으로 제조될 수 있다. 펩티드 투여의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m., 및 i.v. 투여를 포함한다. DNA 투여의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 투여를 포함한다. 펩티드 또는 DNA의 50 µg 및 1.5 mg, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg 사이의 용량이 각각의 펩티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상시험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter et al., 2012).
- [0249] 면역 접종에 사용된 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높거나 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법은 이 업계에 잘 알려져 있다. 개요는 예를 들어, Teufel 등에 제공되어 있다(Teufel et al., 2005). 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 한 개 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 있으며 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자 총"과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 펩티드 또는 핵산에 의해 인코딩된 펩티드는 융합 단백질일 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 유도하는 에피톱을 들 수 있다.
- [0250] 이 발명의 약제는 하나 이상의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질이다(예컨대, 항원에 대한 CD8-양성 T 세포 및 조력 T(TH) 세포에 의해서 증대된 면역 반응). 따라서 본 발명에서 보조제는 유용한 약제 구성이라고 간주할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스[®], AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린 또는 플라젤린에서 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(ALDARA[®]), 레스퀴미드, ImuFact IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론 알파 또는 베타, 또는 이들의 폐쇄화된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, 주브이툼(JuvImmune), LipoVac, MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유중수형과 수중유형 에멀전, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, PepTel[®] 벡터 시스템, PLG와 텍스트란 극미립자, 탈락토펜, SRL172, 비로솜(Virosomes) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유도된 아릴라스 QS21 스틸물론, 마이코박테리아 추출물과 합성 세균의 세포 벽 모방제, 및 다른 리비의 데톡스(Ribi's Detox), 쿼일(Quil), 또는 슈퍼포스(Superfos)와 같은 독점 보조제 등이 있다. Freund's 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 여러 면역적 보조제(예컨대, MF59)는 수지상 세포에 특이적이고, 그 제조 방법은 이전에 설명된 바 있다(Allison and Krummel, 1995). 또한, 사이토킨도 사용될 수 있다. 여러 사이토킨은 수지상 세포의 림프 조직으로의 이동에 영향을 주는데 직접적으로 연관된 바 있으며(예컨대, TNF-), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T 림프구에 대한 항원 제시 세포로의 성장을 가속시키고(예컨대, GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(미국 특허 5,849,589, 구체적으로 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함됨) 면역보조제의

역학을 한다(예컨대, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-알파, IFN-베타)(Gabrilovich et al., 1996).

- [0251] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 환경에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9를 통해 천성(비-적응) 면역 체계를 활성화시킨다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아 있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원 특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게 이는 수지상 세포의 성숙 및 차별화를 향상시키고 이는 TH1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T-림프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 일어난 TH1 바이러스는 보통 TH2 바이러스를 촉진시키는 alum 또는 비완성된 프로인트 보조제(Freund's adjuvant(IFA))와 같은 백신 보조제가 존재할 때도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어 내기 위해 필요한 미세입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제약으로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 여러 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 백신 전체 용량이 일으키는 항체 반응 수준으로 항원의 용량을 약 두 배 정도 줄일 수 있도록 한다(Krieg, 2006). 미국 특허 6,406,705 B1은 CpG 올리고뉴클레오티드, 비핵산 보조제 및 항원 특정 면역 반응을 일으키는 항원의 병용에 대해 설명한다. CpG TLR9 길항제는 Mologen(Berlin, Germany)에 의해 만들어진 dSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)이며 이는 본 발명의 제약 조성의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용이 가능하다.
- [0252] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 화학적으로 변형된 CpGs(예컨대, CpR, Idera), Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 AmpliGen, Hiltonol[®], poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 면역활성적인 작은 분자, 사이클로포스아미드, 수니티닙, 베바시주맵[®], 셀레브렉스, NCX-4016, 실테나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, 테모졸로마이드, 템시플리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩, ZD2171, AZD2171, 안티-CTLA4, 면역계의 주요 구조를 표적으로 하는 기타 항체(예컨대, 안티-CD40, 안티-TGFbeta, 안티-TNFalpha 수용체) 및 SC58175와 같은 항원을 들 수 있으며 이는 치료적으로 또는 보조제의 역할을 할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는 특별히 다른 실험할 필요 없이 기술이 뛰어난 개인에 의해서 쉽게 결정될 수 있다.
- [0253] 바람직한 보조제들은 항-CD40, 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파마이드, 수리티닙, 베바시주맵, 인터페론-알파, CpG, 올리고뉴클레오티드 및 유도체, poly-(I:C) 및 유도체, RNA, 실테나필, 그리고 PLG 또는 비로숨 미립자 제제이다.
- [0254] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그레놀로사이트 마크로파지 콜로니-자극 인자(GM-CSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드, 레시퀴모드 및 인테페론-알파 같은 콜로니-자극 인자로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0255] 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 그레놀로사이트 마크로파지 콜로니-자극 인자(GM-CSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 및 레시퀴모드와 같은 콜로니-자극 인자로 구성되는 군으로부터 선택된다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 훨씬 더 바람직한 보조제는 Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC(Hiltonol[®]) 및 anti-CD40 mAB 또는 이들의 조합들이다.
- [0256] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내와 같은 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해, 펩티드 그리고 선택적으로 다른 분자들을 약학적으로 허용되는, 바람직하게는 수용성 담체에 용해 또는 현탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충액, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 포함할 수 있다. 또한 펩티드는 사이토킨 같은 면역 자극 물질과 함께 투여될 수 있다. 이러한 성분에 사용될 수 있는 방대한 부형제 목록은 예를 들어 A. Kibbe, 약학적 부형제 핸드북(Kibbe, 2000)에서 확인할 수 있다. 이러한 조성물은 선종성 또는 암성 질병의 방지, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제제는 예를 들어 EP2112253에서 찾아볼 수 있다.
- [0257] 본 발명에 따른 백신에 의해 일어나는 면역 반응이 다른 세포 단계 및 다른 개발 단계에서는 암을 공격한다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 더욱이, 암과 연관된 다른 신호전달 경로가 공격을 받는다. 이것은 단 하나 또는 여러 표적만을 다루는 백신에 비해 이점이며, 이로 인해 종양이 공격에 쉽게 적응(종양 탈출)하도록 유발할 수 있다. 더욱이, 모든 개별 종양들이 같은 패턴의 항원을 발현하는 것은 아니다. 그러므로 종양 연관된 여러 펩티드들의 조합은 모든 개별 종양이 적어도 표적의 일부를 갖도록 보장한다. 이 조성물은 각 종양이 여러 항원을

발현하도록 예상되며 또한 종양 성장 및 유지에 필요한 여러 독립적 경로를 다루도록 설계되었다. 그리하여 백신은 보다 큰 환자 모집단을 위해 "기성품으로" 쉽게 사용이 가능하다. 이는 백신으로 치료할 환자의 사전 선택을 HLA 형질정도로 제한할 수 있고, 항원 발현을 위해 어떠한 추가의 바이오마커 평가를 요구하지 않음을 의미하지만, 효능에 중요한 여러 표적들이 유도된 면역 반응에 의해 동시에 공격됨을 여전히 보장한다 (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

- [0258] 본원에 사용된 "골격"이란 용어는 (예컨대, 항원성) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 말한다. 한 구현에서, 골격은 그것이 부착되는 객체를 (예컨대, (두 번째) 항원 결합 모이어티) 표적 부위, 예를 들어 특정 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 기질(예컨대, 현재 용도에 따른 MHC와 펩티드의 복합체)로 향하도록 지시할 수 있다. 또 다른 구현에서 골격은 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 골격은 항체 및 그 단편, 항체 중쇄 변수 영역 및 항체 경쇄 변수 영역을 포함하는 항체의 도메인에 결합하는 항원, 하나 이상의 안키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 압타머, (가용성) TCR 그리고 동종 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 어떤 분자가 표적에 결합하는 골격인지 평가하기 위해, 결합 분석을 수행할 수 있다.
- [0259] "특이적" 결합이란 그 골격이 다른 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 복합체보다 관심 대상의 펩티드-MHC 복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특정 표적이 포함된 세포를 줄일 수 있는 활성 분자로 무장한 골격이 특정 표적이 없는 다른 세포는 죽일 수 없으며 다른 펩티드-MHC 복합체를 제시하는 것을 의미한다. 교차 반응성 펩티드-MHC의 펩티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉, 인간 HLA-펩티도로부터 유래되지 않는다면, 다른 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 살해를 평가하는 검사는 당업계에 잘 알려져 있다. 이 검사는 변경되지 않는 펩티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 펩티드가 포함된 세포를 사용하여 수행해야 한다.
- [0260] 각 골격은 라벨이 제공하는 신호의 존재나 부재를 판단함으로써 결합된 골격이 검출가능하도록 제공하는 라벨링을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 골격은 형광 염료나 임의의 다른 해당되는 세포 표지자 분자를 사용하여 라벨링이 가능하다. 그러한 표지자 분자는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 라벨링은(예를 들어 형광 염료에 의해 제공되는) 형광이나 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 압타머의 가시화를 제공할 수 있다.
- [0261] 각 골격은 IL-21, 항-CD3, 항-CD28과 같은 두 번째 활성 분자와 접합될 수 있다.
- [0262] 폴리펩티드 골격에 대한 추가 정보는 예를 들어 WO 2014/071978A1의 배경 부분과 거기에 인용된 참조문헌을 참고한다.
- [0263] 본 발명은 또한 압타머에 관한 것이다. 압타머란(예는 WO 2014/191359 및 여기에 인용된 문헌을 참조) 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있으며 특정 표적 구조를 인식할 수 있는 짧은 단일 핵산 분자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 압타머는 높은 친화도 및 특이성으로 다양한 복합체 표적에 선택적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.
- [0264] 세포 표면에 위치한 분자를 인식하는 압타머들이 지난 십 년 동안 식별되었으며 진단 및 치료 접근 방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 압타머가 독성 및 면역원성을 거의 보유하지 않는 것으로 나타났으므로, 생의학적 용도를 위한 유력한 후보이다. 실제로 압타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인식하는 압타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며 또한 생체내 모델에서의 이중인식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이, 특이적 종양 세포주를 인식하는 압타머가 식별된 바 있다.
- [0265] DNA 압타머는 다양한 암 세포 그리고 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인식 성질을 밝히기 위해 선택가능한 반면에, 비종양형성의 그리고 원발성의 건강한 세포는 인식되지 않는다. 식별된 압타머가 특이적 종양 아형을 인식할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 압타머는 소위 광범위 진단 및 치료에 적용될 수 있다.
- [0266] 더욱이, 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 압타머는 나노몰 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.
- [0267] 압타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 더욱이, 일부 압타머를 종양 세포가 취하며 그리하여 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적 인도를 위한 분자 부형제로서 기능이 가능할 수 있다.

- [0268] 압타머는 세포와 조직 그리고 바람직하게는 현재 본 발명에 따른 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101의 어떤 것에 따른 서열로 구성되며 이를 포함하는 펩티드나 TCR과 MHC 분자와의 복합체에 대하여, 세포 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 기법을 사용하여 선택이 가능하다.
- [0269] 본 발명의 펩티드는 MHC/펩티드 합성물에 대한 특정 항체를 생성하고 개발하는 데 사용될 수 있다. 이들은 병변 조직에 치료, 독성 물질 표적화 또는 방사능 물질로 사용될 수 있다. 이런 항체의 또 다른 사용은 PET 같은 이미징 목적을 위해 병변 조직의 방사성 핵종을 표적화할 수도 있다. 이 사용은 작은 전이를 감지하거나 병든 조직의 크기와 정확한 위치를 결정하는 데 도움이 될 수 있다.
- [0270] 그러므로 본 발명의 다른 양태는 HLA-제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II와 특이적으로 결합하는 재조합 항체의 생산 방법을 제공하는 것으로, 이 방법은 상기 HLA-제한 항원과 복합되는 용해성 형태의 MHC 클래스 I 또는 II 분자로서 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II를 발현하는 세포를 포함하는 유전자 조작된 비인간 포유동물의 면역화; 상기 비인간 포유동물의 세포를 생산하는 항체로부터 mRNA 분자의 단리; 상기 mRNA 분자에 의해 인코딩된 단백질 분자를 표시하는 파지 디스플레이 라이브러리의 생산; 및 상기 파지 디스플레이 라이브러리로부터 하나 이상의 파지의 단리를 포함하며 상기 하나 이상의 파지는 상기 HLA-제한 항원과 복합되는 상기 인간 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 특이적으로 결합하는 상기 항체를 나타낸다.
- [0271] 본 발명의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것으로 이 항체는 바람직하게는 다클론 항체, 단클론 항체, 양특이성 항체 및/또는 키메라 항체이다.
- [0272] 그러한 항체 및 단일쇄 클래스 I 주조직적합 복합체의 생산을 위한 해당 방법들 그리고 이러한 항체의 생산을 위한 다른 도구들은 WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 및 출판물(Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003)에 공개되어 있으며, 이들은 본 발명의 목적을 위해 그 전문이 참조문헌에 명백히 포함되어 있다.
- [0273] 바람직하게는 항체는 20 nm 미만, 바람직하게는 10 nm 미만의 결합 친화력으로 복합체와 결합하는 데, 이는 본 발명의 문맥 상 "특이적"으로 간주된다.
- [0274] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동등한) 이의 변이체 또는 상기 펩티드와 T 세포 교차 반응을 유도하는 이의 변이체를 포함하는 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 전장 폴리펩티드가 아니다.
- [0275] 본 발명은 또한 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 대해 적어도 88% 상동성인(바람직하게는 동등한) 이의 변이체에 관한 것으로, 상기 펩티드나 변이체가 갖는 전체 길이는 8 내지 100개, 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 8 내지 14개의 아미노산이다.
- [0276] 본 발명은 또한 인간 주조직적합, 복합체(MHC) 클래스-I 또는 -II의 분자에 결합하는 능력을 갖는 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0277] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0278] 본 발명은 또한 본 발명에 의한 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 (화학적으로) 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0279] 본 발명은 또한 본 발명에 의한 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드는 특히 HLA-DR 항원-연관된 불변쇄(Ii)의 N-말단을 포함하는 융합 단백질의 일부이거나, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 안으로) 융합된다.
- [0280] 본 발명은 또한 본 발명이 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것으로, 펩티드가 완전한(전체) 인간 단백질은 아니다.
- [0281] 본 발명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 발명에 따른 핵산에 관한 것이다.

- [0282] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0283] 본 발명은 더 나아가 의학, 특히 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 치료에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0284] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0285] 본 발명은 또한 항원 제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포인 본 발명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0286] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 펩티드를 생산하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양, 및 상기 숙주 세포나 그 배양 배지로부터 펩티드의 단리를 포함한다.
- [0287] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0288] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로, 항원 제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101을 포함하는 상기 펩티드 또는 상기 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.
- [0289] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식하는, 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화 T 세포에 관한 것이다.
- [0290] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 효과적인 숫자의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0291] 본 발명은 또한 설명한 일체의 펩티드, 본 발명에 따른 핵산, 본 발명에 따른 발현 벡터, 본 발명에 따른 세포, 또는 본 발명에 따른 활성화된 세포 독성 T 림프구의 약제로서 또는 약제의 제조에서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는, 본 발명에 따른 용도에 관한 것이다.
- [0292] 본 발명은 또한 상기 약제가 백신인, 본 발명에 따른 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는, 본 발명에 따른 용도에 관한 것이다.
- [0293] 본 발명은 더 나아가 상기 암 세포가 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 세포이거나 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암과 같은 기타 고형이나 혈액 종양의 세포인, 본 발명에 따른 용도에 관한 것이다.
- [0294] 본 발명은 더 나아가 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 진단 및/또는 예후에 사용가능한 여기서 "표적"이라 불리는 본 발명에 따른 펩티드에 근거한 특별 표지 단백질 및 바이오마커에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암 치료를 위해 이러한 신규 표적의 용도에 관한 것이다.
- [0295] 용어 "항체" 또는 "항체들"은 여기에서 광범위한 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 둘 다 포함한다. 무손상 또는 "온전한" 면역글로불린 분자뿐만 아니라, 용어 "항체들"에는 그런 면역글로불린 분자와 인간화된 버전의 면역글로불린 분자의 단편(예컨대, CDR, Fv, Fab 및 Fc 단편) 또는 중합체가 포함되며, 이 단편은 본 발명에 따른 바람직한 특성(예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 표지자 (폴리)펩티드의 특이적 결합, 높아진 수준으로 암 표지자를 발현하는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포

암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 세포로의 독소 전달, 및/또는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 표지 펩티드의 활성화 억제)을 나타내면 된다.

[0296] 가능한 한, 본 발명의 항체는 상용 공급원에서 구입해야 한다. 본 발명의 항체는 잘 알려진 방법을 통해서 만들어질 수도 있다. 당업자는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 전장의 표지 폴리펩티드 또는 그 단편이 본 발명의 항체를 생성하는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 항체를 생성하는 데 사용될 폴리펩티드는 자연적인 원천에서 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있거나, 재조합 DNA 기법을 이용하여 만들어질 수도 있다.

[0297] 예를 들어, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101의 폴리펩티드 또는 그 변이체나 단편에 따른 펩티드와 같은 본 발명에 따른 펩티드를 인코딩하는 cDNA는 원핵 세포(예컨대, 세균) 또는 진핵 세포(예컨대, 효모, 곤충 또는 포유동물의 세포)에서 발현될 수 있으며, 그 다음 재조합 단백질을 정제하여, 본 발명에 따른 항체의 생성에 사용되는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 표지 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론성 또는 다클론성 항체 제제를 생성하는 데 사용할 수 있다.

[0298] 당업자는 두개 이상의 다른 단클론 또는 다클론 항체의 조합의 생성을 의도하는 용도(예컨대, ELISA, 면역조직화학, 생체내 이미징, 면역 독소 요법)에 요구되는 특이성 및 친화성을 갖는 항체의 획득가능성을 최대화함을 인식할 것이다. 이 항체들은 그 항체들이 사용되는 목적에 의거하여 알려진 방법에 의해 바람직한 활성도에 대해 시험된다(예컨대, ELISA, 면역조직화학, 면역요법 등; 항체의 생성과 시험에 관한 추가 지침은 예를 들어 Greenfield, 2014를 참고한다(Greenfield, 2014)). 예를 들어, 항체는 포르말린 고정 폐암이나 동결된 조직 절편의 ELISA 분석법, 웨스턴 블롯, 면역조직화학 염색으로 시험할 수 있다. 치료 또는 생체내 진단용을 위한 항체는 초기의 시험관내 특성화 이후, 알려진 임상 시험 방법에 따라 시험한다.

[0299] "단클론 항체"라는 용어는 여기서 상당한 균등질 항체 개체군에서 획득이 된 것을 말한다. 즉, 이 개체군이 포함하는 각각의 항체는 자연적으로 일어날 수 있는 소수의 돌연변이체를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 여기서 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 중 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체의 서열과 상응하거나 일치하고, 쇠의 나머지 부분은 다른 중 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체, 및 이러한 항체의 단편의 서열과 상응하거나 일치하고, 희망하는 상반되는 활동성을 보여주는 "키메라(chimeric)" 항체를 포함한다(미국 특허 4,816,567, 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함됨).

[0300] 본 발명의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 준비될 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이 보통 면역성을 주는 작용제에 의해 면역되어, 면역성을 주는 작용제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 이를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있는 림프구를 유도해 낸다. 다른 방법으로는, 림프구는 시험관 내에서 면역될 수도 있다.

[0301] 단클론 항체는 또한 미국 특허 4,816,567에서 설명된 바와 같은 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 인코딩하는 DNA는 손쉽게 단리되고 전통적인 방법을 사용하여 염기 서열 분석이 가능하다(예, 마우스 유래 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써).

[0302] 시험관내 방법 또한 1가의(monovalent) 항체를 준비하는 데에 적당하다. 이 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 항체를 절편화시켜 항체의 단편을 특히 여기서는 Fab 단편을 생산할 수 있다. 예를 들어, 파파인을 사용하여 소화가 이루어질 수 있다. 파파인 소화의 예는 WO 94/29348 및 미국 특허 4,342,566에 설명되어 있다. 항체의 파파인 소화는 보통 각각 하나의 항원 결합 위치 및 남은 Fe 단편을 포함한 Fab 단편이라 부르는 동등한 두 개의 항원 결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 하나의 F(ab')₂ 단편과 하나의 pFc' 단편을 제공한다.

[0303] 항체 단편도, 이것이 다른 서열과 붙어 있든 그렇지 않든 간에, 이 단편의 활동력이 변경되지 않은 항체 또는 항체 단편에 비교할 시, 현저하게 바뀌거나 손상이 되지 않는 한, 삽입, 삭제, 치환, 또는 특정한 위치의 또는 특정한 아미노산 잔기의 다른 선택되는 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 이항화물 결합의 능력이 있는 아

미노산의 제거/추가, 생체물 수명의 증가, 분비 특징의 변화 등의 추가적인 특성을 제공할 수 있다. 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합 활성, 결합 도메인에서의 결합 조절 등의 생활성물 성질을 소유하고 있어야 한다. 항체의 기능 또는 활동 범위는 단백질의 특정한 지역의 돌연변이 생성, 발현 및 발현된 폴리펩티드의 실험에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법은 이 분야의 기술자가 손쉽게 알 수 있는 기술이며 이는 항체 단편을 인코딩하는 핵산의 위치 특이적 돌연변이 생성을 포함할 수 있다.

