



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0040106
(43) 공개일자 2021년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7006095
(22) 출원일자(국제) 2019년08월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2019/030117
(87) 국제공개번호 WO 2020/027239
국제공개일자 2020년02월06일
(30) 우선권주장
JP-P-2018-145607 2018년08월02일 일본(JP)

(71) 출원인
온코세라피 사이언스 가부시키가이샤
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쓰구,
사카도 3쵸메 2-1
(72) 발명자
야마시타, 사치코
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쓰구,
사카도 3쵸메 2-1, 온코세라피 사이언스 가부시키
가이샤 나이
히키치, 테츠로
일본, 가나가와 213-0012, 가와사키시, 다카쓰구,
사카도 3쵸메 2-1, 온코세라피 사이언스 가부시키
가이샤 나이
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 CDCA1유래 펩타이드 및 이를 포함하는 백신

(57) 요약

본 발명은 세포 독성 T 세포 유도능을 갖는 CDCA1 유래의 에피토프 펩타이드를 제공한다. 본 발명은 또한, 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드, 해당 펩타이드를 제시하는 항원 제시 세포 및 해당 펩타이드를 표적으로 하는 세포 독성 T 세포, 및 해당 항원 제시 세포 또는 상기 CTL을 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명은 나아가 이들을 유효 성분으로 포함하는 조성물 및 약학적 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, 항원 제시 세포, 세포 독성 T 세포 또는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 암을 치료 및 / 또는 예방하는 및 / 또는 수술 후 이의 재발을 예방하는 방법을 제공한다. 또한 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/00 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 세포 독성 T 세포(CTL) 유도능을 갖는 15 아미노산 미만의 펩타이드:

- (a) 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열; 및
- (b) 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열에 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 아미노산 서열.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호: 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열에 대해, 다음의 (a) 내지 (c)에서 선택되는 1 이상의 치환된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드:

- (a) N 말단에서 2 번째의 아미노산이 트레오닌 및 세린으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 치환됨;
- (b) N 말단에서 3 번째의 아미노산이 아스파르트산 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 치환됨; 및
- (c) C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환됨.

청구항 3

제1항에 있어서,

서열 번호: 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항의 어느 한 항의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드.

청구항 5

약학적으로 허용되는 담체와 다음의 (a) 내지 (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 포함하는 조성물:

- (a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 1 종류 또는 여러 종의 펩타이드;
- (b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종의 폴리 뉴클레오티드;
- (c) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드 및 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- (d) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드 및 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소좀; 및

(e) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 성분이 다음의 (a) 내지 (d)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분이며, CTL을 유도하기 위한 조성물:

- (a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 1 종류 또는 여러 종의 펩타이드;
- (b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종의 폴리뉴클레오티드;
- (c) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포 (APC); 및
- (d) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소솜.

청구항 7

제5항에 있어서,

약학적 조성물인, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

(i) 암의 치료, (ii) 암 예방, 및 (iii) 암의 수술 후의 재발의 예방으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 용도를 위한, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

암에 대한 면역 반응을 유도하기 위한, 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

암이 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연부조직종양 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는, 조성물.

청구항 11

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

HLA-A01 양성인 대상에 투여를 위해 제제화된, 조성물.

청구항 12

다음으로 이루어진 군에서 선택되는 단계를 포함하는 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는 방법:

- (a) APC를, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 시험관 내, 생체 밖 또는 생체 내에서 접촉시키는 단계, 및
- (b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하는 단계.

청구항 13

다음으로 이루어진 군에서 선택되는 단계를 포함하는 CTL을 유도하는 방법:

- (a) CD8 양성 T 세포를, HLA 항원과 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC와 공동 배양하는 단계;
- (b) CD8 양성 T 세포를, HLA 항원과 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀과 공동 배양하는 단계, 및
- (c) 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드에 결합할 수 있는 T 세포 수용체(TCR)의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 CD8 양성 T 세포에 도입하는 단계.

청구항 14

HLA 항원과 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC.

청구항 15

제14항에 있어서,

제12항의 방법에 의해 유도되는 APC.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.

청구항 17

제16항에 있어서,

제13항에 기재된 방법에 의해 유도되는 CTL.