[0304] 본 발명의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 더욱 포함할 수 있다. 인간화된 형태의 비-인간(예, 쥐과 동물) 항체는 최소의 비-인간 면역글로불린 항체에서 유도된 서열을 포함하는 키메릭 면역글로불린항체, 면역글로불린 쇠 또는 이들의 단편(Fv, Fab, Fab' 또는 다른 항체의 항원 결합의 결과)이다. 인간화된 항체는 상보적 결정 영역(complementary determining region(CDR))의 잔기가 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종(공여 항체)의 CDR의 잔유물로 바뀐 요구되는 특이성, 친화도 및 수용력을 가진 인간 면역글로불린(수납 항체)이다. 일부 예에서는, 인간 면역글로불린의 Fv 구조(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 교체된다. 인간화된 항체는 수납 항체 또는 수입된 CDR 또는 구조 서열의 어디에서도 찾을 수 없는 서열을 포함하기도 한다. 보통, 인간 항체는 변이성 도메인을 적어도 하나 또는 거의 대부분 두 개를 포함하며, 모든 또는 실질상 모든 CDR 범위는 비-인간 면역글로불린에 상응하고 모든 또는 실질상 모든 구조 범위는 인간 면역글로불린 일치 서열이다. 인간화된 항체는 이상적으로 적어도 보통 인간 면역 글로불린의 면역글로불린 불변 범위(Fc)의 한 부분 또한 포함할 것이다.

[0305] 이 분야에서 비인간 항체를 인간화하는 방법은 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 비인간 근원에서 이에 도입된다. 이 비인간 아미노산 잔류들은 종종 "수입" 잔기이라고 일컬어지며, 이는 대개 "수입" 변수 도메인에서 출처한다. 인간화는 본질적으로 설치류의 CDR 또는 상응하는 인간 항체 서열의 CDR 서열을 인간의 것으로 교체하는 것으로 실행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 키메릭 항체(미국 특허 4,816,567)이며, 이 때 상당히 온전하지 않은 인간 변수 도메인이 비인간 종의 해당 서열로 치환되었다. 실제적으로, 인간화된 항체는 보통 여러 CDR 잔기 및 가능하게는 여러 구조 잔기가 이 설치류의 유사한 영역의 잔기와 치환된 인간 항체이다.

[0306] 면역되었을 때, 내생의 면역글로불린 생성이 없는 중에 전체 인간 항체를 생산할 수 있는 유전자식 동물(예, 생쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 키메릭 배선 돌연변이 생쥐의 항체의 중쇄 결합 영역 유전자 동형 삭제는 내생 항체 생산의 완전한 억제 결과를 가져온다. 이러한 배선 돌연변이 생쥐로의 인간 배선 면역글로불린 유전자 정렬 이입은 항원이 존재할 때 인간 항체 생산의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리에서도 생산될 수 있다.

[0307] 발명의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체에 의해서 피험자에게 투여된다. 보통, 적당한 약학적으로 허용가능한 염이 제형을 등장 상태로 만들기 위해 제형에 사용된다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는, 링거 용액(Ringer's solution) 및 포도당 용액이 있다. 이 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8이며, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 더 많은 담체는 항체를 포함하는 세포간질이 막, 리포솜 또는 미세입자와 같은 형태로 되어 있는 고체 소수성 중합체 반투성의 세포간질과 같은 지속적인 방출 준비를 포함한다. 예를 들어, 투여 방법 및 투여되는 항체의 농도에 따라 어떤 담체가 더 바람직한지는 이 분야의 당업자에게는 명백할 것이다.

[0308] 항체는 피험자, 환자 또는 세포에 주사(예, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내), 또는 주입과 같은 혈액으로서의 전달이 효율적으로 이루어질 수 있는 다른 방법으로 투여될 수 있다. 항체는 국소뿐만이 아니라 전신의 치료 효과를 얻기 위해 종양 내 또는 종피 주위의 방법으로도 투여될 수도 있다. 국소 또는 정맥내 주사가 바람직하다.

[0309] 항체 투여의 효율적인 용량과 일정은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 내리는 것은 이 분야의 기술 중의 하나다. 이 분야의 당업자는 투여되는 항체의 용량은 예를 들어 이 항체를 받는 대상, 투여 방법, 사용되는 특정한 항체의 종류 및 투여되는 다른 약들에 따라 달라진다는 것을 이해할 것이다. 단독으로 사용될 시 전형적인 항체의 일일 용량은 1 µg/kg 내지 100 mg/kg로 다를 수 있으며, 위에 언급된 요인을 고려할 때 이보다 더 높을 수도 있다. 바람직하게는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 치료를 위한 항체 투여 후, 그 치료용 항체의 효능을 당업자에게 잘 알려진 다양한 방법으로 평가할 수 있다. 예를 들어, 치료를 받고 있는 시험대상자에서 암의 크기, 수 및/또는 분포 등이 종양 영상 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 항체의 투여가 없을 경우 발생할 질병 경과에 비교하여, 종양의 성장을 정지하고/거나, 종양을 오그라들게 하고/거나, 새로운 종양의 성장을 예방하는 치료의 목적으로 투여된 항체는 효과적인 폐암의 치료라

고 할 수 있다.

- [0310] 본 발명의 다른 양태는 특이적 펩티드-MHC 복합체를 인지하는 용해성 T 세포 수용체의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 가용성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성가능하며, 그 친화력은 보완결정 부위를 표적으로 하는 돌연변이유발성에 의해 증가시킬 수 있다. T 세포 수용체 선택의 목적 상, 파지 디스플레이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화 목적 상 그리고 약물로서의 실용적인 용도의 경우, 알파 및 베타쇄는 연계될 수 있으며, 예를 들어, 비선천적 이항화 결합, 기타 공유 결합(단일쇄 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결된다(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실행을 목적으로 독소, 약물, 사이토킨(예를 들어 미국 특허 2013/0115191 참고), 항-CD3 도메인 등과 같은 효과기 세포를 모집하는 도메인과 연결될 수 있다. 더욱이 이것은 입양 전달에 사용되는 T 세포에서 발견될 수 있다. 추가 정보는 WO 2004/033685A1 및 WO 2004/074322A1에서 찾을 수 있다. sTCR의 조합은 WO 2012/056407A1에 설명되어 있다. 이 생산에 관한 추가 방법들은 WO 2013/057586A1에 공개되어 있다.
- [0311] 그 밖에, 본 발명의 펩티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 생검 샘플에 근거한 병리학자의 암 진단을 확인하는 데 사용이 가능하다.
- [0312] 항체 또는 TCR은 생체 내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 일반적으로, 항체는 방사성핵종으로 라벨링되고(예, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P 또는 ³⁵S) 면역섬광계수법(immunoscintigraphy)을 사용하여 종양의 위치가 결정될 수 있다. 한 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 위에 언급된 단백질로 구성되는 군으로부터 선택한 2개 이상의 단백질 표적의 세포의 도메인에 결합을 하고 친화도 값(Kd)은 1x10⁻⁶ μM 미만이다.
- [0313] 진단의 용도로 사용되는 항체는 여러가지의 영상 방법으로 감지될 수 있는 적당한 프로브로 라벨이 될 수 있다. 프로브의 검출 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광기 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영법을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신과 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄과 다른 란타넘계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 또한, 프로브는 2개 이상의 기능을 가지고 있을 수 있으며, 여기에 나열된 하나 이상의 방법으로 검출할 수 있다. 이러한 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 여기에 나열된 프로브로 라벨이 될 수 있다. 이렇게 항체와 프로브를 연결하는 것으로는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유원자 연결, 프로브의 항체로의 편입, 및 프로브의 결합을 위한 키레이트 화합물의 공유원자 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다. 고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 절편은 라벨링된 1차 항체 및 2차 항체와 접촉되며 여기서 항체는 제자리 단백질 발현의 검출에 사용된다.
- [0314] 본 발명의 다른 양태는 활성화된 T 세포와 항원 적재된 적당한 항원-제시 세포의 표면에서 시험관내 T 세포를 항원이 본 발명의 펩티드라고 할 때 항원 특이적인 방식으로 활성화시키는 데 충분한 시간 동안에 발현되는 인간 클래스 I 또는 MHC 분자의 접촉을 포함하는 시험관 내의 방법으로 생성하는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 충분한 양의 항원이 항원-제시 세포와 함께 사용된다.
- [0315] 바람직하게는, 포유류 세포는 TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있거나, 감소된 수준 또는 기능을 가지고 있다. TAP 펩티드 트랜스포터가 결핍되어 있는 적당한 세포로는 T2, RMA-S 및 초파리 세포를 들 수 있다. TAP이란 항원 처리에 관련된 트랜스포터를 일컫는다.
- [0316] 인간 펩티드 적재 결핍 세포주 T2는 Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA의 카탈로그 번호 CRL 1992에서 구입이 가능하고, 초파리 세포주 Schneider 2는 ATCC의 카탈로그 번호 CRL 19863에서 구입이 가능하며, 생쥐 RMA-S 세포주는 Ljunggren 등에서 묘사가 된 바 있다(Ljunggren and Karre, 1985).
- [0317] 바람직하게는, 숙주 세포는 감염전에 대부분 MHC 클래스 I 분자를 발현하지 않는다. 또한 프로모터 세포가 B7.1, B7.2, ICAM-1 및 LFA 3과 같은 T 세포에 대한 공동자극 신호를 제공하는 데 중요한 분자를 발현하는 것이 바람직하다. 다수의 MHC 클래스 II 분자의 핵산 서열 및 동시자극 분자의 서열은 GenBank와 EMBL 데이터베이스에서 공개적으로 제공된다.
- [0318] MHC 클래스 I 에피토프이 항원으로 사용되는 경우, T 세포는 CD8-양성 T 세포이다.

- [0319] 만약 항원-제시 세포가 형질감염되어 그러한 에피토프를 발현한다면, 바람직하게는 그 세포는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101을 포함하는 펩티드 또는 이의 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.
- [0320] T 세포를 시험관 내에서 생성하는 여러 다른 방법도 사용될 수 있다. 예를 들어, 자가 조직 종양-침윤 림프구는 CTL의 생성에 사용이 가능하다. Plebanski 등(Plebanski et al., 1995)은 자가 조직 말초의 혈액(PLB)을 T 세포의 준비 시 사용한다. 더욱이 수지성 세포를 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스시키거나, 재조합 바이러스에 의한 감염에 의해 자가조직 T 세포의 생산도 가능하다. 또한 자가조직 T 세포의 생산에서 B 세포도 사용할 수 있다. 또한, 펩티드 또는 폴리펩티드로 펄스된 또는 재조합된 바이러스에 의해 감염된 대식세포가 자가조직 T 세포의 준비 시 사용될 수 있다. S. Walter 등(Walter et al., 2003)은 인공 항원 제시 세포(aAPCs)를 사용하는 시험관내 T 세포의 프라이밍을 기술하며, 이는 역시 선택되는 펩티드에 대한 펩티드에 대해 T 세포를 생성하는데에도 사용될 수 있다. 본 발명에서, aAPC는 미리 생성된 MHC:펩티드 복합체를 폴리스티렌 입자(마이크로비드)의 표면과 커플링시키고 바이오틴-스트렙타아비딘 생화학을 이용함으로써 생성되었다. 이 체계는 aAPC의 정확한 MHC 밀도를 제어할 수 있도록 허용하며, 이는 항원-특이적 T 세포 반응을 혈액 샘플에서 높은 효율성으로 고- 또는 저-산염기도를 선택적으로 유도해낼 수 있게 한다. MHC:펩티드 합성체를 제외하고, aAPC는 그들의 표면에 커플된 항-CD28 항원과 같은 동시-자극 활동을 가지고 다른 단백질을 운반해야 한다. 더욱이 이러한 aAPC-기반 체계는 종종 예를 들어, 인터루킨-12와 같은 사이토킨 등 적당한 용해 요소의 추가를 요구한다.
- [0321] 동종이계 세포는 T 세포의 준비에 역시 사용될 수 있으며 방법은 WO 97/26328에 더 자세하게 기술되어 있으며, 여기에 참조 문헌으로 포함되어 있다. 예를 들어, 초과리 세포와 T2 세포에 추가적으로, CHO 세포, 배콜로바이러스-감염 곤충 세포, 박테리아, 효소, 백시니아-감염된 표적 세포 등과 같은 다른 세포들도 항원을 제시하는데에 사용될 수 있다. 또한 식물성 바이러스를 사용할 수 있다(예를 들어, Porta 등(Porta et al., 1994)을 참조). 이는 외부 펩티드의 제시를 위한 카우피 모자이크 바이러스의 높은 수확 체계로서의 개발을 기술한다.
- [0322] 이 실험의 펩티드에 대해 활성화된 T 세포는 치료에서 유용하다. 따라서, 본 발명의 더 나아간 양태는 앞서 말한 발명의 방법으로 획득할 수 있는 활성화된 T 세포에 대한 내용을 제공한다.
- [0323] 위에서 말한 방법으로 생성된 활성화된 T 세포는, 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이상 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0324] 바람직하게는, T 세포는 그의 TCR을 HLA/펩티드-합성체(예, 결합)와 상호작용을 함으로서 이런 세포를 인식한다. 이 T 세포는 효율적인 수의 활성화된 T 세포가 투여되었을 때, 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이는 데 유용하다. 환자에게 투여된 T 세포는 위에서 기술된 바와 같이 환자에게 유도되고 활성화된다(즉, 이는 자가조직 T 세포이다). 다른 방법으로는, T 세포는 환자에게 유도가 안 되고, 다른 개인에서 유도된다. 물론, 이 개인이 건강한 개인인 것이 바람직하다. 발명자들이 말하는 "건강한 개인"이라고 함은 개인이 전체적으로 좋은 건강을 가지고 있으며, 바람직하게는 충분한 면역 체계를 가지고 있으며, 더 바람직하게는, 손쉽게 실험되고 감지될 수 있는 어떤 질병도 겪고 있지 않다는 것이다.
- [0325] 생체 내에서, 본 발명에 따른 CD8-양성 T 세포는 종양 세포(이들은 가끔 MHC 클래스 II를 발현하기도 한다)이거나 종양을 감싸고 있는 간질성 세포(종양 세포)(이는 가끔 MHC 클래스 II를 또한 발현하기도 한다(Dengjel et al., 2006))이다.
- [0326] 본 발명의 T 세포는 활성적인 치료 구성의 성분으로 사용될 수도 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 비정상적으로 발현하는 환자의 표적 세포를 죽이고 환자에게 위에 정의된 바 처럼 효율적인 수의 T 세포를 투여하는 방법을 제공한다.
- [0327] 본 발명자는 "비정상적으로 발현되는"이라는 구절에 의해, 폴리펩티드가 정상 수준에 비교했을 때 과다 발현되거나 유전자가 종양이 유도된 조직에서는 침묵적이지만(silent) 종양에서는 발현되는 것 또한 의미한다. 본 발명자는 "과다 발현"이라는 구절에 의해, 폴리 펩티드가 정상 조직에서 존재하는 수준의 적어도 1.2배 이상으로 존재하는 것을 말하고, 바람직하게는 적어도 2배, 더 바람직하게는 적어도 5배 또는 10배로 존재하는 것을 의미한다.
- [0328] T 세포는 예를 들어 위에서 기술된 바와 같은 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0329] 흔히 T 세포의 입양 전송이라고 불리는 것에 대한 프로토콜은 이 업계에서 잘 알려져 있다. 그 리뷰는 다음에

서 찾을 수 있다: Gattioni 등 및 Morgan 등(Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

- [0330] 본 발명의 다른 양태는 핵산이 클로닝되며 숙주 세포, 바람직하게는 T 세포에 개입되는 T 세포 수용체를 생성하는 데 있어서 MHC와 복합된 펩티드의 용도이다. 다음 이 유전자 조합된 T 세포는 암의 요법을 위해 환자로 이전시킬 수 있다.
- [0331] 본 발명의 모든 분자(즉, 펩티드, 핵산, 항체, 발현 벡터, 세포, 활성화된 T 세포, T 세포, T 세포 수용체 또는 이를 인코딩하는 핵산)가 병을 고치는 데에 있어서 면역 반응을 피할 수 있는 성질을 가진 세포에 포함되어 있는 것이 중요하다. 따라서 본 발명에 포함되어 있는 어떤 분자든지 약제로 사용되거나 약제를 만드는 데에 사용될 수 있다. 이 분자는 단독으로 사용될 수도 있고, 어떤 알려진 분자와 함께 결합하여 사용될 수도 있다.
- [0332] 본 발명은 다음을 포함한 키트(kit)를 포함한다:
- [0333] (a) 위에 설명된 바와 같은 약학 조성물을 용액 또는 동결건조된 형태로 포함하고 있는 용기;
- [0334] (b) 임의적으로 희석제 또는 동결건조된 배합을 위한 재구성 용액을 포함하는 제2 용기; 및
- [0335] (c) 임의적으로 (i) 용액의 사용, 또는 (ii) 동결건조된 배합의 재구성 및/또는 사용을 위한 설명서.
- [0336] 이 키트는 하나 이상의 (iii) 완충액, (iv) 희석제, (v) 필터, (vi) 주사바늘, 또는 (vii) 주사기를 더욱 포함할 수 있다. 용기는 바람직하게는 병, 바이알, 주사기 또는 시험관이며 또한 반복사용 용기일 수 있다. 약학 조성물은 바람직하게는 동결건조된다.
- [0337] 본 발명에 사용되는 키트는 바람직하게는 동결건조되어 있는 약제를 적당한 용기와 이들의 재구성 및/또는 사용에 관한 지침서를 함께 포함한다. 적당한 용기는 예를 들어, 병, 바이알(예컨대, 듀얼 챔버 바이알), 주사기(듀얼 챔버 주사기 등) 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리나 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성할 수 있다. 바람직하게는 키트 및/또는 용기에는 재구성 및/또는 사용에 필요한 지시사항을 나타내는 설명서가 포함된다. 예를 들어, 라벨 상에서 동결건조된 배합을 상기 펩티드 농도로 재구성해야 한다고 지시할 수 있다. 라벨은 또한 약제가 피하투여가 가능한지 아니면 유용한지를 보여줄 수도 있다.
- [0338] 배합을 포함한 용기는 재구성된 약제의 반복된 투여를 가능하게 하는 다용도 바이알일 수 있다(예컨대, 약 2 내지 6회의 투여). 키트는 또한 적당한 희석제(예컨대, 중탄산 용액)를 포함하는 두 번째의 용기를 포함할 수도 있다.
- [0339] 희석제와 동결건조된 약제를 섞을 때는, 재구성된 약제의 최종 펩티드 농도가 바람직하게는 적어도 0.15 mg/mL/펩티드(=75 μg)이고 바람직하게는 3 mg/mL/펩티드(=1500 μg)를 넘지 않아야 한다. 키트는 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입 및 사용 설명서 등의 사용자의 입장에서 필요한 것을 더 추가로 포함할 수도 있다.
- [0340] 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 약학 조성물을 포함하는 하나의 용기를 다른 제품과 함께 또는 단독으로 포함하거나(예컨대, 다른 화합물들 또는 이 다른 화합물들의 약학 조성물) 각각의 조성물을 각자 다른 용기에 포함할 수 있다.
- [0341] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 다음과 같은 두 번째의 화합물 또는 그들의 조성물과 함께 투여될 수 있는 약학 조성물을 포함한다. 보조제(예컨대, GM-CSF), 화학요법제, 자연 생산품, 호르몬 또는 길항제, 항-혈관신생제제 또는 억제제, 피사유도체 또는 킬레이터. 키트의 조성물은 미리 혼합되어 있을 수도 있고 또는 각각의 조성물이 각각 따로 용기에 담겨 있을 수도 있다. 키트의 조성물은 하나 이상의 액체 용액에 제공될 수도 있고, 바람직하게는 수용액, 더욱 바람직하게는 무균 수용액에 제공된다. 키트의 조성물은 적당한 용해제를 첨가함으로써 액체로 바뀔 수 있는 고체로 제공될 수도 있고, 바람직하게는 이는 다른 용기에 담겨 제공된다.
- [0342] 치료 키트의 용기는 바이알, 실험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 고체나 액체를 담을 수 있는 다른 어떤 용기일 수 있다. 보통, 하나 이상의 구축물이 있을 경우, 키트는 두 번째의 물약병 또는 다른 용기를 포함하고, 이는 각각의 복용을 가능하게 한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 액체를 포함하고 있는 용기를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 치료 키트는 현재 키트의 조성물인 발명의 제제를 투여할 수 있는 기구를 포함한다(예컨대, 하나 이상의 바늘, 주사기, 안약 투입제, 피펫 등).
- [0343] 본 배합은 구강(경구), 비강, 안약 형태, 피하, 피내, 근육내, 혈관내 또는 경피 등 어떠한 투여 형태로든 펩티드 투여에 적당한 약제이다. 바람직하게는 투여는 피하(s.c.)이며, 가장 바람직하게는 주입 펌프에 의한 피내(i.d.)일 수 있다.

- [0344] 본 발명의 펩티드가 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암으로부터 단리되었으므로, 본 발명의 약제는 바람직하게는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 치료에 사용된다.
- [0345] 본 발명은 또한 사전선별된 TUMAP의 참고로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드가 포함된 약학 조성물의 제조를 포함하는 개별 환자의 개인화 약학 조성물의 생산 방법을 포함하며, 여기서 약학 조성물에 사용되는 하나 이상의 펩티드는 개별 환자의 적합성을 위해 선택된다. 한 구현에서, 약학적 성분은 백신이다. 이 방법은 TCR 단리 또는 용해성 항체 그리고 다른 치료 옵션과 같은 하류 용도를 위해 T 세포 클론의 생산에도 적응시킬 수 있다.
- [0346] "개인화 약학"이란, 활성적으로 개인화된 암 백신 및 자가 환자 조직을 사용하는 적응적 세포 세포 요법을 포함하는 한 명의 개별 환자의 치료를 위해서만 사용되는 그러한 개별 환자를 위해 구체적으로 맞춤화된 요법을 의미해야 한다.
- [0347] 본원에 사용된 용어 "참고"란 특정한 종양 유형에서 면역원성 및/또는 과다제시에 대해 사전선별된 펩티드의 군을 지칭해야 한다. "참고"란 용어는 백신에 포함된 특정한 펩티드가 물리적 시설에서 사전제조되어 보관되는 백신에 포함된다는 것을 내포함을 의도하지 않지만 그 가능성은 심사숙고된다. 이 펩티드는 생산된 개인화 백신마다 새로 제조될 수 있거나 사전제조되어 보관될 수 있음이 명시적으로 심사숙고된다. 참고(예를 들어, 데이터베이스의 형태)는 다양한 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 대립유전자를 가진 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 환자의 종양 조직에서 고도로 과발현된 종양 연관 펩티드로 구성된다. 참고는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 펩티드나 연장된 MHC 클래스 I 펩티드를 포함할 수 있다. 여러 개의 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 조직으로부터 수집된 종양 연관 펩티드뿐만 아니라, 참고는 HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 및 HLA-B*44 표지 펩티드를 포함할 수 있다. 이 펩티드들은 TUMAPS에 의해 유도된 T 세포 면역성의 크기 비교를 허용하며 그에 따라 항종양 반응을 유발하는 백신의 용량에 대해 중요한 결정을 내리도록 허용한다. 둘째로, 이들은 환자에서 "자가" 항원으로부터 유래된 TUMAP에 대한 일체의 백신 유도된 T 세포 반응이 관찰되지 않는 경우 "비자가" 항원으로부터 유래된 중요한 양성 대조 펩티드로 기능한다. 그리고 셋째로, 환자의 면역적격의 상태에 대한 결론을 내리도록 허용할 수 있다.
- [0348] 참고용 TUMAP는 유전자 발현 분석, 질량 분석 및 T 세포 면역학(XPresident[®])이 조합된 통합 기능적 유전체 접근 방식을 사용하여 동정된다. 이 접근 방식은 정상 조직에서는 발현되지 않거나 최소한으로만 발현되지만 고비율의 종양에서는 진정하게 존재하는 TUMAP만을 추가 분석을 위해 선택하도록 보증한다. 초기 펩티드 선택을 위해, 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 환자의 샘플과 건강한 공여자의 혈액을 단계적 접근 방식으로 분석했다.
- [0349] 1. 악성 종양 물질로부터의 HLA 리간드는 질량 분석에 의해 파악되었다
- [0350] 2. 광범위한 정상 기관 및 조직과 비교하여, 악성 종양 조직(급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암)에서 과발현되는 유전자를 식별하기 위해 게놈 전체 전령 리보핵산(mRNA) 발현 분석을 사용했다.
- [0351] 3. 확인된 HLA 리간드를 유전자 발현 데이터와 비교했다. 종양 조직 상에서 과다제시되거나 선택적으로 제시된 펩티드들, 바람직하게는 2 단계에서 검출된 선택적으로 발현되거나 과발현된 유전자에 의해 인코딩된 펩티드들

은 다중-펩티드 백신용으로 적절한 TUMAP 후보로 간주했다.

- [0352] 4. TUMAP로서 동정된 펩티드의 관련성을 지지하는 추가의 증거를 파악하기 위해 문헌 연구를 수행했다.
- [0353] 5. mRNA 수준에서의 과다 발현의 타당성은 3 단계에서 종양 조직으로부터 선택되는 TUMAP의 재검출 그리고 건강한 조직에 대한 검출의 부재(또는 낮은 빈도)에 의해 확인되었다.
- [0354] 6. 선택되는 펩티드에 의한 생체내 T 세포 반응 유도가 가능할 수 있는지 평가하기 위해, 건강한 공여자 그리고 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암 환자로부터 얻은 인간 T 세포를 사용하여 시험관내 면역원성 분석을 수행했다.
- [0355] 한 양태에서, 펩티드를 참고에 포함시키기 전에 면역원성에 대해 사전선별이 수행된다. 제한이 아니라 한 예로서, 펩티드/MHC 복합체와 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원 제시 세포를 가진 건강한 공여자의 CD8+ T 세포를 반복적으로 자극하는 시험관내 T 세포 초기감작을 포함하는 방법을 사용하여 참고에 포함된 펩티드의 면역원성을 결정한다.
- [0356] 이 방법은 희귀한 암과 드문 발현 프로필을 가진 환자에서 바람직하다. 현재 개발되고 있는 고정 성분을 가진 다중펩티드 각테일과는 대조적으로, 참고는 종양의 항원이 실제 발현과 백신과 유의하게 더 높은 일치를 허용한다. 다중표적 접근 방식에서는 단일 펩티드 또는 "재고" 펩티드들의 조합을 각 환자에 대해 사용한다. 이론상으로, 예를 들어 50개 라이브러리로부터 선택되는 5개의 다른 항원 펩티드에 근거한 접근방법은 이미 약 17백만가지의 가능한 약품(DP) 성분을 초래할 것이다.
- [0357] 한 양태에서 여기 그리고 다음에 설명되는 본 발명에 따른 방법에 근거하여, 이 펩티드들은 개별 환자를 위한 적합성에 근거하여 백신에 포함되도록 선택된다.
- [0358] HLA 표현형, 전사체학 및 펩티도믹스 데이터는 환자의 종양 물질과 혈액 샘플로부터 수집하여 참고(데이터베이스)와 환자 고유의(즉 돌연변이된) TUMAP를 포함하는 각 환자에 대해 가장 적절한 펩티드를 동정한다. 환자 종양에서 선택적으로 발현되거나 과다 발현되는 펩티드를 선택하게 되며, 이는 가능한 경우 환자의 개별 PBMC로써 시험했을 때 강한 시험관내 면역원성을 나타냈다.
- [0359] 바람직하게는 백신에 포함되는 펩티드는 다음으로 구성되는 방법에 의해 확인된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)의 동정; (b) (a)에서 동정된 펩티드를 위에 설명된 펩티드들의 참고(데이터베이스)와 비교; 및 (c) 그 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 참고(데이터베이스)로부터 하나 이상의 펩티드 선택을 포함하는 방법에 의해 확인된다. 예를 들어, 종양 샘플에 의해 제시되는 TUMAP는 다음에 의해 확인된다: (a1) 종양 샘플에서 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 모양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계 결정. 바람직하게는, MHC 리간드의 서열은 종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키고 용출된 리간드의 서열결정에 의해 확인된다. 바람직하게는, 종양 샘플과 정상 조직을 같은 환자로부터 얻는다.
- [0360] 참고(데이터베이스) 모델을 사용한 펩티드의 선택 외에도 또는 이에 대한 대안으로, TUMAP가 환자에서 새로 확인된 다음 백신에 포함될 수 있다. 한 예로서, 후보 TUMAP 환자에서, (a1) 종양 샘플에서 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질의 파악을 위해 종양 샘플의 발현 데이터를 모양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플에서 얻은 발현 데이터와 비교; 및 (a2) 종양에 의해 과다 발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래한 MHC 리간드를 파악하기 위해, 발현 데이터를 MHC 클래스 I 및/또는 클래스 II 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열과 상관관계의 결정에 의해 동정할 수 있다. 다른 예로서, 개별 환자로부터의 정상의 상응하는 조직과 비교해서 종양 샘플에 대해 고유한 돌연변이를 포함하는 단백질을 확인할 수 있으며 그 돌연변이를 특이적으로 표적화하는 TUMAP의 파악이 가능하다. 예를 들어, 종양 및 상응하는 정상 조직의 유전체는 전체 유전체의 서열 결정에 의해 서열을 결정할 수 있다: 유전자의 단백질 코딩 영역에서 비동의 돌연변이 발견을 위해, 종양 조직으로부터 유전체의 DNA 및 RNA를 추출하고 비돌연변이 유전체의 배자계역은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 추출한다. 응용 NGS 접근방식은 단백질 코딩 영역의 재배열결정으로 제약된다(엑손 재배열결정). 이 목적을 위해, 인간 샘플로부터 엑손 DNA를 업체가 공급한 표적 강화 키트를 사용한 다음, 예를 들어 HiSeq2000(Illumina)로 서열을 결정하여 포획한다. 추가적으로 유전자 발현의 직접적 정량화 그리고 돌연변이된 유전자가 환자의 종양에서 발현된

다는 검증을 위해 종양 mRNA의 서열을 결정한다. 그에 따른 수백만의 서열 리드는 소프트웨어 알고리즘을 통해 처리된다. 출력 목록에는 돌연변이와 유전자 발현이 포함된다. 종양 특이적 체세포 돌연변이는 PBMC 유래된 종자계 변이와 비교하여 결정한 다음 우선순위화한다. 다음에는 새로 동정된 펩티드를 위에 설명한 창고의 면역원성에 대해 시험할 수 있으며, 적절한 면역원성을 소유하는 후보 TUMAP를 선택하여 백신에 포함시킨다.

[0361] 한 예시적 구현에서, 백신에 포함된 펩티드는 다음에 의해 확인된다: (a) 개별 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드들(TUMAP)을 위에 설명한 방법으로 동정하고; (b) 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성과 과다 제시에 대해 사전선별된 펩티드들의 창고를 이용하여 (a)에서 동정된 펩티드와 비교하고; (c) 환자에서 동정된 종양-연관 펩티드와 상관관계가 있는 하나 이상의 펩티드를 창고(데이터베이스)에서 선택하고; (d) 선택적으로 (a)에서 새로 동정된 하나 이상의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인한다.

[0362] 한 예시적 구현에서, 백신에 포함된 펩티드는 다음에 의해 확인된다: (a) 개인 환자의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 동정하고; (b) (a)에서 새로 동정된 하나 이상의 펩티드를 선택하고 그 면역원성을 확인한다.

[0363] 개인화 펩티드 기반 백신에 대한 펩티드를 선택하면, 백신이 생산된다. 백신은 바람직하게는 20 내지 40% DMSO, 바람직하게는 약 30 내지 35% DMSO(약 33% DMSO 등)에 용해된 개별 펩티드들로 구성된 액체 배합이다.

[0364] 제품에 포함되어야 할 펩티드는 각각 DMSO에 용해한다. 단일 펩티드 용액의 농도는 제품에 포함시킬 펩티드의 수에 의존하여 선택해야 한다. 단일 펩티드-DMSO 용액은 동등하게 혼합하여 제품에 포함되는 모든 펩티드를 포함하는 용액이 펩티드 당 내지 2.5 mg/mL의 농도를 갖도록 한다. 다음 혼합된 용액을 주사 용수와 1:3의 비율로 희석하여 33% DMSO에서 펩티드 당 0.826 mg/mL의 농도를 달성한다. 희석된 용액을 0.22 μm 무균 필터를 통해 여과시킨다. 최종 벌크 용액을 얻는다.

[0365] 최종 벌크 용액을 바이알에 채운 다음 사용 때까지 -20°C에서 보관한다. 바이알 하나에는 700 μL의 용액을 함유하고 각 펩티드를 0.578 mg씩 함유한다. 이 가운데 500 μL(펩티드 당 약 400 μg)는 피내 주사에 적용한다.

[0366] 암 치료에 유용함에 추가하여, 본 발명의 펩티드는 진단에 유용하다. 펩티드가 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 세포로부터 생성되었으며 또한 이러한 펩티드가 정상 조직에서 존재하지 않거나 낮은 수준으로 존재하므로, 이러한 펩티드를 사용하여 암의 존재를 진단할 수 있다.

[0367] 혈액 샘플 내 조직 생검물에서 주장된 펩티드의 존재는 암의 진단 시 병리학자를 도울 수 있다. 항체, 질량 분석 또는 당업계에 알려진 기타 방법의 수단에 의한 특정 펩티드의 검출은 조직 샘플이 악성이나 염증이 있거나 일반적으로 질병 상태에 있음을 조직학자에게 알려줄 수 있거나 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁내막암의 바이오마커로 사용될 수 있다. 펩티드의 그룹의 존재는 병든 조직의 분류 또는 하위 분류를 가능하게 한다.

[0368] 병든 조직 표본의 펩티드의 탐지는 특히 만약 T 림프구가 작용 이전에 참여하는 것으로 알려져 있거나 기대할 때, 면역계를 포함한 치료의 이익에 대한 결정을 내릴 수 있게 한다. MHC 발현의 손실은 감염된 악성 세포가 면역 감시를 탈출하는 데에서 잘 설명되는 기전이다. 펩티드의 존재는 이 기전이 분석된 세포에서 악용되지 않는 것을 보여준다.

[0369] 본 발명의 펩티드는 펩티드 또는 MHC 분자에 합성된 펩티드에 대한 T 세포 반응 또는 항체 반응 같은 펩티드에 대한 림프구 반응을 분석하는 데 사용될 수 있다. 이런 림프구 반응은 추가 치료 단계에서 결정을 내릴 때 전조 표지자로 사용될 수 있다. 이런 반응은 또한 림프구 반응을 여러 방법으로, 예를 들어, 단백질 백신, 핵산, 자가 조직 물질, 림프구의 양자 전송을 유도하는 것을 목표로 하는 면역치료 접근방식의 대리 반응 표지자로 사용될 수 있다. 유전자 치료 설정에서, 펩티드에 대한 림프구 반응은 부작용의 평가에서 고려할 수 있다. 림프구 반응의 모니터링은 이식 요법의 후속 시험, 예를 들어, 융합의 이식편 대 숙주 및 숙주 대 이식편 질병의 검출을 위한 중요한 도구가 될 수도 있다.

[0370] 본 발명을 그 바람직한 구현을 설명하는 다음 실시예를 통해 그리고 동반되는 도면을 참조하여 하되 이로써 제한됨이 없이 설명한다. 본 발명의 목적 상, 본원에 인용된 모든 참조문헌은 이의 전문이 참조로 혼입된다.

도면의 간단한 설명

[0371]

도 1a 내지 도 1f는 상이한 암 조직(검은 점)에서 다양한 펩티드의 과다제시를 보여준다. 상부: 기술적인 반복 측정치의 MS 신호 강도 중간값이 단일 HLA-A*02 양성 정상(회색 점, 그림의 좌측) 그리고 펩티드가 검출된 종양 샘플(검은 점, 그림의 우측)에 대해 점으로 표시되어 있다. 상자는 정규화 신호 강도의 중간값, 25번째와 75번째 백분위수를 표시하는 반면, 수염은 여전히 더 낮은 사분위의 1.5 사분위간 범위(IQR)에 있는 가장 낮은 데이터 점 및 여전히 더 높은 사분위의 1.5 IQR 내에 있는 가장 높은 데이터 점으로 연장된다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서가 매겨진다(혈액 세포, 혈관, 뇌, 간, 폐: 고위험, 회색 점; 생식 기관, 유방, 전립선: 저위험, 회색 점; 다른 모든 기관들: 중간 위험; 회색 점). 하부: 각 기관에서 상대적 펩티드 검출 빈도가 막대 도표로 표시되어 있다. 패널 아래의 숫자는 각 기관에 대해 분석한 샘플의 합계 가운데 펩티드가 검출된 샘플 수를 나타낸다(정상 샘플 N = 440, 종양 샘플 N = 490). 한 샘플에서 펩티드가 검출되었지만 기술적인 이유로 정량화할 수 없었다면, 그 샘플은 검출 빈도의 제시에 포함되지만 도면의 상부에는 점으로 표시되지 않는다. 조직들(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 혈액세포; 혈관; 뇌; 심장; 간; 폐; 단핵세포; T 세포; 지방 조직; 부신; 담관; 방광; 골수; 식도; 눈; 담낭; 두경부; 대장; 소장; 신장; 림프절; 중추 신경; 말초 신경; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 흉막; 골격근; 피부; 척수; 비장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁. 종양 샘플: AML(급성 골수성 백혈병); BRCA(유방암); CCC(담관세포 암종); CLL(만성 림프구성 백혈병); CRC(대장암); GBC(담낭암); GBM(교모세포종); GC(위암); GEJC(위-식도 접합부 암), HCC(간세포 암종); HNSCC(두경부 편평세포 암종); MEL(흑색종); NHL(비호지킨 림프종); NSCLCadeno(비소세포 폐암 선암종); NSCLCother(NSCLCadeno이나 NSCLCsquam으로 분명히 지정될 수 없는 NSCLC 샘플); NSCLCsquam(평편세포 비소세포 폐암); OC(난소암); OSCAR(식도암); PACA(췌장암); PRCA(전립선암); RCC(신세포 암종); SCLC(소세포 폐암); UBC(방광 암종); UEC(자궁내막암). 도 1a) 펩티드: KLLDFSTRI(서열 식별 번호 1), 도 1b) 펩티드: ALLDVLVKL(서열 식별 번호 2), 도 1c) 펩티드: FLLVPSPIWQL(서열 식별 번호 3), 도 1d) 펩티드: LVWEVVESV(서열 식별 번호 5), 도 1e) 펩티드: SLLDKLSGI(서열 식별 번호 10). 도 1f는 상이한 암 조직(검은 점)에서 다양한 펩티드의 과다제시를 보여준다. 상부: 기술적인 반복 측정치의 MS 신호 강도 중간값이 단일 HLA-A*03 양성 정상(회색 점, 그림의 좌측) 그리고 펩티드가 검출된 종양 샘플(검은 점, 그림의 우측)에 대해 점으로 표시되어 있다. 상자는 정규화 신호 강도의 중간값, 25번째와 75번째 백분위수를 표시하는 반면, 수염은 여전히 더 낮은 사분위의 1.5 사분위간 범위(IQR)에 있는 가장 낮은 데이터 점 및 여전히 더 높은 사분위의 1.5 IQR 내에 있는 가장 높은 데이터 점으로 연장된다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서가 매겨진다(혈액 세포, 혈관, 뇌, 간, 폐: 고위험, 회색 점; 생식 기관, 유방, 전립선: 저위험, 회색 점; 다른 모든 기관들: 중간 위험; 회색 점). 하부: 각 기관에서 상대적 펩티드 검출 빈도가 막대 도표로 표시되어 있다. 패널 아래의 숫자는 각 기관에 대해 분석한 샘플의 합계 가운데 펩티드가 검출된 샘플 수를 나타낸다(정상 샘플 N = 36, 종양 샘플 N = 107). 한 샘플에서 펩티드가 검출되었지만 기술적인 이유로 정량화할 수 없었다면, 그 샘플은 검출 빈도의 제시에 포함되지만 도면의 상부에는 점으로 표시되지 않는다. 조직들(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 혈액세포; 혈관; 뇌; 심장; 간; 폐; 부신; 방광; 담낭; 소장; 림프절; 췌장; 피부; 비장; 기관. 종양 샘플: AML(급성 골수성 백혈병); BRCA(유방암); CCC(담관세포 암종); CLL(만성 림프구성 백혈병); CRC(대장암); GBC(담낭암); GBM(교모세포종); GC(위암); HCC(간세포 암종); HNSCC(두경부 편평세포 암종); MEL(흑색종); NHL(비호지킨 림프종); NSCLCadeno(비소세포 폐암 선암종); NSCLCother(NSCLCadeno이나 NSCLCsquam으로 분명히 지정될 수 없는 NSCLC 샘플); NSCLCsquam(평편세포 비소세포 폐암); OC(난소암); OSCAR(식도암); PACA(췌장암); PRCA(전립선암); RCC(신세포 암종); SCLC(소세포 폐암); UBC(방광 암종); UEC(자궁내막암), 도 1f) 펩티드: SLLGAATVEPPK(서열 식별 번호 81; A*03).