청구항 18

다음의 (a) 내지 (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법:

- (a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 1종류 또는 여러 종의 펩타이드;
- (b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종의 폴리

뉴클레오타이드;

(c) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 항원 제시 세포(APC);

(d) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 엑소솜; 및

(e) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.

청구항 19

다음의 (a) 내지 (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료 및 / 또는 예방하는, 및 / 또는 수술 후 이의 재발을 예방하는 방법:

(a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 1종류 또는 여러 종의 펩타이드;

(b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종의 폴리뉴클레오타이드;

(c) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 항원 제시 세포 (APC);

(d) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 엑소솜; 및

(e) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 펩타이드에 결합하는 항체.

청구항 21

CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 스크리닝하는 방법으로서 다음의 단계를 포함하는 방법:

(a) 서열 번호: 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 원래의 아미노산 서열에 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 후보 서열을 작성하는 단계;

(b) (a)에서 작성한 후보 서열 중에서 CDCA1 이외의 어떠한 공지의 인간 유전자 산물과도 유의한 상동성(서열 동일성)을 갖지 않는 후보 서열을 선택하는 단계;

(c) (b)에서 선택된 후보 서열로 이루어진 펩타이드와 APC를 접촉시키는 단계;

(d) (c)의 APC와 CD8 양성 T 세포를 접촉시키는 단계; 및

(e) 원래의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드보다 동등하거나 더 높은 CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 선택하는 단계.

청구항 22

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드, 수용성의 담체 및 유성 아조반트를 포함하는 에멀전.

청구항 23

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물이 수용되어 있는 용기 및 아쥘반트가 수용되어 있는 용기를 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물 과학 분야, 보다 구체적으로는 암 치료 분야에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암 백신으로 유효한 신규 펩타이드, 해당 펩타이드를 이용한 암 치료 및 예방 중 하나 또는 둘 다를 위한 방법, 및 해당 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte : CTL)는 종양 세포 표면에 발현하는 주조직적합복합체(Major histocompatibility complex : MHC) 클래스 I 분자상에 제시되는 종양 관련 항원(tumor-associated antigen : TAA) 유래의 에피토프 펩타이드를 인식하고, 이어서 종양 세포를 살상하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 멜라노마 항원(MAGE) 패밀리를 비롯한 많은 TAA가 면역학적 접근에 의해 발견되어 왔다(비특허문헌 1 : Boon T, Int J Cancer 1993, 54 (2) : 177-80; 비특허문헌 2 : Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183 (3) : 725-9). 이러한 TAA를 표적으로 하는 면역 요법이 현재 임상 개발 과정에 있다.

[0003] 여러 TAA에서 CTL에 인식될 수 있는 에피토프 펩타이드가 동정되었으며, 다양한 암종에 대한 면역 요법에의 응용이 기대되고 있다(비특허문헌 3 : Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88 (20) : 1442-55; 비특허문헌 4 : Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59 (13) : 3134-42; 비특허문헌 5 : Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59 (21) : 5554-9; 비특허문헌 6 : van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156 (9) 3308-14; 비특허문헌 7 : Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57 (20) : 4465-8; 비특허문헌 8 : Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80 (2) : 169-72; 비특허문헌 9 : Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81 (3) : 459-66; 비특허문헌 10 : Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81 (3) : 387-94). 현재까지 이러한 TAA 유래 CTL 에피토프 펩타이드를 사용한 암 면역 요법의 임상 시험이 일부 보고되고 있지만, 불행히도 많은 임상 시험에서 반응률은 결코 높은 것이 아니다(비특허문헌 11 : Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20 (20) : 4169-80; 비특허문헌 12 : Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188 : 33-42; 비특허문헌 13 : Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10 (9) : 909-15). 따라서, 암 면역 치료에 적용 가능한 신규 에피토프 펩타이드의 동정이 여전히 필요하다.