도 2a 내지 도 2g는 여러 암 샘플에서 고도로 발현된 본 발명의 출처 유전자에 대한 예시적 발현 프로파일을 보여준다. 종양(검은 색 점) 및 정상(회색 점) 샘플은 원발 장기에 따라 그룹화되어 있다. 상자 수염 도표는 FPKM 중간값, 25번째와 75번째 백분위수(상자) 그리고 여전히 더 낮은 사분위의 1.5 사분위간 범위(IQR)에 있는 가장 낮은 데이터 점 및 여전히 더 높은 사분위의 1.5 IQR 내에 있는 가장 높은 데이터 점으로 연장되는 수염들을 나타낸다. 정상 기관은 위험 범주에 따라 순서대로 나와 있다. FPKM: 킬로베이스 당 및 매핑된 리드 백만개당 단편. 조직들(왼쪽부터 오른쪽으로): 정상 샘플: 혈액세포; 혈관; 뇌; 심장; 간; 폐; 지방 조직; 부신; 담관; 방광; 골수; 식도; 눈; 담낭; 두경부; 대장; 소장; 신장; 림프절; 말초 신경; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 흉막; 골격근; 피부; 비장; 위; 갑상선; 기관; 요관; 유방; 난소; 태반; 전립선; 고환; 흉선; 자궁. 종양 샘플: AML(급성 골수성 백혈병); BRCA(유방암); CCC(담관세포 암종); CLL(만성 림프구성 백혈병); CRC(대장암); GBC(담낭암); GBM(교모세포종); GC(위암); HCC(간세포 암종); HNSCC(두경부 편평세포 암종); MEL(흑색종);

NHL(비호지킨 림프종); NSCLCadeno(비소세포 폐암 선암종); NSCLCother(NSCLCadeno이나 NSCLCsquam으로 분명히 지정될 수 없는 NSCLC 샘플); NSCLCsquam(평편세포 비소세포 폐암); OC(난소암); OSCAR(식도암); PACA(췌장암); PRCA(전립선암); RCC(신세포 암종); SCLC(소세포 폐암); UBC(방광 암종); UEC(자궁내막암). 도 2a) 앙상블 ID: ENST00000225964, 펩티드: ALLDVLVKL(서열 식별 번호 2), 도 2b) 앙상블 ID: ENST00000374472, 펩티드: SLLDKLSGI(서열 식별 번호 10), 도 2c) 앙상블 ID: ENST00000617924, 펩티드: FASERPPSV(서열 식별 번호 33), 도 2d) 앙상블 ID: ENST00000603198, 펩티드: YIYEDEVRL(서열 식별 번호 39), 도 2e) 앙상블 ID: ENST00000420453, 펩티드: AIWSTILIA(서열 식별 번호 43), 도 2f) 앙상블 ID: ENST00000473984, 펩티드: IAISQLTFV(서열 식별 번호 65), 도 2g) 앙상블 ID ENST00000375105.7, 펩티드: LLLALRLSL(서열 식별 번호 64).

도 3은 건강한 HLA-A*02+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 102 펩티드(GLDPTQFRV, 펩티드 코드: POLA1-003)(A, 왼쪽 패널) 및 서열 식별 번호 103 펩티드(SLVSYLDKV, 펩티드 코드: KRT16P-001)(B, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*02로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 세 주기의 자극 후, A*02/서열 식별 번호 102(A) 및 A*02/서열 식별 번호 103(B)으로 염색한 2D 다합체를 사용하여 펩티드-반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널들(A 및 B)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 유리(singlet) 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 부울 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

도 4는 건강한 HLA-A*02+ 공여자에서 펩티드 특이적 시험관내 CD8+ T 세포 반응의 예시적 결과를 보여준다. 서열 식별 번호 18 펩티드(KMMTFFQGL)(A, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호 68 펩티드(KLLADAFKV)(B, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호 40 펩티드(FTLPFLVNL)(C, 왼쪽 패널), 서열 식별 번호 19 펩티드(MLLPWLPKL)(D, 왼쪽 패널), 또는 서열 식별 번호 48 펩티드(MLAEIHPKA)(E, 왼쪽 패널)와의 각 복합체에서 항-CD28 mAb 및 HLA-A*02로 코팅된 인공 APC를 사용하여 CD8+ T 세포를 초회감작시켰다. 세 주기의 자극 후, A*02/서열 식별 번호 18(A), A*02/서열 식별 번호 68(B), A*02/서열 식별 번호 40(C), A*02/서열 식별 번호 19(D) 또는 A*02/서열 식별 번호 48(E)에 대해 2D 다합체 염색에 의해 펩티드 반응성 세포의 검출을 수행했다. 오른쪽 패널(A, B, C, D 및 E)은 관련이 없는 A*02/펩티드 복합체로 자극한 세포의 대조 염색을 보여준다. 생존가능한 단일 세포를 CD8+ 림프구에 대해 가두었다. 부울 게이트는 다른 펩티드에 대해 특이적인 다합체로 검출된 허위 양성 사건의 배제에 도움이 되었다. CD8+ 림프구 가운데 특이적 다합체+ 세포의 빈도가 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0372] **실시예**
- [0373] **실시예 1**
- [0374] 세포 표면에 제시된 종양 연관 펩티드의 동정 및 정량화
- [0375] 조직 샘플
- [0376] 환자의 종양 조직은 다음으로부터 얻었다: Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); Bio-Options Inc.(Brea, CA, 미국); Geneticist Inc.(Glendale, CA, 미국); University Hospital Heidelberg(Heidelberg, 독일); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국); Tissue Solutions Ltd(Glasgow, 영국); University Hospital Munich(Munich, 독일). 정상 조직은 Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); Bio-Options Inc.(Brea, CA, 미국); BioServe(Beltsville, MD, 미국); Capital BioScience Inc.(Rockville, MD, 미국); Centre for Clinical Transfusion Medicine Tuebingen(Tuebingen, 독일); Geneticist Inc.(Glendale, CA, 미국); Kyoto Prefectural University of Medicine(KPUM)(Kyoto, 일본); Osaka City University(OCU)(Osaka, 일본); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국); Tissue Solutions Ltd(Glasgow, 영국); University Hospital Geneva(Geneva, 스위스); University Hospital Heidelberg(Heidelberg, 독일); University Hospital Tuebingen(Tuebingen, 독일); University Hospital Munich(Munich, 독일)로부터 얻었다.
- [0377] 수술이나 부검 전에 모든 환자의 동의서가 제출되었다. 조직은 절제 후 즉시 충격동결한 다음 TUMAP의 단리까지 -70°C 이하에서 보관했다.
- [0378] 조직 샘플에서 HLA 펩티드의 단리
- [0379] 충격 냉동된 조직 샘플의 HLA 펩티드 풀은 약간 변형된 프로토콜(Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999)에 따라 고품질 조직의 면역 침전에 의해 HLA-A*02-특이적 항체 BB7.2, HLA-A, -B, -C-특이적 항체 W6/32, HLA-DR

특이적 항체 L243 및 HLA DP 특이적 항체 B7/21, CNBr 활성화 세파로오스, 산 처리 및 한의 여과를 이용해 취득되었다.

[0380] 질량분광 분석

[0381] 얻어진 HLA 펩티드 풀은 그들의 소수성에 의해 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리되었고(nanoAcquity UPLC system, Waters) 용출하는 펩티드는 ESI 소스를 갖춘 LTQ-velos 및 융합 하이브리드 질량 분석기(ThermoElectron)에 의해 분석되었다. 펩티드 풀은 분당 400nL의 유량을 적용하여 1.7 μm C18 역상 물질(Waters)로 충전된 합성-실리카 마이크로-모세관 칼럼(75 μm i.d. x 250 mm)에 바로 로딩된다. 이어서, 펩티드는 두-단계 180분-10% 내지 33%의 이진 구배를 이용하여 분리되고, 여기서 유량은 분당 300nL이다. 구배는 용매 A(물의 0.1% 포름산)와 용매 B(아세트니트릴의 0.1% 포름산)로 이루어져 있다. 금이 입혀진 유리 모세관(PicoTip, New Objective)이 미세-ESI 소스로의 도입에 사용되었다. LTQ-Orbitrap 질량 분석기가 TOP5 전략을 이용한 데이터-존 모드에서 작동되었다. 간략하게, 스캔 사이클은 오비트랩(orbitrap)의 높은 질량 정확도(R = 30 000)의 전스캔으로 시작되고, 이후 5개의 가장 많은 이전에 선택한 이온의 동적 배체에 의한 전조 이온에 대한 오비트랩(R = 7500)의 MS/MS 스캔이 이어진다. 랜덤 질량 스펙트럼은 고정된 위발견율($q \leq 0.05$) 및 추가의 수동 제어로 SEQUEST에 의해 해석했다. 동정된 펩티드 서열이 불확실한 경우, 그것은 서열이 동일한 합성 표준 펩티드의 단편화 패턴과 생성된 천연 펩티드의 단편화 패턴과 비교하여 이를 추가로 검증하였다.

[0382] 비표지 상대적 LC-MS 정량화는 이온 계측 즉, LC-MS 특징의 추출 및 분석에 의해 수행했다(Mueller et al., 2007). 이 방법은 펩티드의 LC-MS 신호 영역이 샘플 내의 풍부함과 상관관계가 있음을 가정으로 한다. 추출된 특징은 전하 상태 디컨볼루션 및 정체 시간 정렬에 의해 더욱 처리되었다(Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). 마지막으로 모든 LC-MS 특징은 서열 확인 결과와 상호 참조하여 다른 샘플과 조직의 정량 데이터를 펩티드 제시 프로필에 합쳤다. 이 정량 데이터를 중심 경향성에 따라 2단 형태로 정상화함으로써 기술적인 생물학적 복제 내에서의 변동을 고려했다. 그리하여 동정된 펩티드는 하나씩 정량 데이터와 연관시키며 샘플과 조직 사이의 상대적 정량화를 허용할 수 있다. 그 밖에 펩티드 후보로부터 얻어진 모든 정량 데이터를 수동으로 검사하여 데이터 일관성을 보증하고 자동화 분석의 정확성을 확인했다. 펩티드마다 평균 샘플 제시는 물론 복사 변이를 보여주는 제시 프로필을 계산했다. 이 프로필은 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁 및 자궁 내막암의 샘플을 정상 조직 샘플의 기준선에 병치한다. 예시적인 과다제시된 펩티드의 제시 프로필이 도 1에 나와있다. 예시적 펩티드의 종양 상의 펩티드 제시는 표 11에 나와있다.

[0383] 표 11은 선택되는 펩티드에서 다양한 암 객체에 대한 제시를 보여주며 따라서 표시된 암의 진단 및/또는 치료에 대해 언급된 펩티드의 특별한 관련성을 보여준다(예컨대, 급성 골수성 백혈병, 대장암, 교모세포종, 위암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종, 자궁 및 자궁내막암은 서열 식별 번호 1, 유방암, 대장암, 담낭암, 위-식도 접합부 암, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 소세포 폐암, 자궁 및 자궁내막암은 서열 식별 번호 2).

[0384] 표 11은 객체에 걸쳐 본 발명의 선택되는 종양연관 펩티드 제시의 개요이다.

[0385] 암 유형: AML(급성 골수성 백혈병); BRCA(유방암); CCC(담관세포 암종); CLL(만성 림프구성 백혈병); CRC(대장암); GBC(담낭암); GBM(교모세포종); GC(위암); GEJC(위-식도 접합부 암); HCC(간세포 암종); HNSCC(두경부 편평세포 암종); MEL(흑색종); NHL(비호지킨 림프종); NSCLCadeno(비소세포 폐암 선암종); NSCLCother(NSCLCadeno이나 NSCLCsquam으로 분명히 지정될 수 없는 NSCLC 샘플); NSCLCsquam(편평세포 비소세포 폐암); OC(난소암); OSCAR(식도암); PACA(췌장암); PRCA(전립선암); RCC(신세포 암종); SCLC(소세포 폐암); UBC(방광 암종); UEC(자궁 및 자궁내막 암).

[0386] [표 11]

서열 식별 번호	서열	암 유형의 웹티드 제시
1	KLLDFSTRI	AML, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
2	ALLDVLVKL	BRCA, CRC, GBC, GEJC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
3	FLLVPSPIWQL	AML, CLL, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, RCC, SCLC, UEC
4	YLGDSHVLL	AML, BRCA, CLL, CEC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC
5	LVWEVVESV	HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR
6	ALHDSPVYL	AML, BRCA, CCC, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC, UEC
7	ALWEEVKATSL	GBM, HCC, MEL, NSCLC, OC, SCLC, UEC
8	ILQSLVPAA	CRC, NHL, NSCLC, OC, RCC
9	FLQEGDLISV	CLL, CRC, NHL, NSCLC, OSCAR, SCLC
10	SLLDKLSGI	CLL, CRC, NHL
11	ALLPHAPEAV	BRCA, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC
12	HLDSMNVSI	AML, CLL, GC, MEL, NHL, PACA, PRCA
13	FLDEGSLRL	GC, HCC, HNSCC, MEL, OC, PACA, SCLC, UBC
14	LLIEVSEEL	BRCA, CRC, GBM, HCC, OSCAR, MEL, NHL, NSCLC, PACA, SCLC
15	NLVMPLLHI	AML, CLL, CRC, MEL, NSCLC, OC, PACA, UEC
16	ALLDAEQSPVAL	AML, CLL, HCC, MEL, NHL, NSCLC, RCC
17	VLWDLRPSSLI	CLL, HNSCC, NHL, NSCLC, PACA, SCLC
18	KMMTFFQGL	HCC, NSCLC, NHL, OSCAR, PRCA, UBC
19	MLLPWLPKL	CLL, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC
20	VLISLPGKV	HCC, MEL, NSCLC
21	FVFISPSFL	AML, BRCA, CCC, CRC, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, PACA, PRCA
22	SLYDVPVGA	CLL, CRC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, RCC, UBC
23	GLEVLDALL	BRCA, CRC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, RCC, UEC
24	TLTSLNILL	AML, CRC, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UEC
25	ISVLNLSAI	CCC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, PRCA, SCLC
26	KLWTSLVNL	AML, CLL, CRC, GC, HNSCC, MEL, NSCLC, PACA,

[0387]

서열 식별 번호	서열	암 유형의 펩티드 제시
		SCLC
27	IAAGVPNTDA	BRCA, CLL, HCC, MEL, NSCLC, OC, RCC
28	SQLEKPEETA	HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, SCLC, UEC
29	LLWEFPSMA	AML, CLL, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, UEC
30	LLRLTLLPL	CLL, HCC, NHL, NSCLC, OC, UEC
31	VVLPVITL	GC, HCC, NHL, NSCLC, RCC, PACA
32	VLSVSAVLGA	CLL, GBM, GC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, RCC
33	FASERPPSV	BRCA, CRC, GC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UBC
34	LLNVEPAGA	AML, BRCA, CLL, GBM, HCC, MEL, NHL, UEC
35	VLLNSNYPV	NSCLC, PRCA, UBC
36	FQVTRTTGV	GBC, HCC, NHL, NSCLC, RCC
37	KILDEFYNV	CRC, GC, HCC, NSCLC
38	SLSAWLPSL	GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, RCC, UBC, UEC
39	YIYEDEVRL	BRCA, CRC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UEC
40	FTLPFLVNL	AML, CLL, CRC, GC, NHL, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, UBC
41	LMASEGIWESS L	CRC, GC, NSCLC, PRCA
42	WITPVIPAL	AML, CLL, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, OC, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
43	AIWSTILIA	BRCA, CRC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, SCLC
44	WLIPRQLAAA	PRCA
45	ALYHQSPLL	HNSCC, NSCLC, OSCAR, OC
46	AMVEIIPKV	NSCLC, SCLC, UBC
47	ALLPGVPGI	CRC, GBC, HNSCC, NSCLC, OC, RCC
48	MLAEIHPKA	AML, BRCA, GBM, MEL, NSCLC
49	FLWDPRDVVL	GBM, OC
50	GLASYLDRV	BRCA, CRC, HCC, RCC, OC, OSCAR, SCLC, UBC
51	GLLTQVHIL	AML, BRCA, CRC, GBM, HCC, NSCLC, PACA, UBC
52	LAFVSHVLI	CRC, GC
53	TISISLSSV	AML, CLL, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
54	GLSPDQVFL	GBM, HNSCC, MEL, NHL

[0388]

서열 식별 번호	서열	암 유형의 펩티드 제시
55	MVQQEKLFV	AML, BRCA, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
56	IITNLIVNI	AML, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, RCC, SCLC, UEC
57	YVLMTSLLL	BRCA, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PRCA, SCLC
58	MIISHRALEL	CLL, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, PRCA, UBC
59	LAASTTFLGV	HNSCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PACA, UBC
60	LLLATLENL	AML, CRC, GBM, MEL, NSCLC, SCLC, UBC, UEC
61	VLPWQPLLL	AML, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, PACA
62	SLLGKPGTLTI	BRCA, CLL, CRC, GBC, HCC, NHL, NSCLC, OSCAR, RCC, PRCA, UBC, UEC
63	LSFKRSLSI	AML, BRCA, CRC, GBM, HCC, NSCLC, PRCA, RCC, UBC
64	LLLALRLSL	GBC, HCC, NHL, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA
65	IAISQLTFV	CLL, HCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PRCA, SCLC, UEC
66	ILNELLNSI	GBC, GC, HCC, MEL, NHL, PRCA, SCLC
67	ALKELMGPA	NHL, NSCLC, RCC
68	KLLADAFKV	AML, HCC, HNSCC, NSCLC, RCC, UBC, UEC
69	LLCPVVLQL	AML, CLL, CRC, NSCLC, RCC, UBC, UEC
70	LLLQIEPAA	GBM, HNSCC, NHL, NSCLC, UBC
71	WLMPVMPAL	CLL, GBM, GC, MEL
72	YLSFIKILL	MEL, PRCA
73	STTIINLIL	AML, BRCA, CRC, HNSCC, HCC, NSCLC, OC, PACA
74	TLLSYSIPL	CRC, GC, MEL, PACA, PRCA, UEC
75	TTQEAEKLLER	BRCA, GBC, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
76	TEQGPTGVTM	AML, CLL, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, OC, RCC, UEC
77	VPAGVDVITEY	PRCA
78	GLLPPVRAM	GBC, NHL, OSCAR
79	KIQDPGTAF	PRCA
80	RDQIVTVSV	AML, BRCA, NHL, SCLC, UBC, UEC
81	SLPGAATVEPPK	AML, BRCA, CC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC

[0389]

서열 식별 번호	서열	암 유형의 펩티드 제시
82	LAPQMIAL	CLL, GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, UBC, SCLC
83	KPRGPTPL	BRCA, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, PACA, RCC, SCLC, UBC
84	RLCPAAPSEK	BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, RCC, UBC, UEC
85	VYLLTFPPL	BRCA, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, UBC, UEC
86	LMIGKRIL	HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
87	LNLVSETEAMV K	CRC, UEC
88	DEQETDAFL	NSCLC
89	MIFYVLQK	AML, BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
90	YLRDFKIKR	AML, BRCA, GBM, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
91	SSHFILVTF	CCC, GC, HCC, RCC
92	ELVAVTSVL	CLL, NHL, PACA, SCLC, UEC
93	WQKNSMRL	NSCLC
94	MGRRRNLY	CCC, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
95	QVKIVTLL	GC, NSCLC, OC, PACA, PRCA, RCC
96	KIIEDLANTV	CCC, CRC, HCC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, SCLC, UBC, UEC
97	GLIDDKGTIKL	AML, BRCA, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC, UEC
98	SLMEVTHDL	BRCA, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, UBC, UEC
99	ALMDGSESRRF V	BRCA, CLL, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, UEC
100	SLGPPVGV	AML, GBM, OC, UBC
101	KLPEGHLPEV	HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA, RCC

[0390]

[0391]

실시예 2

[0392]

본 발명의 펩티드를 인코딩하는 유전자의 발현 프로파일

[0393]

정상 세포와 비교한 종양 세포 상의 펩티드의 과다 제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 대해 충분하며 일부 펩티드는 정상 조직에서도 발생하는 그 근원 단백질에도 불구하고 종양 특이적이다. 여전히 mRNA 발현 양상 분석은 면역요법을 위한 펩티드 표적의 선택에서 추가적 안정성 수준을 추가한다. 특히 친화도 성숙 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 펩티드는 종양에 고유하며 정상 조직에는 없는 단백질로부터 유래될 것이다.

[0394]

RNA 워천 및 준비

[0395]

수술로 제거된 조직 검체는 위에서 나타낸 바와 같이(실시예 1 참조) 각각의 환자로부터 동의서를 얻은 다음 제공되었다. 종양 조직 검체는 수술 직후 스냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화되었다. 총 RNA는 TRI 시약(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 샘플로부터 만들었으며, 이는 RNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)에 의해 청소되었다; 이 두 가지 방법은 모두 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0396]

RNASeq 실험을 위한 건강한 인체 조직의 총 RNA는 다음으로부터 얻었다. Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston, Herts, 영국); Bio-Options Inc.(Brea, CA, 미국); Geneticist Inc.(Glendale, CA, 미국); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국); Tissue Solutions Ltd(Glasgow, 영국).

[0397]

RNASeq 실험을 위한 종양 조직의 총 RNA는 다음으로부터 얻었다: Asterand(Detroit, MI, 미국 & Royston,

Herts, 영국); BioCat GmbH(Heidelberg, 독일); BioServe(Beltsville, MD, 미국); Geneticist Inc.(Glendale, CA, 미국); Istituto Nazionale Tumori "Pascale"(Naples, 이태리); ProteoGenex Inc.(Culver City, CA, 미국); University Hospital Heidelberg(Heidelberg, 독일).

- [0398] RNA 샘플의 양과 질은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent, Waldbronn, Germany)에 의해 RNA 6000 Pico LabChip Kit(Agilent)를 사용하여 분석되었다.
- [0399] RNAseq 실험
- [0400] 종양 및 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 CeGaT(Tuebingen, 독일)사의 차세대 서열결정(RNAseq)으로 수행하였다. 간단히 말하면, 서열결정 라이브러리는 제공사의 프로토콜(Illumina Inc., San Diego, CA, 미국)에 따라 Illumina HiSeq v4 시약 키트를 사용하여 준비하며, 여기에는 RNA 분절, cDNA 변환 및 서열결정 어댑터 추가가 포함된다. 복수의 샘플에서 유래한 라이브러리들은 동일한 몰로 혼합한 다음, Illumina HiSeq 2500 시퀀서에서 그 제조사의 설명에 따라 서열을 결정함으로써 50 bp의 싱글 엔드 리드(single end read)를 생성한다. 처리된 리드는 STAR 소프트웨어를 사용하여 인간 게놈(GRCh38)에 대해 매핑한다. 발현 데이터는 RPKM(백만개 매핑된 리드당 킬로베이스당 리드, Cufflinks 소프트웨어에 의해 생성)으로 전사물 수준 상 그리고 엑손 수준 상(총 리드, Bedtools 소프트웨어에 의해 생성)에서 제공되며, 앙상블 서열 데이터베이스(Ensembl77)의 주석에 기반한다. 엑손 리드는 엑손 길이 및 정렬 크기에 대해 정규화하여 RPKM 수치를 얻는다.
- [0401] 도 1에는 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁 및 자궁 내막암에서 고도로 과발현되거나 배타적으로 발현되는 본 발명의 출처 유전자의 예시적 발현 프로파일이 나와있다. 추가의 예시적 유전자의 발현 점수가 표 12에 나와 있다.
- [0402] 표 12는 발현 점수이다. 이 표는 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 매우 고도로 과발현된 유전자로부터의 펩티드들(+++), 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 고도로 과발현된 유전자로부터의 펩티드들(++) 또는 정상 조직의 패널에 비해 종양에서 과발현된 유전자로부터의 펩티드들(+)을 나열한다. 이 점수의 베이스라인은 다음의 관련성 있는 정상 조직의 측정치로부터 계산했다: 혈액 세포; 혈관; 뇌; 심장; 간; 폐; 지방조직; 부신; 담관; 방광; 골수; 연골; 식도; 눈; 담낭; 두경부; 대장; 소장; 신장; 림프절; 중추 신경; 말초 신경; 췌장; 부갑상선; 복막; 뇌하수체; 흉막; 골격근; 피부; 척수; 비장; 위; 갑상선; 기관; 요관.
- [0403] 동일한 조직 유형에 대해 여러 샘플의 발현 데이터가 있는 경우, 모든 해당 샘플의 산술 평균을 그 계산에 사용했다.

[0404] [표 12]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현
3	FLLVPSPIWQL	+
5	LVWEVVESV	+
9	FLQEGDLISV	+
10	SLLDKLSGI	++
14	LLIEVSEEL	++
17	VLWDLRPSSLI	++
18	KMMTFFQGL	+
19	MLLPWLPKL	+
24	TLTSLNILL	+
31	VVLPVITL	+
32	VLSVSAVLGA	++
33	FASERPPSV	+++
34	LLNVEPAGA	++
35	VLLNSNYPV	+++
36	FQVTRTTGV	+++
37	KILDEFYNV	++
38	SLSAWLPSL	+++
39	YIYEDEVRL	+++
40	FTLPFLVNL	++
41	LMASEGIWESSL	++
42	WITPVIPAL	+
43	AIWSTILIA	++++
44	WLIPRQLAAA	++++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	++
49	FLWDPRDVVL	++
51	GLLTQVHIL	++
52	LAFVSHVLI	+++
53	TISISLSSV	++
54	GLSPDQVFL	++

[0405]

서열 식별 번호	서열	유전자 발현
56	IITNLIVNI	++++
57	YVLMTSLLL	+++
59	LAASTTFLGV	++
60	LLLATLENL	+
62	SLLGKPGLTI	++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+++
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	+
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	+++
69	LLCPVVLQL	+++
70	LLLQIEPAA	+++
71	WLMPVMPAL	++

[0406]

[0407] **실시예 3**

[0408] MHC 클래스 I 제시 펩티드의 시험관내 면역원성

[0409] 본 발명의 TUMAP의 면역원성에 대한 정보를 얻기 위해, 본 발명자는 펩티드/MHC 복합체 및 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 갖는 CD8+ T 세포의 반복된 자극을 근거로 시험관내 T 세포 초회 감작을 사용하여 조사를 수행했다. 이 방법으로 본 발명자는 지금까지 HLA-A*02:01 제한된 TUMAP의 면역원성을 보여줄 수

있었으며, 이것은 이 펩티드들이 인간에 존재하는 CD8+ 전조 T 세포에 대한 T 세포 에피토프이라는 것을 보여주었다(표 13a 및 13b).

[0410] CD8+ T 세포의 시험관내 감각

[0411] 펩티드-MHC 복합체(pMHC) 및 항-CD28 항체가 적재된 인공 항원 제시 세포에 의한 시험관내 자극을 수행하기 위해, 본 발명자는 독일 소재 Transfusion Medicine Tuebingen에서 동의서를 받은 건강한 공여자로부터의 CD8 마이크로비드(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, 독일)를 사용한 양성 선택을 통해 신선한 HLA-A*02 백혈구 성분 채집 산물로부터 CD8+ T 세포를 먼저 단리했다.

[0412] PBMC 및 단리된 CD8+ 림프구는 10% 열 비활성화된 인간 AB 혈청(PAN-Biotech, Aidenbach, 독일), 100 U/mL 페니실린/100 µg/mL 스트렙토마이신(Cambrex, Cologne, 독일), 1 mM 피루브산 나트륨(CC Pro, Oberdorla, 독일), 20 µg/mL 젠타마이신(Cambrex)으로 보충된 RPMI-Glutamax(Invitrogen, Karlsruhe, 독일)를 포함하는 T 세포 배지(TCM)에서 사용할 때까지 배양했다. 이 단계에서 2.5 ng/mL IL-7(PromoCell, Heidelberg, 독일) 및 10 U/mL IL-2(Novartis Pharma, Nuernberg, 독일) 또한 TCM에 추가했다.

[0413] pMHC/항-CD28 코팅된 비드의 생성, T 세포 자극 및 판독은 고도로 정의된 시험관내 체계에서 수행했으며, 자극 조건 당 4가지 다른 pMHC 분자 그리고 판독 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 각각 사용했다.

[0414] 정화된 공동-자극 쥐 IgG2a 항인체 CD28 Ab 9.3(Jung et al., 1987)은 제조사가 권장하는 숄폰-N-하이드록시숙신이미도비오틴을 사용하여 화학적으로 비오틴닐화했다(Perbio, Bonn, 독일). 사용된 비드는 스트렙티비딘으로 코팅된 직경 5.6 µm의 폴리스티렌 입자였다(Bangs Laboratories, Illinois, 미국).

[0415] 양성과 음성 대조 자극으로 사용되는 pMHC는 각각 A*0201/MLA-001(변형된 Melan-A/MART-1의 펩티드 ELAGIGILTV(서열 식별 번호 104))와 A*0201/DDX5-001(DDX5의 YLLPAIVHI, 서열 식별 번호 105)였다.

[0416] 800.000 비드/200 µL는 4 x 12.5 ng 비오틴-pMHC 존재 하에 96-웰 플레이트에서 코팅하고 세척한 다음 600 ng 비오틴 항-CD28을 첨가하여 200 µL의 부피로 만들었다. 자극은 1x10⁶ CD8+ T 세포를 5 ng/mL IL-12(PromoCell)로 보충된 200 µL TCM에서 37°C 및 3일 동안 세척하고 코팅된 2x10⁵ 비드와 함께 96-웰 플레이트에서 공동배양함으로써 개시했다. 매체의 반은 80 U/mL IL-2로 추가된 새로운 TCM에 의해 교환되고 배양은 37°C에서 4일간 계속되었다. 이 자극 주기는 총 세 번 수행되었다. 조건 당 8가지 다른 pMHC 분자를 사용하는 pMHC 멀티머의 판독을 위해, 이미 설명된 바와 같이(Andersen et al., 2012) 2차원 조합대수적 코팅 접근 방식을 사용했으며, 5가지 다른 형광색소와의 결합을 허용하는 약간의 변형이 있었다. 마지막으로 다합체 분석은 Live/dead 근 IR 염료(Invitrogen, Karlsruhe, 독일), CD8-FITC 항체 클론 SK1(BD, Heidelberg, 독일) 및 형광 pMHC 다합체로써 세포를 염색하여 수행했다. 분석에는 적절한 레이저 및 필터가 장착된 BD LSRII SORP 세포측정기를 사용했다. 펩티드 특이 세포는 총 CD8+ T 세포의 백분율로 계산되었다. 다합체 분석의 평가는 FCS Express 소프트웨어(De Novo Software)를 사용하여 수행되었다. 특정 다합체 + CD8+ 림프구의 시험관내 초기감작은 음성 대조군 자극과 비교함으로써 감지되었다. 주어진 항원의 면역성은 건강한 기증자의 최소한 하나의 시험관내 자극된 평가가능한 웰이 시험관내 자극 후 CD8+ T 세포주를 보이면 발견되었다(예를 들어, 이 웰은 CD8+ T 세포 중 최소한 1%의 특정 다합체+를 가졌으며 특정 테트라머+ 세포의 백분율은 최소한 음성 대조군 자극의 매체보다 10배여야 한다).

[0417] 급성 골수성 백혈병, 유방암, 담관세포 암종, 만성 림프구성 백혈병, 대장암, 담낭암, 교모세포종, 위암, 위-식도 접합부 암, 간세포 암종, 두경부 편평세포 암종, 흑색종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 신세포 암종, 소세포 폐암, 방광 암종 및 자궁 및 자궁 내막암의 펩티드에 대한 시험관내 면역원성

[0418] 실험된 HLA 클래스 I 펩티드에서, 시험관내 면역원성은 펩티드 특정 T 세포주의 형성에 의해 입증될 수 있었다. 도 3A 및 도 3B에는 본 발명의 7개 펩티드에 대한 TUMAP 특이적 다합체 염색 후 얻은 예시적 유세포 측정 결과가 제시되고, 도 4A 내지 도 4E에는상응하는 음성 대조가 나타났다. 본 발명의 30개의 펩티드에 대한 결과는 표 13a 및 표 13b에 요약되어 있다.

[0419] [표 13a]

[0420] 본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관내 면역원성. 본 발명의 펩티드 발명자 실행한 시험관내 면역원성 실험의 예시적 결과. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++.

서열 식별 번호	서열	웰 양성 [%]
102	GLDPTQFRV	++++
103	SLVSYLDKV	+

[0421]

[0422]

[표 13b]

[0423]

본 발명의 HLA 클래스 I 펩티드의 시험관내 면역원성. 본 발명의 펩티드 발명자가 실행한 시험관내 면역원성 실험의 예시적 결과. <20% = +; 20-49% = ++; 50-69% = +++; ≥ 70% = ++++.

서열 식별 번호	서열	웰 양성 [%]
1	KLLDFSTRI	+
2	ALLDVLVKL	+
3	FLLVPSPIWQL	+
4	YLGDSHVLL	+
6	ALHDSPVYL	++
7	ALWEEVKATSL	+
13	FLDEGSLRL	+
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	+++
26	KLWTSLVNL	+++
29	LLWEFPSMA	++
31	VVLPVITL	++
33	FASERPPSV	+++
36	FQVTRTTGV	+
37	KILDEFYNV	+++
38	SLSAWLPSL	+
40	FTLPFLVNL	+++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	+++
49	FLWDPRDVVL	+
50	GLASYLDRV	+
51	GLLTQVHIL	+
65	IAISQLTFV	+
68	KLLADAFKV	++++
74	TLLSYSIPL	+
96	KIIEDLANTV	++
101	KLPEGHLPEV	+

[0424]

[0425]

실시예 4

[0426]

펩티드의 합성

[0427]

모든 펩티드는 Fmoc-전략을 사용하여 표준 및 확립된 고체상 펩티드 합성으로써 합성되었다. 각 개별 펩티드의 정제와 순도로 질량 분석법과 분석 RP-HPLC에 의해 결정했다. 펩티드는 순도가 >50%인 흰색에서 황백색의 동결 건조물(삼불화 초산염)로 얻어졌다. 모든 TUMAP는 바람직하게는 삼불화아세트산 염 또는 아세트산 염으로 투여 되지만, 다른 염의 형태 또한 가능하다.

[0428]

실시예 5

[0429]

MHC 결합 검증

[0430]

본 발명에 따른 T 세포 기반 요법의 후보 펩티드를 MHC 결합 능력(친화도)에 대해 더 실험했다. 본 발명의 79개의 펩티드에 대한 결과는 표 14에 요약되어 있다.

[0431]

개별 펩티드-MHC 복합체는 UV-리간드 교환에 의해 만들었으며, UV에 민감한 펩티드가 UV 조사 후 분할된 다음 분석된 관심 대상의 펩티드로 교환되었다. 펩티드 수용성 MHC 분자를 효과적으로 결합하고 안정화시킬 수 있는 펩티드 후보만이 MHC 복합체의 해리를 막는다. 이 교환작용의 수율을 결정하기 위해, 안정화된 MHC 복합체의 경

쇄($\beta 2m$) 검출에 근거하여 ELISA를 수행했다. 이 검정은 Rodenko 등에서 일반적으로 설명된대로 수행했다 (Rodenko et al., 2006).

[0432] 96 웰 MAXISorp 플레이트(NUNC)를 실온 그리고 PBS에서 2ug/mL 스트렙타비딘으로 밤새 코팅하고 4회 세척한 다음 블로킹 완충액을 함유하는 2% BSA와 37°C에서 1시간 동안 블로킹을 진행했다. 되접기된 HLA-A*02:01/MLA-001 단량체가 표준의 역할을 했으며, 그 범위는 15 내지 500ng/mL였다. UV-교환 반응을 위한 펩티드-MHC 단량체는 블로킹 완충액으로 100배 희석되었다. 샘플은 37°C에서 1시간 배양 후 4회 세척하고 2ug/mL HRP 접합된 항- $\beta 2m$ 으로 37°C에서 1시간 배양한 다음 NH₂SO₄로 정지시킨 TMB 용액으로 검출했다. 흡광은 450nm에서 측정했다. 높은 교환 수율(바람직하게는 50% 초과, 가장 바람직하게는 75% 초과)을 보이는 후보 펩티드가 일반적으로 항체나 그 단편 및/또는 T 세포 수용체나 그 단편의 생성 및 생산을 위해 선호되는데, 이는 MHC 분자에 대한 충분한 결합성을 보이며 MHC 복합체의 해리를 막기 때문이다.

[0433] [표 14]

[0434] MHC 클래스 I 결합 점수. HLA 클래스 I 제한 펩티드의 HLA-A*02:01에 대한 결합 범위는 펩티드 교환 수율에 의해 정해졌다: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = ++++.

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
1	KLLDFSTRI	++++
2	ALLDVLVKL	++++
3	FLLVPSPIWQL	++++
4	YLGDSHVLL	++++
5	LVWEVVESV	++++
6	ALHDSPVYL	++++
7	ALWEEVKATSL	++++
8	ILQSLVPAA	++++
9	FLQEGDLISV	++++
10	SLLDKLSGI	++++
11	ALLPHAPEAV	+++
12	HLDSMNVSI	++++
13	FLDEGSLLRL	++++
14	LLIEVSEEL	++++
15	NLVMPLLHI	++
16	ALLDAEQSPVAL	++++
17	VLWDLRPSSLI	++++
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	++++
20	VLISLPGKV	++
21	FVFISSPFL	+++
22	SLYDVPVGA	++++
23	GLEVLDALL	++
24	TLTSLNILL	++++
25	ISVLNLSAI	++
26	KLWTSLVNL	++++
27	IAAGVPNTDA	++
28	SQLEKPETA	+++

[0435]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
29	LLWEFPSMA	++++
30	LLRLTLLPL	++
31	VVLPIVITL	++++
32	VLSVSAVLGA	+++
33	FASERPPSV	++++
34	LLNVEPAGA	++++
35	VLLNSNYPV	++++
36	FQVTRTTGV	++++
37	KILDEFYNV	++++
38	SLSAWLPSL	++++
39	YIYEDEVRL	++++
40	FTLPFLVNL	++++
41	LMASEGIWESSL	+++
42	WITPVIPAL	++++
43	AIWSTILIA	++
44	WLIPRQLAAA	++++
45	ALYHQSPLL	++++
46	AMVEIIPKV	++++
47	ALLPGVPGL	++++
48	MLAEIHPKA	++++
49	FLWDPRDVVL	++++
50	GLASYLDRV	++++
51	GLLTQVHIL	++++
52	LAFVSHVLI	++
53	TISISLSSV	++++
54	GLSPDQVFL	++++
55	MVQQEKLFV	+++
56	IITNLIVNI	+++
57	YVLMTSLLL	++++
58	MIISHRALEL	++
59	LAASTTFLGV	++++
60	LLATLENL	++++
61	VLPWQPLLL	++
62	SLLGKPGLTI	++++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	++++

[0436]

서열 식별 번호	서열	펩티드 교환
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	++++
69	LLCPVVLQL	++++
70	LLLQIEPAA	++++
71	WLMPVMPAL	++++
73	STTINLIL	++
74	TLLSYSIPL	++++
96	KIIEDLANTV	++++
97	GLIDDKGTIKL	++++
98	SLMEVTHDL	++++
99	ALMDGSESFFV	++++
100	SLGPPVGV	++++
101	KLPEGHLPEV	++++

[0437]

[0438]

실시예 6

[0439]

세포 표면에 제시된 종양 연관 펩티드의 절대 정량화.