[0004] CDCA1(세포 분열주기 관련물 1(cell division cycle associated 1); NUF2, NDC80 동원체 복합체 구성 요소(NUF2, NDC80 kinetochore complex component) : Nuf2라고도 기재된다.; 참조 배열 : GeneBank 엑세션 번호 NM_145697 (서열 번호 : 44) 또는 GeneBank 엑세션 번호 NM_031423 (서열 번호 : 46))는 CDC2, 사이클린, 토포 아이소머레이즈 II 및 다른 세포주기 유전자와 공동 발현하는 유전자의 일원으로 동정되었다(비특허문헌 14 : Walker et al., Curr Cancer Drug Targets 2001, 1 (1) : 73-83). CDCA1는 유사 분열중인 Hela 세포의 중심체와 관련이 있는 것이 발견되었으며, 효모 Nuf2의 기능적 상동체로 생각된다(비특허문헌 15 : Wigge PA et al., J Cell Biol 2001 152 (2) : 349-60). 한편, CDCA1는 27,648 개의 유전자를 대상으로 한 게놈와이드 cDNA 마이크로어레이에 기반한 유전자 발현 프로파일을 통해 비소세포폐암에서 발현의 향진이 인정되는 유전자로 동정되었다(비특허문헌 16 : Hayama et al., Cancer Res 2006, 66 (21) : 10339-48; 특허문헌 1 : WO2007 / 013480; 특허문헌 2 : WO2005 / 089735). 폐암 조직 및 폐암 세포주에서 CDCA1의 발현이 인정되는 한편, 정소를 제외한 22의 정상 조직에는 거의 발현이 인정되지 않는다(비특허문헌 16; 특허문헌 1). 또한 siRNA에 의한 CDCA1의 발현 억제의 결과, CDCA1을 발현하는 폐암 세포주에서 세포 증식 억제가 일어난다(비특허문헌 16; 특허 문헌 1-2). 또한 CDCA1의 발현 향진은 담관세포암, 방광암, 신장세포암 등 다양한 암종에서도 인정 받고 있다(비특허문헌 17 : Harao M et al., Int J Cancer 2008, 123 (11) : 2616-25).

[0005] 최근에는 CDCA1 유래의 HLA-A02 제한적인 CTL 에피토프 펩타이드(비특허문헌 17 : Harao et al., Int J Cancer 2008, 123 (11) : 2616-25; 특허문헌 3 : WO2009 / 025117), HLA -A24 제한적인 CTL 에피토프 펩타이드(특허문헌 4 : WO2009 / 153992), HLA-A11 제한적인 CTL 에피토프 펩타이드(특허 문헌 5 : WO2016 / 021508), HLA-A33

제한적인 CTL 에피토프 펩타이드(특허 문헌 5 : WO2016 / 021508) 및 HLA-A03 제한적인 CTL 에피토프 펩타이드(특허 문헌 5 : WO2016 / 021508)가 동정되고 있다. 이러한 펩타이드에 의한 치료 효과는 HLA-A02 형, HLA-A24 형, HLA-A11 형, HLA-A33 형 또는 HLA-A03 형을 가진 암 환자에서 기대할 수 있지만, 그 이외의 HLA 형을 가진 암 환자에 있어서는 각 HLA 형에 따른 펩타이드가 바람직하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006]

- (특허문헌 0001) WO2007/013480
- (특허문헌 0002) WO2005/089735
- (특허문헌 0003) WO2009/025117
- (특허문헌 0004) WO2009/153992
- (특허문헌 0005) WO2016/021508

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2):177-80
- (비특허문헌 0002) Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183(3):725-9
- (비특허문헌 0003) Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20):1442-55
- (비특허문헌 0004) Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59(13):3134-42
- (비특허문헌 0005) Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59(21):5554-9
- (비특허문헌 0006) van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156(9):3308-14
- (비특허문헌 0007) Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20):4465-8
- (비특허문헌 0008) Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2):169-72
- (비특허문헌 0009) Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):459-66
- (비특허문헌 0010) Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):387-94
- (비특허문헌 0011) Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20):4169-80
- (비특허문헌 0012) Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188:33-42
- (비특허문헌 0013) Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9):909-15
- (비특허문헌 0014) Walker et al., Curr Cancer Drug Targets 2001,1(1):73-83
- (비특허문헌 0015) Wigge PA et al., J Cell Biol 2001,152(2):349-60
- (비특허문헌 0016) Hayama et al., Cancer Res 2006,66(21):10339-48
- (비특허문헌 0017) Harao et al., Int J Cancer 2008,123(11):2616-25

발명의 내용

[0008]