- [0440] 항체 및/또는 TCR과 같은 결합체의 생성은 힘든 과정이며, 이는 다수의 선택되는 표적만을 위해 실행할 수 있다. 종양 연관 및 종양 특이적 펩티드의 경우, 선택 기준에는 제시의 배타성 및 세포 표면 상에 제시된 펩티드의 밀도가 포함되지만 이로써 제한되지는 않는다. 실시예 1에서 기술된 바와 같이 펩티드의 분리 및 상대적 정량화 외에도 본 발명자들은 WO 2016/107740 특허에 기술된 세포 당 절대 펩티드 카피 수를 분석했다. 고품종 종양 샘플에서 세포 당 TUMAP 카피 수의 정량화에는 분리된 TUMAP의 절대 정량화, TUMAP 단리 과정의 효율 및 분석된 조직 샘플의 세포수가 요구된다.
- [0441] nanoLC-MS/MS에 의한 펩티드 정량화
- [0442] 질량 분석에 의한 펩티드의 정확한 정량화를 위해서, 두 개의 다른 동위원소로 표지된 펩티드 변이체를 사용하여 펩티드마다 보정 곡선을 생성했다(TUMAP 합성 동안 하나 또는 두 개의 동위원소 표지된 아미노산이 포함된다). 이러한 동위원소 표지된 변이체는 질량에서만 종양 연관 펩티드와 다르며 다른 물리화학적 물질에서는 차이를 보이지 않는다(Anderson et al., 2012). 펩티드 보정 곡선을 위해, 일련의 nano LC-MS/MS 측정을 수행하여 일정한(이중 동위원소 표지된 펩티드) 동위원소 표지된 펩티드에 대해 적정된 펩티드(단일 동위원소 표지된 펩티드)의 MS/MS 신호이 비율을 결정했다.
- [0443] 내부 표준물질로도 불리는 이중 동위원소 표지된 펩티드를 각 MS 샘플에 스파이킹했으며 모든 MS 신호는 내부 표준물질의 MS 신호에 대해 정규화하여 MS 실험 사이의 가능한 기술적 변동을 없앴다.
- [0444] 보정 곡선은 적어도 3개의 다른 기질, 즉, 정규 MS 샘플과 유사한 천연 샘플로부터 HLA 펩티드 용출액에서 작성했으며, 작성마다 MS 중복 실행을 사용했다. 평가를 위해 MS 신호를 내부 표준 물질의 신호에 대해 정규화했으며 보정 곡선을 로지스틱 회귀에 의해 계산했다.
- [0445] 조직 샘플의 종양 연관 펩티드에 대한 정량화에서는, 해당 샘플 또한 내부 표준물질로써 스파이킹하고; MS 신호를 내부 표준물질에 대해 정규화한 다음 펩티드 보정 곡선을 사용하여 정량화했다.
- [0446] 펩티드/MHC 단리의 효율
- [0447] 모든 단백질 정제 과정과 마찬가지로, 조직 샘플에서 단백질의 단리는 관심 대상 단백질에 대한 일정한 손실과 연관이 있다. TUMAP 단리의 효율을 결정하기 위해, 절대 정량화를 위해 선택되는 모든 TUMAP에 대해 펩티드/MHC 복합체를 생성했다. 천연 펩티드/MHC 복합체로부터 스파이킹된 것을 구별할 수 있도록, TUMAP의 단일 동위원소 표지 버전을 사용했다. 즉, TUMAP 합성에 하나의 동위원소 표지 아미노산이 포함되었다. 이 복합체를 새로 만들어진 조직 용해물에 스파이킹했으며, 즉, TUMAP 단리 절차에서 가능한 가장 이른 시점에 스파이킹한 후, 다음 친화도 정제에서 천연 펩티드/MHC 복합체와 같이 포획했다. 그러므로 단일 표지 TUMAP의 회수 측정은 개별 천연 TUMAP의 단리 효율에 대해 결론을 내리는 것을 허용한다.
- [0448] 단리 효율은 적은 숫자의 샘플에서 분석했으며 이러한 조직 샘플 사이에 유사했다. 이와 반대로 단리 효율은 개별 펩티드 사이에 차이가 있다. 이것은 단리 효율이 제한된 숫자의 조직 샘플에서만 결정되었다더라도 다른 조직의 표본으로 외삽할 수 있음을 시사한다. 하지만 그 단리 효율이 한 펩티드에서 다른 펩티드로는 외삽할 수 없을 수 있기 때문에 각 TUMAP를 개별적으로 분석하는 것이 필요하다.
- [0449] 고형 동결 조직에서 세포수의 결정
- [0450] 절대 펩티드 정량화를 실시한 조직 샘플의 세포수를 결정하기 위해, 본 발명자들은 DNA 함량 분석을 적용했다. 이 방법은 출처가 다른 광범위한 샘플들에 적용이 가능하며 가장 중요하게는 동결 샘플에 적용이 가능하다(Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). 펩티드 단리 프로토콜 시, 조직 샘플이 균질한 용해물로 처리되며 이로부터 소량의 용해물 일정부분을 취한다. 이 일정부분을 세 부분으로 나누며 그로부터 DNA가 단리된다(QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). 각 DNA 단리로부터 얻는 총 DNA 함량은 형광 기반 DNA 정량화 분석을 사용하여(Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany) 2번 이상 반복하여 정량화한다.
- [0451] 세포수를 계산하기 위해, 정의된 세포수 범위를 갖는 여러 공여자로부터 단리된 분취물로부터 건강한 혈액 세포의 DNA 표준 곡선을 생성했다. 이 표준 곡선을 사용하여 각 DNA 단리물의 총 DNA 함량으로부터 총 세포 함량을 계산한다. 펩티드 단리에 사용된 조직 샘플의 평균 총 세포수를 용해물의 일정 부분의 알려진 용적과 총 용해물 용적을 고려하여 외삽한다.
- [0452] 세포 당 펩티드 카피 수

[0453] 위에서 언급된 실험의 데이터를 사용하여, 본 발명자들은 샘플의 펩티드 총량을 총 세포수로 나눈 다음 단리 효율에 의한 나누기를 하여 세포 당 TUMAP 카피 수를 계산했다. 선택되는 펩티드의 복제 세포수가 표 15에 나와 있다.

[0454] 표 15는 절대 카피 수이다. 이 표는 중앙 샘플에서 절대 펩티드 정량화의 결과를 나열하고 있다. 세포 당 카피 수의 중간값이 각 펩티드에 대해 표시되어 있다: <25 = +; ≥25 = ++; ≥50 = +++; ≥75 = +++. 평가가능한 고품질 MS 데이터를 얻을 수 있는 샘플의 수가 표시되어 있다.

[0455] [표 15]

서열 식별 번호	펩티드 코드	세포 당 복제수(중간값)	샘플의 숫자
1	NUDCD2-001	+++	8
2	COLPDG-001	++++	12
4	altORF-002	+	7
5	altORF-003	++++	13
6	altORF-004	+	23
7	altORF-005	+	1
8	altORF-006	++++	12
9	altORF-007	++	11
10	altORF-008	+	11
11	altORF-009	+	13
39	altORF-037	++	4
96	KRT18-001	++	1
97	CDC2-006	++	10
100	CIZ1-001	+	1

[0456]

[0457] 참조 문헌 목록

[0458] Accardi, L. et al., Int.J Cancer **134** (2014): 2742-2747

[0459] Aken, B. L. et al., Database.(Oxford) **2016** (2016)

[0460] Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124

[0461] Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933

[0462] American Cancer Society, (2015a), www.cancer.org

[0463] American Cancer Society, (2015b), www.cancer.org

[0464] Ampie, L. et al., Front Oncol. **5** (2015): 12

[0465] Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902

[0466] Anderson, D. M. et al., Cell **160** (2015): 595-606

[0467] Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878

[0468] Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814

[0469] Armitage, J. O., Blood **110** (2007): 29-36

[0470] Aspden, J. L. et al., Elife. **3** (2014): e03528

[0471] Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708

[0472] Azevedo, R. et al., J Control Release **214** (2015): 40-61

- [0473] Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- [0474] Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- [0475] Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
- [0476] Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300
- [0477] Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- [0478] Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- [0479] Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711
- [0480] Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- [0481] Bray, F. et al., Int J Cancer **132** (2013): 1133-1145
- [0482] Bridgewater, J. et al., J Hepatol. **60** (2014): 1268-1289
- [0483] Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599
- [0484] Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43
- [0485] Bujas, T. et al., Eur.J Histochem. **55** (2011): e7
- [0486] Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. **12** (2006): 2817-2825
- [0487] Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. **9** (2003): 5902-5908
- [0488] Byrd, J. C. et al., N.Engl.J Med. **369** (2013): 32-42
- [0489] Carballido, E. et al., Cancer Control **19** (2012): 54-67
- [0490] Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 345-357
- [0491] Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007): 561-574
- [0492] Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014): 476-482
- [0493] ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- [0494] Cohen, C. J. et al., J Mol.Recognit. **16** (2003a): 324-332
- [0495] Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b): 4349-4361
- [0496] Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114
- [0497] Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- [0498] Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- [0499] Coosemans, A. et al., Anticancer Res **33** (2013): 5495-5500
- [0500] Counter, C. M. et al., Blood **85** (1995): 2315-2320
- [0501] de, Klerk E. et al., Trends Genet. **31** (2015): 128-139
- [0502] Dedes, K. J. et al., Sci.Transl.Med. **2** (2010): 53ra75
- [0503] Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- [0504] Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
- [0505] Economopoulou, P. et al., Ann.Transl.Med. **4** (2016): 173
- [0506] Eichhorst, B. F. et al., Blood **107** (2006): 885-891
- [0507] Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. **12** (2012): 1597-1611

- [0508] Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014): 716-737
- [0509] Estey, E. H., Am.J Hematol. **89** (2014): 1063-1081
- [0510] Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- [0511] Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- [0512] Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
- [0513] Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- [0514] Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. **31** (2009): 819-823
- [0515] Fuge, O. et al., Res Rep.Urol. **7** (2015): 65-79
- [0516] Furman, R. R. et al., N.Engl.J Med. **370** (2014): 997-1007
- [0517] Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med **2** (1996): 1096-1103
- [0518] Gandhi, A. V. et al., Ann Surg.Oncol **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- [0519] Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. **6** (2006): 383-393
- [0520] Giannopoulos, K. et al., Leukemia **24** (2010): 798-805
- [0521] Giannopoulos, K. et al., Int.J Oncol **29** (2006): 95-103
- [0522] Gnjjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867
- [0523] Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911
- [0524] Goede, V. et al., N.Engl.J Med. **370** (2014): 1101-1110
- [0525] Gonzalez-Cao, M. et al., Cancer Biol Med **13** (2016): 483-488
- [0526] Gragert, L. et al., Hum.Immunol. **74** (2013): 1313-1320
- [0527] Granziero, L. et al., Blood **97** (2001): 2777-2783
- [0528] Green, J. et al., Cochrane.Database.Syst.Rev (2005): CD002225
- [0529] Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)
- [0530] Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)
- [0531] Grivas, P. D. et al., Semin.Cancer Biol **35** (2015): 125-132
- [0532] Gunawardana, C. et al., Br.J Haematol. **142** (2008): 606-609
- [0533] Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
- [0534] Hallek, Michael et al., ASH Annual Meeting Abstracts **112** (2008): 325
- [0535] Harig, S. et al., Blood **98** (2001): 2999-3005
- [0536] Hinrichs, C. S. et al., Nat Biotechnol. **31** (2013): 999-1008
- [0537] Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376
- [0538] Horig, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **49** (2000): 504-514
- [0539] Hung, C. F. et al., Immunol.Rev **222** (2008): 43-69
- [0540] Hus, I. et al., Oncol Rep. **20** (2008): 443-451
- [0541] Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- [0542] Inoue, H. et al., Int.J Cancer **63** (1995): 523-526

- [0543] Jones, R. T. et al., Urol.Clin North Am. **43** (2016): 77-86
- [0544] Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- [0545] Kalos, M. et al., Sci.Transl.Med **3** (2011): 95ra73
- [0546] Kanthan, R. et al., J Oncol **2015** (2015): 967472
- [0547] Kassiotis, G. et al., Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol Sci. **372** (2017)
- [0548] Kaufman, H. L. et al., Clin Cancer Res. **14** (2008): 4843-4849
- [0549] Khoury, G. A. et al., Sci.Rep. **1** (2011)
- [0550] Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- [0551] Kimura, H. et al., Int.J Oncol **30** (2007): 171-179
- [0552] Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015a): 312-330
- [0553] Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015b): 312-330
- [0554] Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- [0555] Kono, K. et al., Cancer Sci. **100** (2009): 1502-1509
- [0556] Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002): 2123-2131
- [0557] Krieg, A. M., Nat.Rev Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- [0558] Krishnamurthy, J. et al., Clin Cancer Res **21** (2015): 3241-3251
- [0559] Kronenberger, K. et al., J Immunother. **31** (2008): 723-730
- [0560] Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- [0561] Laumont, C. M. et al., Cell Mol.Life Sci. **75** (2018): 607-621
- [0562] Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- [0563] Leitlinie Endometriumkarzinom, **032/034**, (2008)
- [0564] Leitlinie Magenkarzinom, **032-0090L**, (2012)
- [0565] Leitlinien fuer Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- [0566] Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015): 8-13
- [0567] Liang, Z. et al., Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi. **27** (2005): 534-537
- [0568] Liddy, N. et al., Nat.Med. **18** (2012): 980-987
- [0569] Liepe, J. et al., Science **354** (2016): 354-358
- [0570] Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med **162** (1985): 1745-1759
- [0571] Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. **359** (2008): 378-390
- [0572] Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- [0573] Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- [0574] Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- [0575] Lukka, H. et al., Clin Oncol (R Coll.Radiol.) **14** (2002): 203-212
- [0576] Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- [0577] Mantia-Smaldone, G. M. et al., Hum.Vaccin.Immunother. **8** (2012): 1179-1191
- [0578] Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644

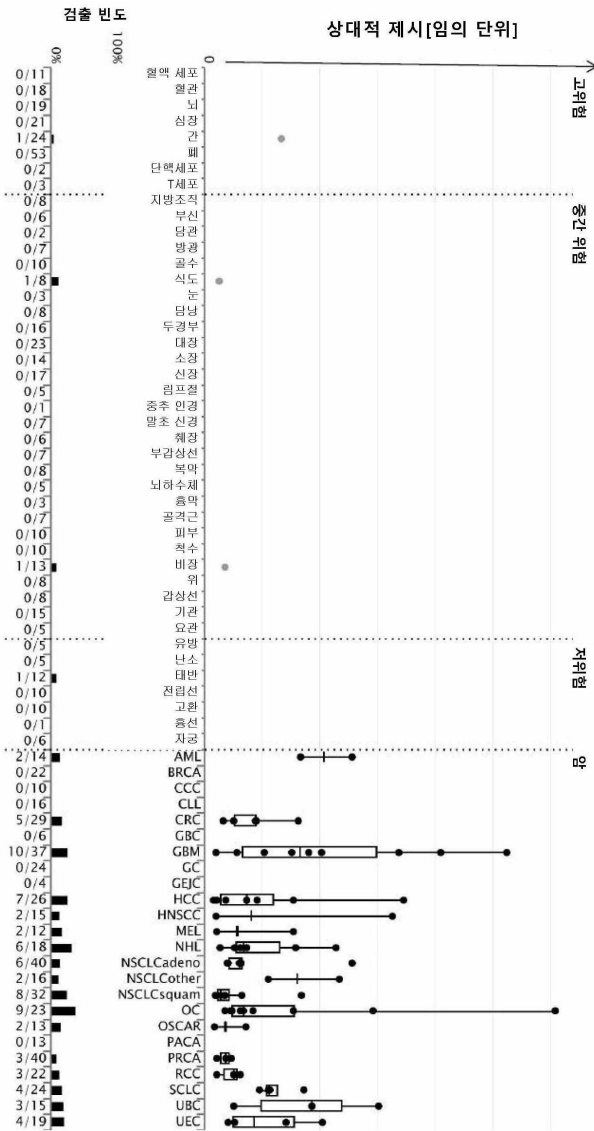
- [0579] Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* **41** (2015): 114-121
- [0580] Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 1657-1666
- [0581] Maus, M. V. et al., *Blood* **123** (2014): 2625-2635
- [0582] Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* **34** (2006): 44-53
- [0583] Mayr, C. et al., *Blood* **105** (2005): 1566-1573
- [0584] Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- [0585] Miyagi, Y. et al., *Clin.Cancer Res.* **7** (2001): 3950-3962
- [0586] Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* **83** (2008): 584-594
- [0587] Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- [0588] Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- [0589] Moulton, H. M. et al., *Clin Cancer Res.* **8** (2002): 2044-2051
- [0590] Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res.* **7** (2008): 51-61
- [0591] Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
- [0592] Muller, M. R. et al., *Blood* **103** (2004): 1763-1769
- [0593] Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- [0594] Nam, J. W. et al., *Mol.Cells* **39** (2016): 367-374
- [0595] National Cancer Institute, (6-5-2015), www.cancer.gov
- [0596] National Cancer Institute (NCI), (1-19-2011), <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/kidney/page3>
- [0597] Nilsen, T. W. et al., *Nature* **463** (2010): 457-463
- [0598] O'Brien, S. et al., *Lancet Oncol* **15** (2014): 48-58
- [0599] O'Leary, N. A. et al., *Nucleic Acids Res* **44** (2016): D733-D745
- [0600] Ohigashi, Y. et al., *Clin Cancer Res.* **11** (2005): 2947-2953
- [0601] Okuno, K. et al., *Exp.Ther.Med.* **2** (2011): 73-79
- [0602] Olexiouk, V. et al., *Nucleic Acids Res* **44** (2016): D324-D329
- [0603] Palma, M. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **57** (2008): 1705-1710
- [0604] Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009): 124-132
- [0605] Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* **14** (2012): 433-440
- [0606] Parikh, S. A. et al., *Blood* **118** (2011): 2062-2068
- [0607] Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 289-297
- [0608] Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- [0609] Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- [0610] Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- [0611] Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- [0612] Quillien, V. et al., *Anticancer Res.* **17** (1997): 387-391
- [0613] Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol* **33** (2015): 245-260

- [0614] Rakic, M. et al., *Hepatobiliary.Surg.Nutr.* **3** (2014): 221-226
- [0615] Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- [0616] Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002): 489-499
- [0617] Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333
- [0618] Richards, S. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **91** (1999): 861-868
- [0619] Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- [0620] Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- [0621] Robak, T. et al., *Expert.Opin.Biol.Ther* **14** (2014): 651-661
- [0622] Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- [0623] Rodenko, B. et al., *Nat.Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- [0624] Rouanne, M. et al., *Crit Rev Oncol Hematol.* **98** (2016): 106-115
- [0625] Rucki, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 2237-2246
- [0626] S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-0100L**, (2013)
- [0627] S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011a)
- [0628] S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011b)
- [0629] S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-0350L**, (2013)
- [0630] S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-0450L**, (2012)
- [0631] S3-Leitlinie Melanom, **032-0240L**, (2013)
- [0632] S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/0220L**, (2014)
- [0633] S3-Leitlinie Zervixkarzinom, **032/0330L**, (2014)
- [0634] Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- [0635] Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* **2** (2013): e26662
- [0636] Sangro, B. et al., *J Clin.Oncol.* **22** (2004): 1389-1397
- [0637] Schetelig, J. et al., *J Clin Oncol* **26** (2008): 5094-5100
- [0638] Schiavetti, F. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 5510-5516
- [0639] Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004): 1164-1170
- [0640] Schmitt, T. M. et al., *Hum.Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
- [0641] Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
- [0642] Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- [0643] Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- [0644] Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* **10** (2004): 1146-1151
- [0645] Showel, M. M. et al., *F1000Prime.Rep.* **6** (2014): 96
- [0646] Siegel, S. et al., *Blood* **102** (2003): 4416-4423
- [0647] Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* **85** (2013): 9536-9542
- [0648] Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- [0649] Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094

- [0650] Spaner, D. E. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **54** (2005): 635-646
- [0651] Srivastava, N. et al., *Cancer Manag.Res.* **6** (2014): 279-289
- [0652] Stahl, M. et al., *Ann.Oncol.* **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- [0653] Steinberg, R. L. et al., *Urol.Oncol* (2016a)
- [0654] Steinberg, R. L. et al., *Urol.Oncol* (2016b)
- [0655] Stevanovic, S. et al., *J Clin Oncol* **33** (2015): 1543-1550
- [0656] Stintzing, S., *F1000Prime.Rep.* **6** (2014): 108
- [0657] Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* **9** (2008): 163
- [0658] Su, Z. et al., *Cancer Res.* **63** (2003): 2127-2133
- [0659] Subramanian, R. P. et al., *Retrovirology.* **8** (2011): 90
- [0660] Takayama, T. et al., *Cancer* **68** (1991): 2391-2396
- [0661] Takayama, T. et al., *Lancet* **356** (2000): 802-807
- [0662] Tanaka, F. et al., *Int.J Oncol* **10** (1997): 1113-1117
- [0663] Teufel, R. et al., *Cell Mol.Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- [0664] Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **23** (2014): 1985-1996
- [0665] Toh, U. et al., *Int.J Clin Oncol* **7** (2002): 372-375
- [0666] Toh, U. et al., *Clin Cancer Res.* **6** (2000): 4663-4673
- [0667] Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 32-42
- [0668] Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- [0669] Vanderperre, B. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e70698
- [0670] Vici, P. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **33** (2014): 29
- [0671] Von Hoff, D. D. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 1691-1703
- [0672] von Rundstedt, F. C. et al., *Transl.Androl Urol.* **4** (2015): 244-253
- [0673] Walter, S. et al., *J.Immunol.* **171** (2003): 4974-4978
- [0674] Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- [0675] Wang, N. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **283** (2011): 103-108
- [0676] Wierda, W. G. et al., *Blood* **118** (2011): 5126-5129
- [0677] Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004): 7099-7109
- [0678] Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- [0679] Wilson, P. M. et al., *Nat Rev.Clin Oncol* **11** (2014): 282-298
- [0680] Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- [0681] World Cancer Report, (2014)
- [0682] World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>
- [0683] Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- [0684] Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892.