본 발명은, CDCA1 발현 세포에 대해 특이적인 반응을 하는 세포 독성 T 세포(CTL)을 유도할 수 있는 펩타이드에 관한 것이다. 이러한 펩타이드가 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen : HLA)에 의해 항원 제시 세포(antigen-presenting cell : APC) 상에 제시되어 CD8 양성 T 세포에 인식되고 펩타이드 특이적인 세포 독성 활성을 나타내는 CTL이 유도된다. 지금까지 동정된 CTL 유도능을 갖는 CDCA1 유래 펩타이드는 HLA-A02 제한적인, HLA-A24 제한적인, HLA-A11 제한적인, HLA-A33 제한적인 또는 HLA-A03 제한적인 펩타이드이며, 항원 제시 세포

가 이러한 HLA를 발현하지 않는 경우에는 CTL을 유도할 수 없다. 그러므로 이러한 HLA를 갖지 않는 암 환자(대상)에 대해 면역 요법을 실시하는 경우에는 기존의 펩타이드는 적합하지 않다. HLA-A01은 백인에 높은 빈도로 인정되는 HLA 아형이다(Cao K et al., Hum Immunol 2001, 62 (9) : 1009-30). HLA-A01 양성 암 환자에게는 HLA-A01 제한적인 펩타이드를 투여하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 HLA-A01 제한적인 CDCA1 유래 펩타이드로, CTL 유도 능력을 갖는 펩타이드에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 결과로부터 본 발명의 펩타이드가 CDCA1 및 HLA-A01을 발현하는 암세포에 대한 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 에피토프 펩타이드라는 것이 입증된다.

- [0009] 따라서 HLA-A01 제한적인 양식으로 CTL을 유도할 수 있는 CDCA1 유래의 펩타이드를 제공하는 것은 본 발명의 하나의 목적이다. 이러한 펩타이드는 CTL을 시험관 내(*in vitro*), 생체 밖(*ex vivo*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 유도하기 위해 사용할 수 있으며, 또는 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도할 목적으로 대상에 투여하기 위해 사용될 수 있다. 바람직한 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 보다 바람직하게는 노나펩타이드(nonapeptide) 또는 데카펩타이드(decapeptide)이며, 더욱 바람직하게는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드이다.
- [0010] 본 발명의 펩타이드는, 결과적으로 발생하는 변형 펩타이드가 원래 펩타이드의 CTL 유도능을 유지하는 한, 1 개, 2 개 또는 그 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 펩타이드도 포함한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 본 발명의 펩타이드 중 하나를 코딩하는 된 폴리 뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 폴리 뉴클레오티드는 본 발명의 펩타이드와 마찬가지로, CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하기 위해 사용될 수 있고, 또는 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 대상에 투여할 수 있다.
- [0012] 본 발명은 또한, 본 발명의 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드, 본 발명의 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드를 코딩하는 1종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드, 본 발명의 APC, 본 발명의 펩타이드를 제시하는 엑소좀 및 / 또는 본 발명의 CTL을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 약학적 조성물이다. 본 발명의 약학적 조성물은 암의 치료 및 / 또는 예방 및 수술 후 이의 재발의 예방을 위해 사용될 수 있다. 또한, 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 대상에 투여하는 경우, 본 발명의 펩타이드는 APC의 표면에 제시되고, 그로 인하여 해당 펩타이드를 표적으로 하는 CTL이 유도된다. 따라서 CTL을 유도하기 위한 조성물로서, 본 발명의 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드, 본 발명의 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드를 코딩하는 1종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드, 본 발명의 APC 및 / 또는 본 발명의 펩타이드를 제시하는 엑소좀을 포함하는 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 추가적인 목적이다.
- [0013] CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는 방법으로서, APC를 본 발명의 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드와 접촉시키는 단계, 또는 본 발명의 펩타이드 중 하나를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공하는 것이 본 발명의 추가적인 목적이다.
- [0014] 본 발명은 또한 CD8 양성 T 세포를 HLA 항원 및 본 발명의 펩타이드 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC와 공동 배양하는 단계, CD8 양성 T 세포를 HLA 항원 및 본 발명의 펩타이드의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀과 공동 배양하는 단계, 또는 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 T 세포 수용체(T cell receptor : TCR)의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 CD8 양성 T 세포에 도입하는 단계를 포함하는, CTL을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0015] HLA 항원 및 본 발명의 펩타이드 복합체를 자신의 표면에 제시하는 단리된 APC를 제공하는 것은 본 발명의 또 다른 목적이다. 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드를 표적으로 하는 단리된 CTL을 제공한다. 이러한 APC 및 CTL은 CDCA1을 발현하는 암에 대한 면역 요법에 사용할 수 있다.
- [0016] 대상에서 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드, 본 발명의 APC, 본 발명의 펩타이드를 제시하는 엑소좀 및 / 또는 본 발명의 CTL을 포함하는 조성물을 해당 대상에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다. 또한 대상에서 암을 치료 및 / 또는 예방 및 수술 후 이의 재발을 예방하는 방법으로서, 본 발명의 펩타이드, 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드, 본 발명의 APC, 본 발명의 펩타이드를 제시하는 엑소좀 및 / 또는 본 발명의 CTL을 해당 대상에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.
- [0017] 상기에 덧붙여, 본 발명의 다른 목적 및 특징은 첨부된 도표 및 실시예와 함께 다음의 상세한 설명을 읽음으로써 보다 충분히 밝혀진다. 그러나, 전술한 발명의 개요 및 다음의 상세한 설명은 모두 예시적인 실시예로서 본

발명 또는 본 발명 이외의 대체적인 실시예로 한정하는 것은 아님을 이해하여야 한다. 특히, 본 발명을 몇 가지 특정한 실시예를 참조하여 본 명세서에서 설명하지만, 그 설명은 본 발명을 예증하는 것이며, 본 발명을 한정하는 것으로 구성되어 있지 않은 것으로 이해할 수 있다. 첨부된 특허 청구 범위에 의해 기재되는 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않고 당 업자는 다양한 변경 및 적용에 생각이 미칠 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 기타 목적, 특징, 이익 및 장점은 본 개요 및 아래에 기재된 특정 실시예에서 밝혀져 당 업자에게는 용이하게 명백해질 것이다. 이러한 목적, 특징, 이익 및 장점은 첨부된 실시예, 데이터, 도표 및 그들로부터 도출되는 모든 타당한 추론과 함께 상기에서부터 단독으로 또는 본 명세서에 포함되는 참고 문헌을 고려하여 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018]

[도 1] 도 1은 CDCA1 유래 펩타이드에서 유도된 세포를 이용하여 실시한 IFN- γ 효소 결합 면역 스팟(ELISPOT) 분석의 결과를 나타내는 사진 (a) ~ (j)로 구성된다. 도면에서 "+"는 목적의 펩타이드를 펄스한 표적 세포에 대한 IFN- γ 생산을 나타내고, "-"는 어느 펩타이드도 펄스하지 않은 표적 세포에 대한 IFN- γ 생산을 나타낸다 (음성 대상).

CDCA1-A01-8-138 (서열 번호 : 1)을 이용한 웰 번호 # 1 (a)

CDCA1-A01-9-290 (서열 번호 : 25)를 이용한 웰 번호 # 7 (b)

CDCA1-A01-9-130 (서열 번호 : 33)를 이용한 웰 번호 # 5 (c)

CDCA1-A01-9-246 (서열 번호 : 34)를 이용한 웰 번호 # 7 (d)

CDCA1-A01-9-268 (서열 번호 : 35)를 이용한 웰 번호 # 1 (e)

CDCA1-A01-9-288 (서열 번호 : 37)를 이용한 웰 번호 # 3 (f)

CDCA1-A01-10-136 (서열 번호 : 8)을 이용한 웰 번호 # 2 (g)

CDCA1-A01-10-56 (서열 번호 : 10)를 이용한 웰 번호 # 6 (h) 및

CDCA1-A01-10-48 (서열 번호 : 13)를 이용한 웰 번호 # 6 (i)에서 음성대조와 비교하여 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산이 인정되었다. 사진에서 사각형으로 표시한 반응을 나타낸 세포에서 CTL 클론을 수립하였다. 대조적으로, 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산이 인정되지 않았던 전형적인 음성 데이터의 예로는 CDCA1-A01-10-66(서열 번호 : 9) (j)를 나타낸다.