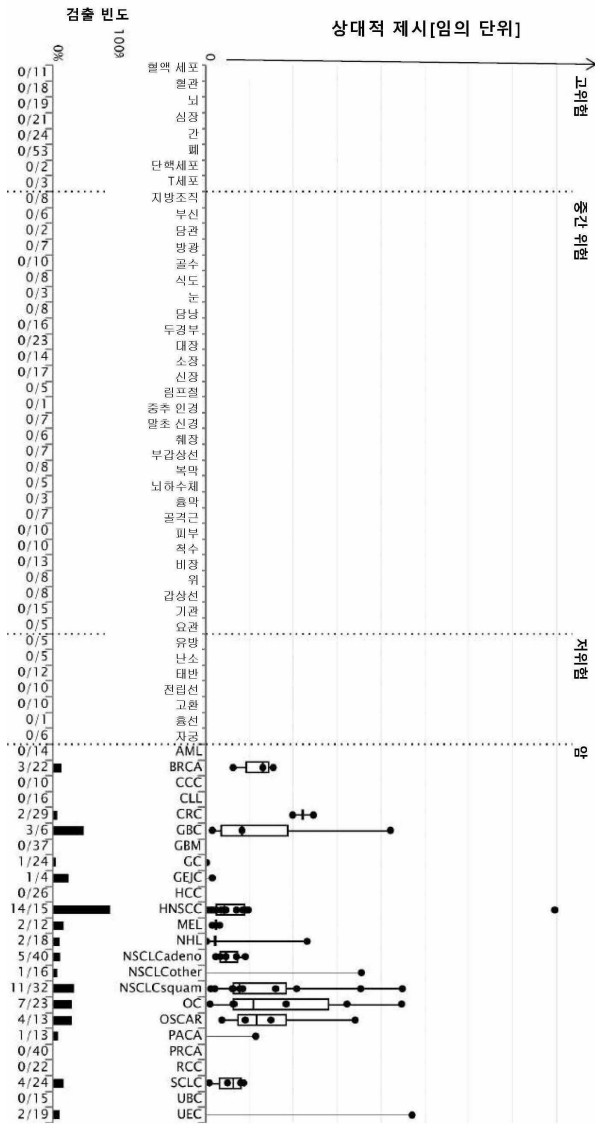
도면

도면1a



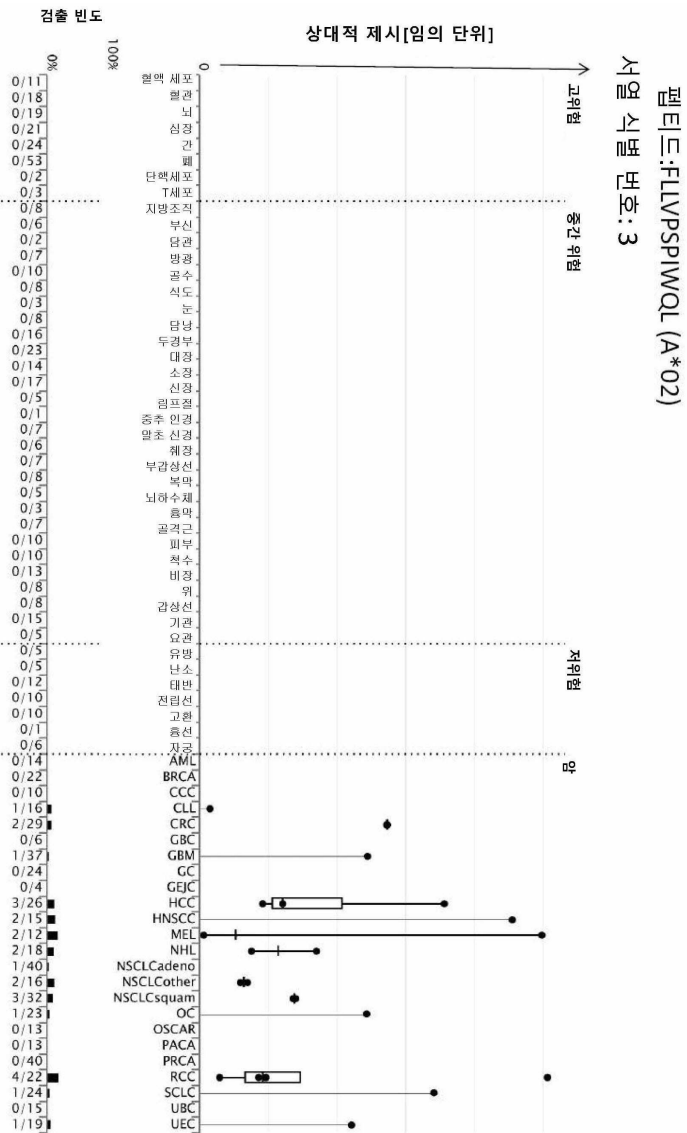
팜티드: KLDFSTR1 (A*02)
 서열 식별 번호: 1

도면1b

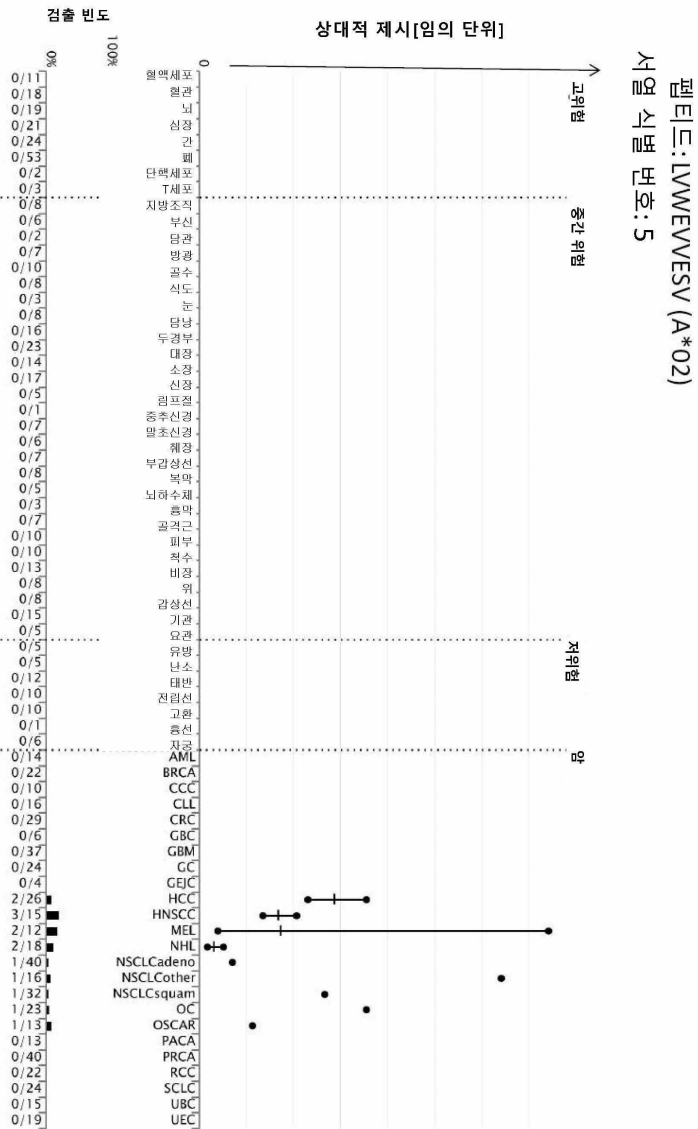


필터드: ALDVLVKL (A*02)
시열 식별 번호: 2

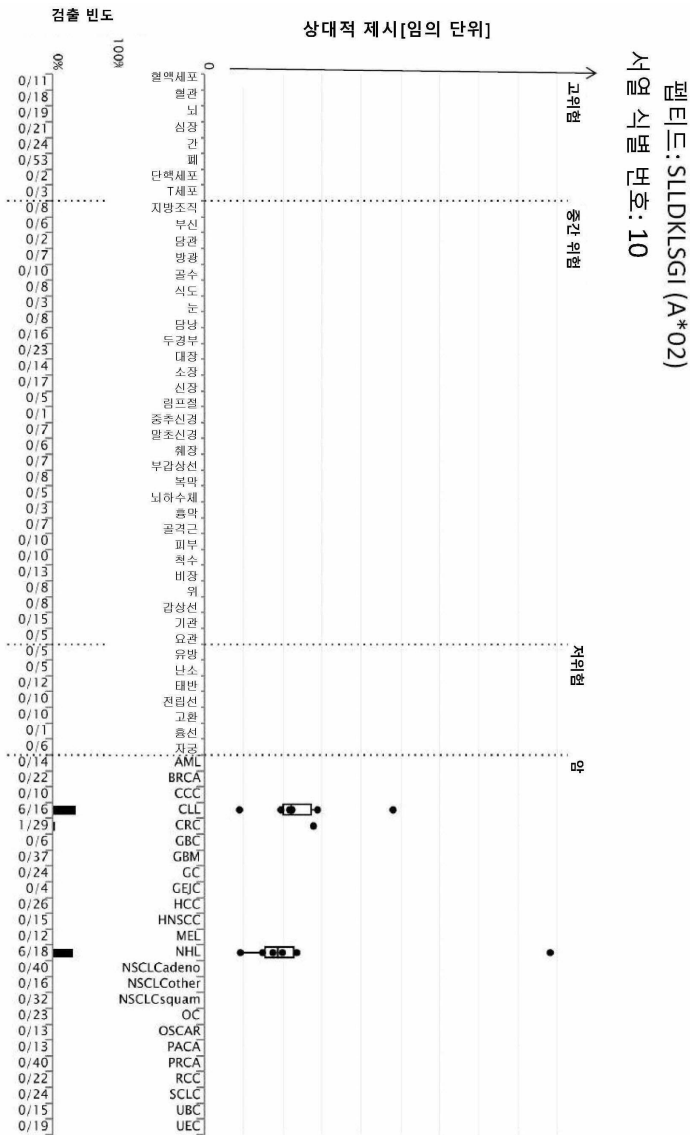
도면1c



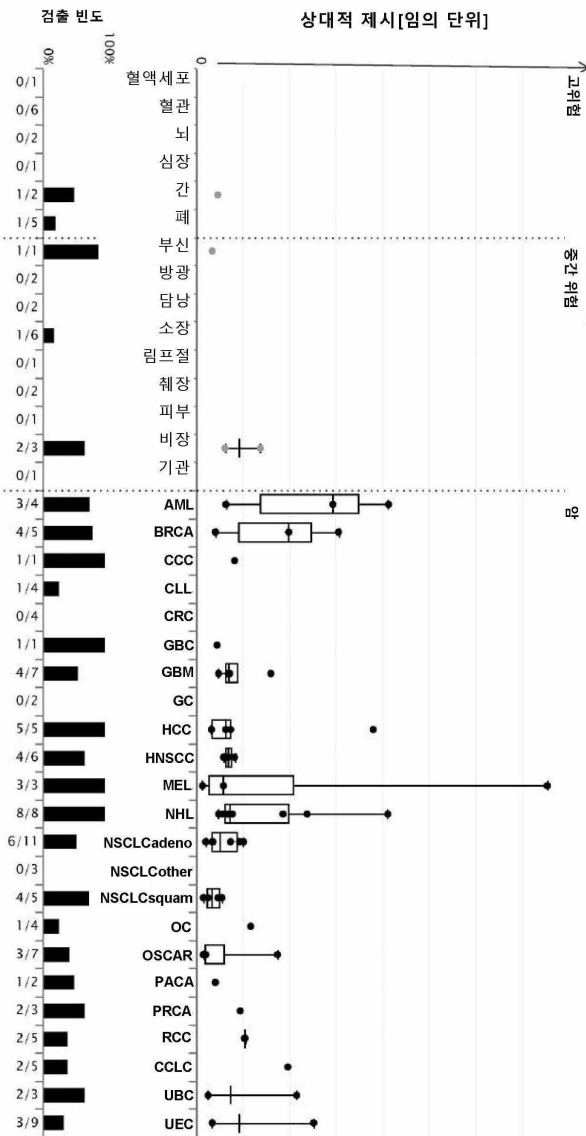
도면1d



도면1e

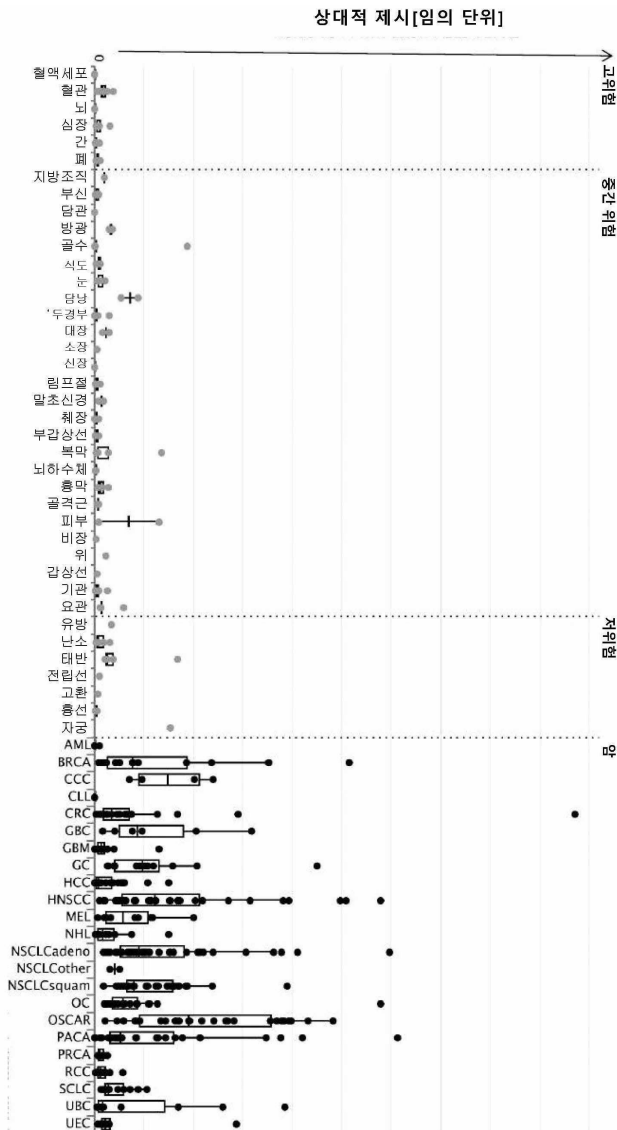


도면1f



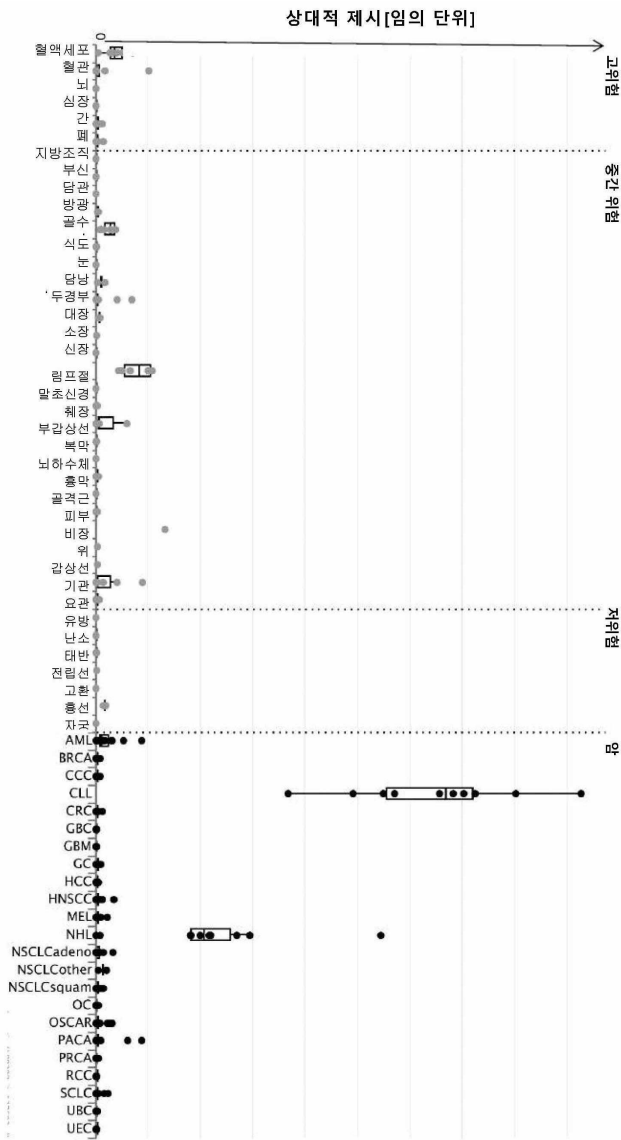
패티드: SLGAAVPEPK (A*03)
 시열 식별 번호: 81

도면2a



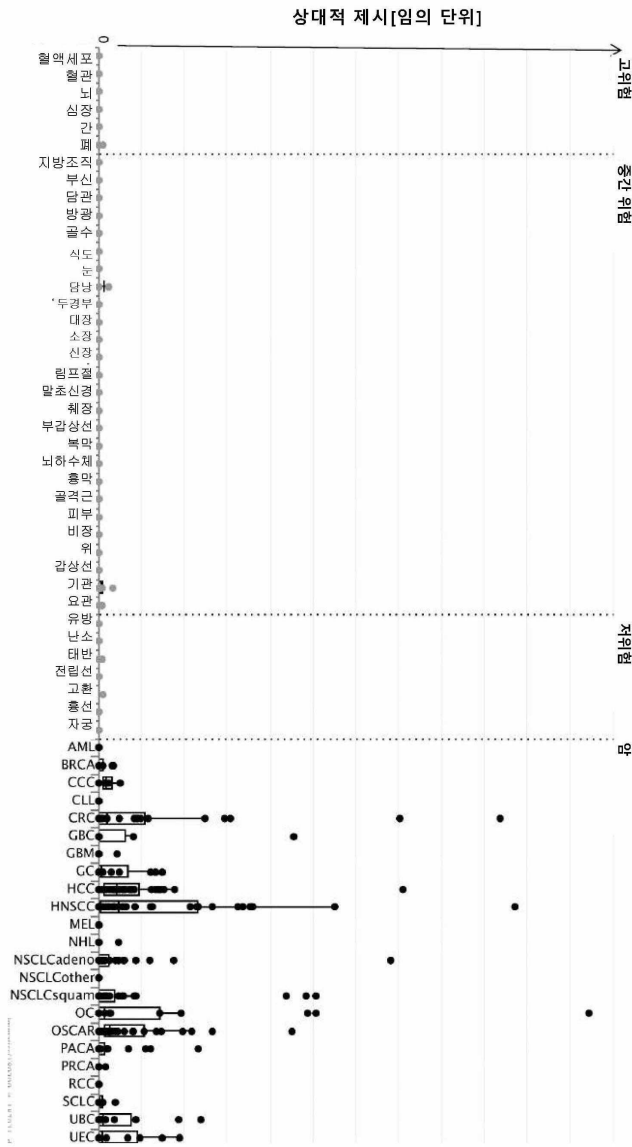
양상별 ID: ENST00000225964
 펩티드: ALDYLKLVK
 시열 식별 번호: 2

도면2b



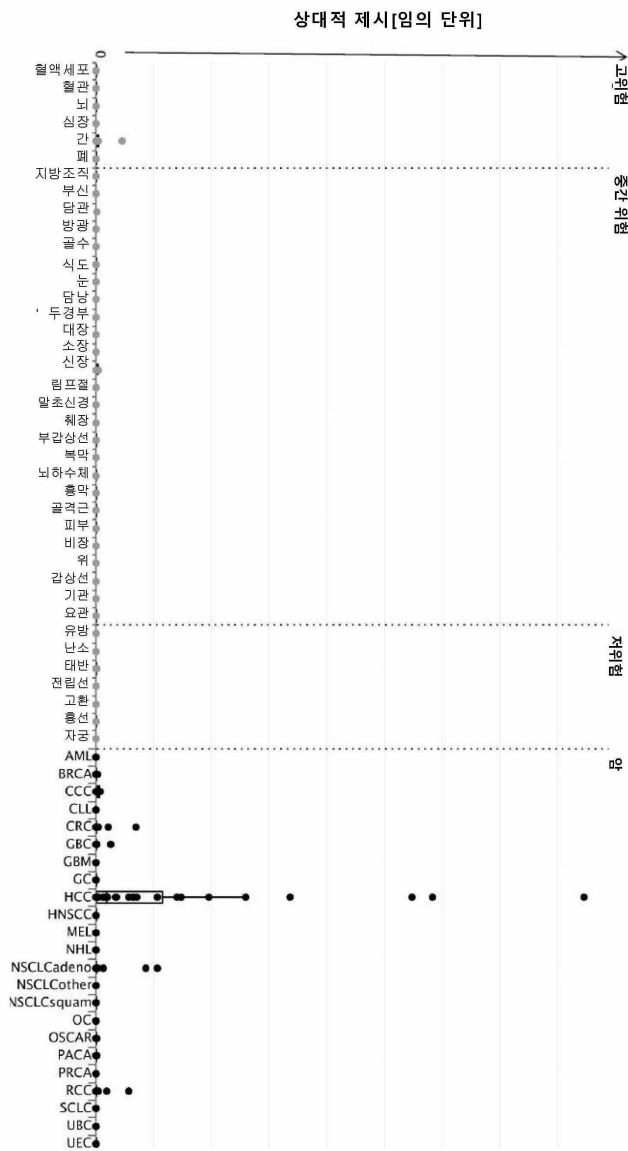
양상블 ID: ENST00000374472
 펩티드: SLDKLSGI
 시연 식별 번호: 10

도면2d



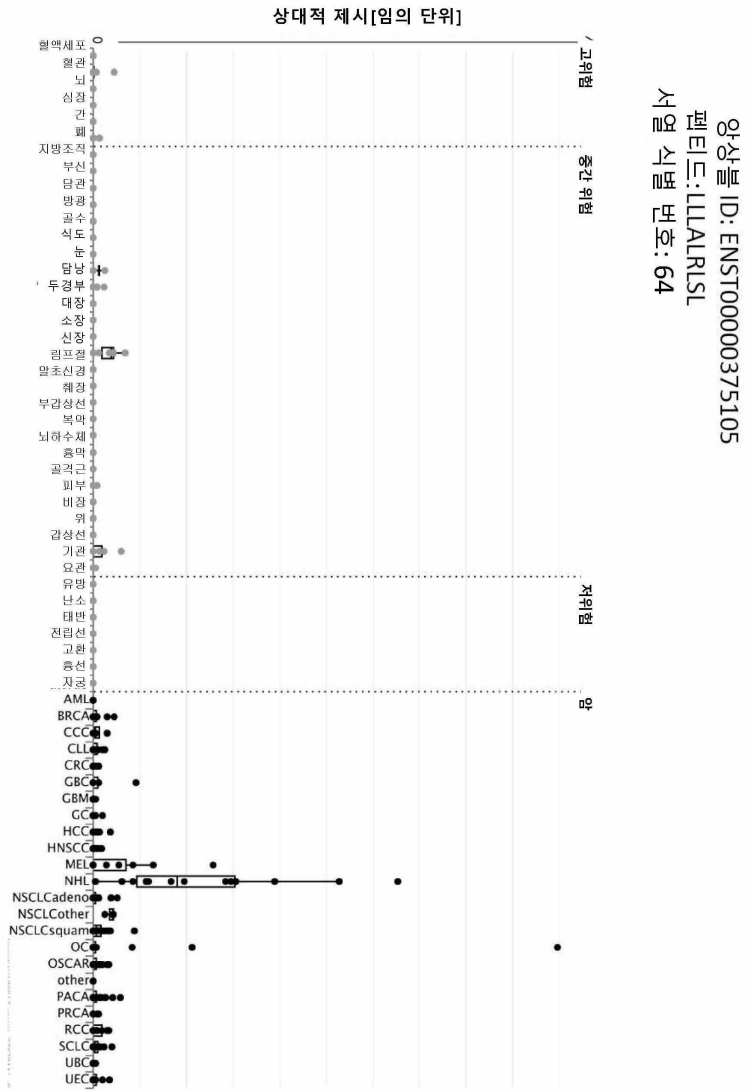
양상블 ID: ENST00000603198
 펩티드: YVEDEVRL
 서열 식별 번호: 39

도면2f

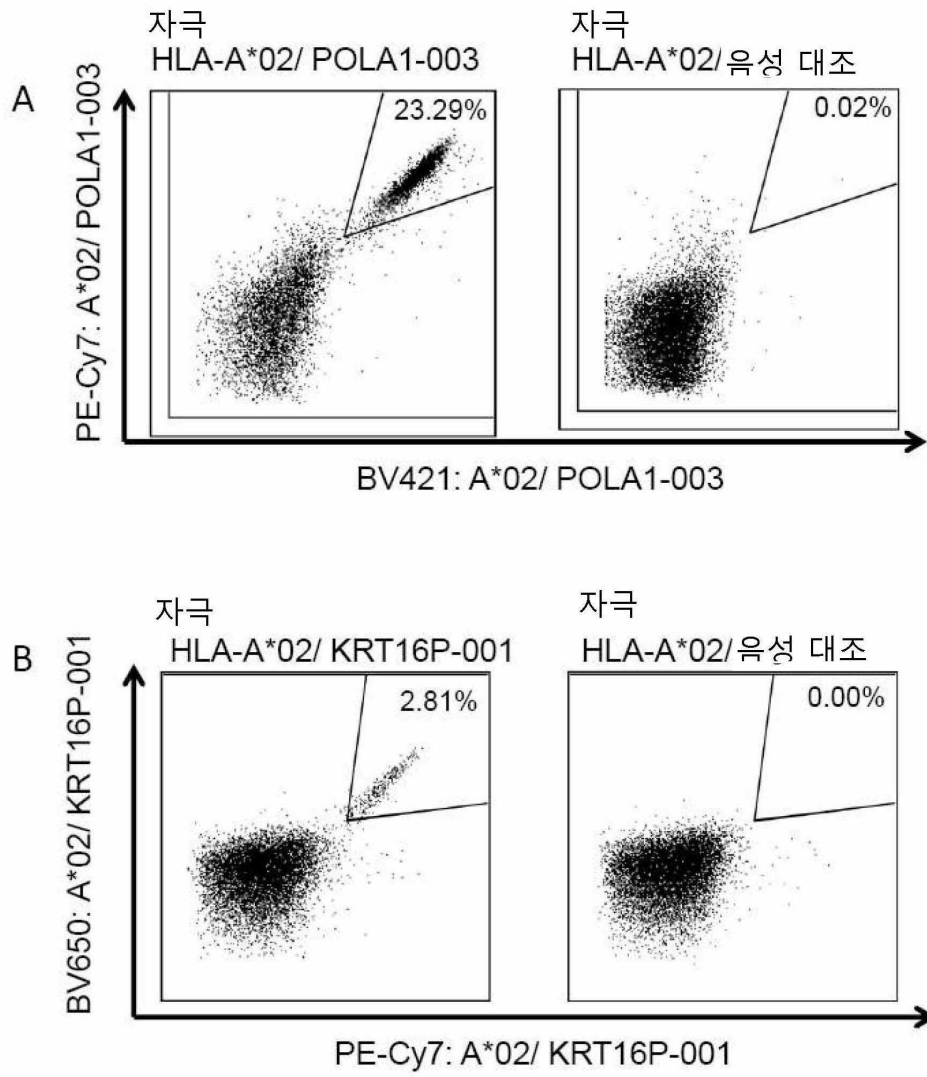


양상본 ID: ENST00000473984
 펩티드: IAISQTFV
 시열 식별 번호: 65

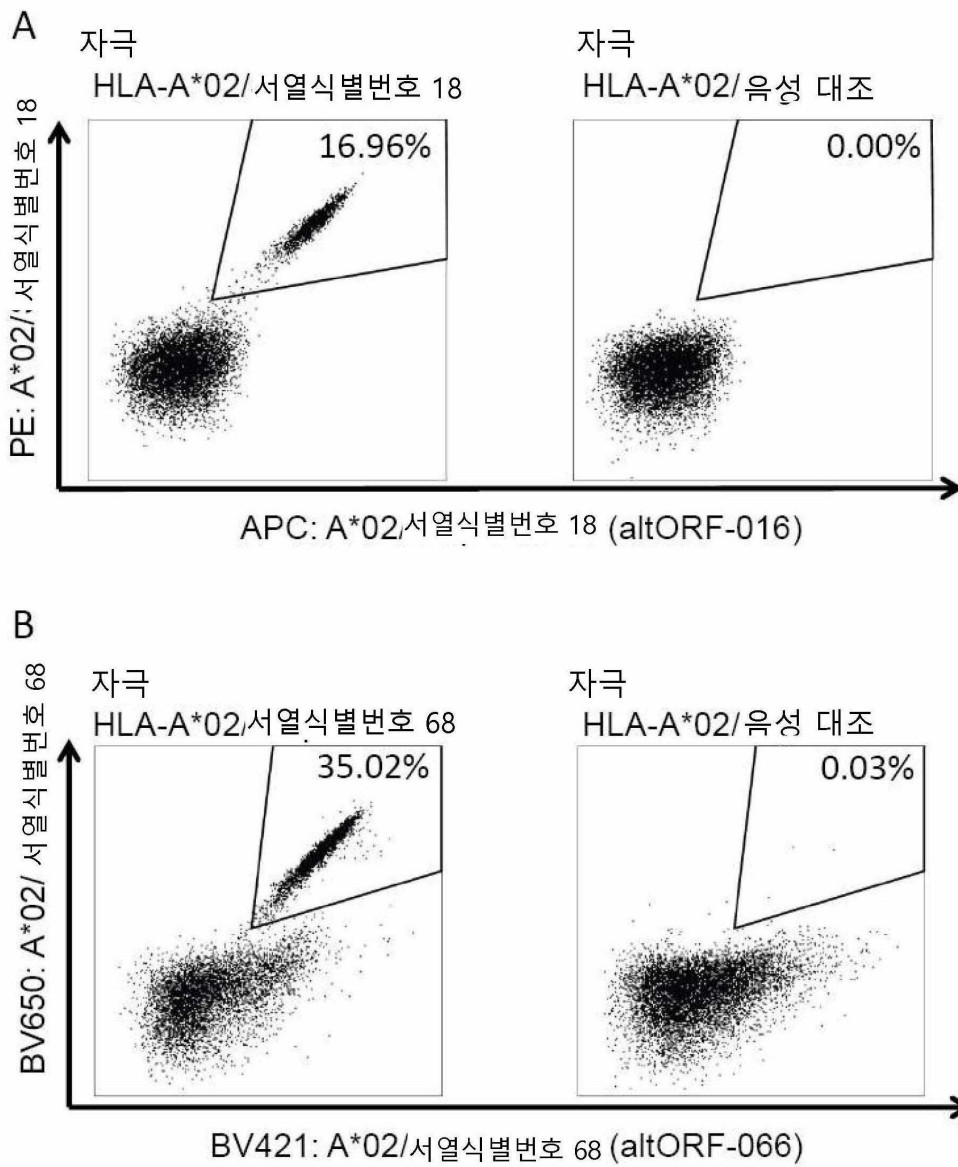
도면2g



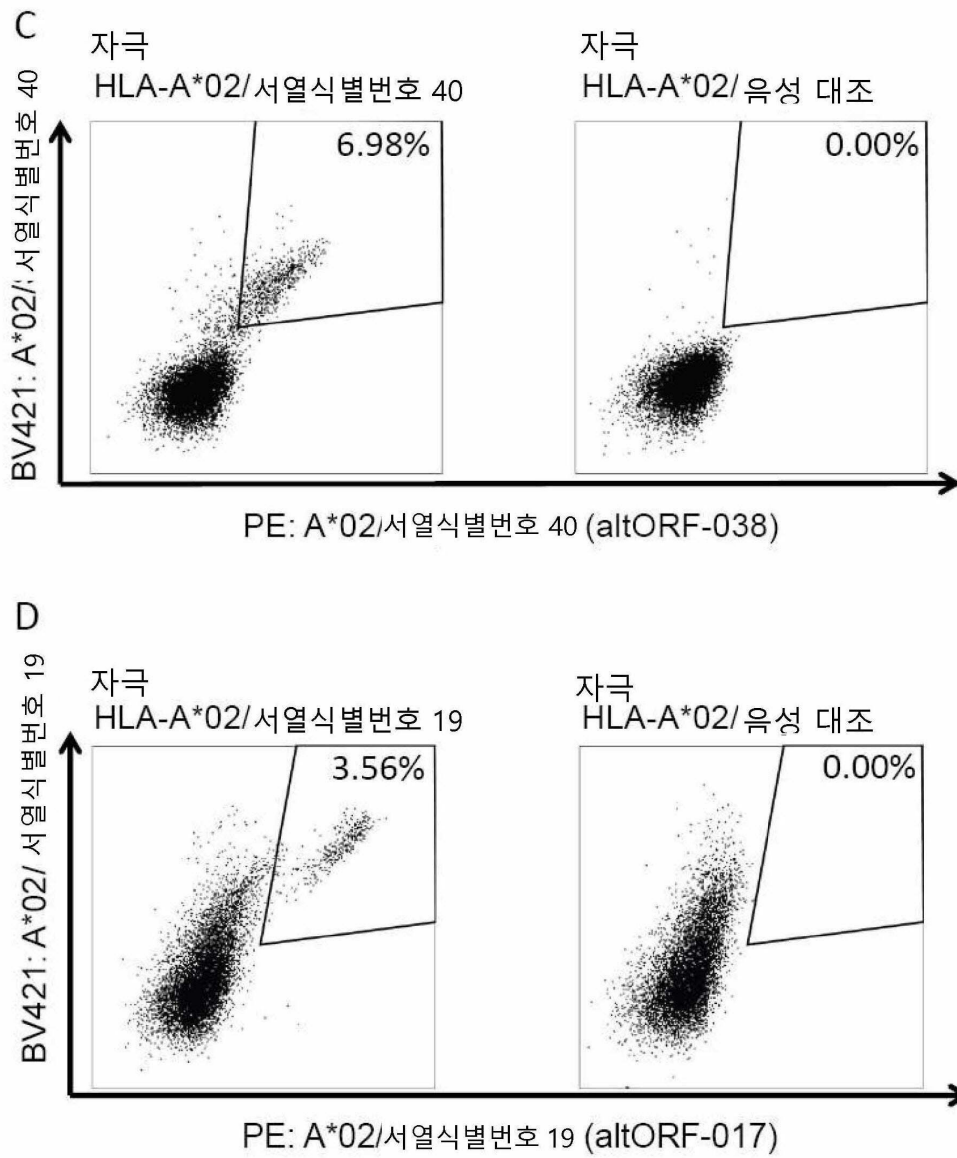
도면3



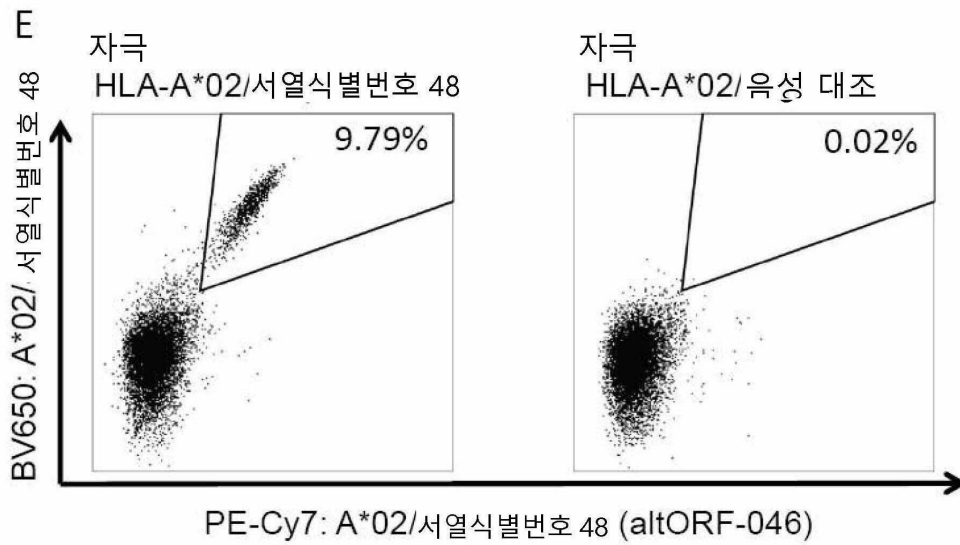
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatix Biotechnologies GmbH

<120> Peptides and combination of peptides of non-canonical origin for use in immunotherapy against different types of cancers

<130> I33148W0

<140> PCT/EP2019/053168

<141> 2019-02-08

<150> US 62/633,325

<151> 2018-02-21

<150> DE 10 2018 103 944.1

<151> 2018-02-21

<150> DE 10 2018 107 224.4

<151> 2018-03-27

<160> 105

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Leu Asp Phe Ser Thr Arg Ile

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Leu Leu Asp Val Leu Val Lys Leu

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Leu Leu Val Pro Ser Pro Ile Trp Gln Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Leu Gly Asp Ser His Val Leu Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Val Trp Glu Val Val Glu Ser Val

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu His Asp Ser Pro Val Tyr Leu

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Trp Glu Glu Val Lys Ala Thr Ser Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 8

Ile Leu Gln Ser Leu Val Pro Ala Ala

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Gln Glu Gly Asp Leu Ile Ser Val

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Leu Leu Asp Lys Leu Ser Gly Ile

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Leu Leu Pro His Ala Pro Glu Ala Val

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

His Leu Asp Ser Met Asn Val Ser Ile

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Leu Asp Glu Gly Ser Leu Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

15

Asn Leu Val Met Pro Leu Leu His Ile

1 5

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Leu Leu Asp Ala Glu Gln Ser Pro Val Ala Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Leu Trp Asp Leu Arg Pro Ser Ser Leu Ile

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Met Met Thr Phe Phe Gln Gly Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Leu Leu Pro Trp Leu Pro Lys Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val Leu Ile Ser Leu Pro Gly Lys Val

1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Phe Val Phe Ile Ser Pro Ser Phe Leu

1 5
<210> 22
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 22
Ser Leu Tyr Asp Val Pro Val Gly Ala

1 5
<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Gly Leu Glu Val Leu Asp Ala Leu Leu

1 5
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24
Thr Leu Thr Ser Leu Asn Ile Leu Leu

1 5
<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25

Ile Ser Val Leu Asn Leu Ser Ala Ile

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Lys Leu Trp Thr Ser Leu Val Asn Leu

1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ile Ala Ala Gly Val Pro Asn Thr Asp Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Gln Leu Glu Lys Pro Glu Thr Ala

1 5

<210> 29

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Leu Trp Glu Phe Pro Ser Met Ala

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Leu Leu Arg Leu Thr Leu Leu Pro Leu

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Val Leu Pro Ile Val Ile Thr Leu

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Leu Ser Val Ser Ala Val Leu Gly Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Ala Ser Glu Arg Pro Pro Ser Val

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Leu Leu Asn Val Glu Pro Ala Gly Ala

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu Leu Asn Ser Asn Tyr Pro Val

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Gln Val Thr Arg Thr Thr Gly Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Lys Ile Leu Asp Glu Phe Tyr Asn Val

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ser Leu Ser Ala Trp Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Ile Tyr Glu Asp Glu Val Arg Leu

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Phe Thr Leu Pro Phe Leu Val Asn Leu

1 5

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Met Ala Ser Glu Gly Ile Trp Glu Ser Ser Leu

1 5 10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Ile Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ile Trp Ser Thr Ile Leu Ile Ala

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Trp Leu Ile Pro Arg Gln Leu Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Leu Tyr His Gln Ser Pro Leu Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Met Val Glu Ile Ile Pro Lys Val

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Leu Leu Pro Gly Val Pro Gly Leu

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Leu Ala Glu Ile His Pro Lys Ala

1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Phe Leu Trp Asp Pro Arg Asp Val Val Leu

1 5 10

<210> 50

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Leu Ala Ser Tyr Leu Asp Arg Val

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Leu Leu Thr Gln Val His Ile Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Ala Phe Val Ser His Val Leu Ile

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Thr Ile Ser Ile Ser Leu Ser Ser Val

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Leu Ser Pro Asp Gln Val Phe Leu

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Val Gln Gln Glu Lys Leu Phe Val

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ile Ile Thr Asn Leu Ile Val Asn Ile

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Tyr Val Leu Met Thr Ser Leu Leu Leu

1 5

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Met Ile Ile Ser His Arg Ala Leu Glu Leu

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Ala Ala Ser Thr Thr Phe Leu Gly Val

1 5 10

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Glu Asn Leu

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Val Leu Pro Trp Gln Pro Leu Leu Leu

1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Leu Leu Gly Lys Pro Gly Leu Thr Ile

1 5 10

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Leu Ser Phe Lys Arg Ser Leu Ser Ile

1 5

<210> 64

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Leu Leu Ala Leu Arg Leu Ser Leu

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ile Ala Ile Ser Gln Leu Thr Phe Val

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ile Leu Asn Glu Leu Leu Asn Ser Ile

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Leu Lys Glu Leu Met Gly Pro Ala

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Lys Leu Leu Ala Asp Ala Phe Lys Val

1 5
<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 69
Leu Leu Cys Pro Val Val Leu Gln Leu

1 5
<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 70
Leu Leu Leu Gln Ile Glu Pro Ala Ala

1 5
<210> 71
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 71
Trp Leu Met Pro Val Met Pro Ala Leu

1 5
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 72
Tyr Leu Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu

1 5
<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73

Ser Thr Thr Ile Ile Asn Leu Ile Leu

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Leu Leu Ser Tyr Ser Ile Pro Leu

1 5

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Thr Gln Glu Ala Glu Lys Leu Leu Glu Arg

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Thr Glu Gln Gly Pro Thr Gly Val Thr Met

1 5 10

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Val Pro Ala Gly Val Asp Val Ile Thr Glu Tyr

1 5 10

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Leu Leu Pro Pro Val Arg Ala Met

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Lys Ile Gln Asp Pro Gly Thr Ala Phe

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Arg Asp Gln Ile Val Thr Val Ser Val

1 5

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Leu Leu Gly Ala Ala Thr Val Glu Pro Pro Lys

1 5 10

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Leu Ala Pro Gln Met Ile Ile Ala Leu

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Lys Pro Arg Gly Pro Thr Pro Leu

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Leu Cys Pro Ala Ala Pro Ser Glu Lys

1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Val Tyr Leu Leu Thr Phe Pro Pro Leu

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Met Ile Gly Lys Arg Ile Leu

1 5

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Asn Leu Val Ser Glu Thr Glu Ala Met Val Lys

1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Asp Glu Gln Glu Thr Asp Ala Phe Leu Leu

1 5 10

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Ile Phe Tyr Val Leu Gln Lys

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Tyr Leu Arg Asp Phe Lys Ile Lys Arg

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Ser Ser His Phe Ile Leu Val Thr Phe

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 92

Glu Leu Val Ala Val Thr Ser Val Leu

1 5
<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 93
Trp Gln Lys Asn Ser Met Arg Leu

1 5
<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 94
Met Gly Arg Arg Arg Asn Leu Tyr

1 5
<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 95
Gln Val Lys Ile Val Thr Leu Leu

1 5
<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 96
Lys Ile Ile Glu Asp Leu Ala Asn Thr Val

1 5 10
<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 97

Gly Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Ser Leu Met Glu Val Thr His Asp Leu

1 5

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Ala Leu Met Asp Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Leu Gly Pro Pro Pro Val Gly Val

1 5

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Lys Leu Pro Glu Gly His Leu Pro Glu Val

1 5 10

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Leu Asp Pro Thr Gln Phe Arg Val

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Leu Val Ser Tyr Leu Asp Lys Val

1 5

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile

1 5