[도 2] 도 2는 CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8), CDCA1-A01-10-56(서열 번호 : 10) 또는 CDCA1-A01-10-48(서열 번호 : 13)에 의한 유도 후, 한계 희석법에 의해 수립된 CTL 클론의 IFN- γ 생산을 나타내는 일련의 꺾은선 그래프 (a) ~ (c)로 구성된다. 이러한 결과는 CTL 클론의 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산을 나타내고 있다. 도면에서 "+"목적의 펩타이드를 펄스한 표적 세포에 대한 CTL 클론의 IFN- γ 생산을 나타내고, "-"는 어느 펩타이드도 펄스하지 않은 표적 세포에 대한 CTL 클론의 IFN- γ 생산을 나타낸다. R / S 비는 응답 세포(Responder cells)인 CTL 클론의 세포 수와 그것을 자극하는 표적 세포(Stimulator cells)의 세포 수의 비를 나타낸다.

[도 3] 도면 3은 CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01 모두를 발현시킨 표적 세포에 대한 CTL 클론의 IFN- γ 생산을 나타내는 꺾은선 그래프이다. HLA-A * 01 : 01 또는 전장 CDCA1 유전자 중 어느 한쪽만을 발현시킨 COS7 세포를 음성대조로 하였다. CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8)에 의한 유도 후에 수립된 CTL 클론은 CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01 유전자를 모두 도입한 COS7 세포에 IFN- γ 생산을 나타냈다(흑색 마름모). 한편, HLA-A * 01 : 01(삼각) 또는 CDCA1 (속이 빈 원) 중 하나를 도입한 COS7 세포에 대해서는 유의한 IFN- γ 생산을 나타내지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

본 발명의 실시예를 실시하거나 시험함에 있어서, 본 명세서에 기재된 방법 및 재료와 유사한 또는 동일한 임의의 방법 및 재료를 사용할 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 재료를 여기에 기재한다. 그러나, 본 발명의 재료 및 방법에 대해 기재하기 전에, 본 명세서에 기재된 특정 크기, 형상, 치수, 재료, 방법론, 프로토콜 등은 관례적인 실험 방법 및 최적화에 따라 변경 가능 하기 때문에, 본 발명이 이에 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 기재에 사용하는 전문용어는 특정 형태 또는 실시예만을 설명하는 목적을 위한 것이며, 첨부된 특허 청구 범위에 의해서만 한정되는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 의도하지 않은 것도 또한 이해되어야 한다.

[0020]

1. 정의

- [0021] 본 명세서에서 사용되는 "하나의 (a)", "하나의 (an)" 및 "그 (the)"라는 단어는 달리 특기하지 않는 한 "적어도 하나의"를 의미한다.
- [0022] 물질 (예를 들면, 펩타이드, 항체, 폴리 뉴클레오티드 등)에 관련되어 사용하는 "단리된" 및 "정제된"이라는 용어는, 해당 물질이 아마도 천연 소스(natural source)에 포함될 수 있는 적어도 1 종의 물질을 실질적으로 포함하지 않는 것을 나타낸다. 따라서 단리 또는 정제된 펩타이드는 그 펩타이드가 유래한 세포 또는 조직 소스(source)에서 다른 세포 재료, 예를 들면 당질, 지질 및 기타 혼입 단백질을 실질적으로 포함하지 않는 펩타이드를 가리킨다. 또는 펩타이드가 화학 합성되는 경우에는 단리 또는 정제된 펩타이드는 전구체 물질 또는 다른 화학 물질을 실질적으로 함유하지 펩타이드를 말한다. "세포 재료를 실질적으로 포함하지 않는"이라는 용어는 그것이 단리된 세포 또는 재조합 의해 생산된 세포의 세포 성분에서, 펩타이드가 분리된 펩타이드의 조성물을 포함한다. 따라서 세포 물질을 실질적으로 함유하지 않는 펩타이드는 약 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % 또는 1 % (건조 중량 기준) 미만의 다른 세포 물질을 함유하는 펩타이드의 제조물을 포함한다. 펩타이드를 재조합하여 생산하는 경우, 단리 또는 정제된 펩타이드는 배양 배지도 실질적으로 포함하지 않으며, 배양 배지를 실질적으로 포함하지 않는 펩타이드는 배양 배지를 펩타이드 제조물의 용량의 약 20 % 10 % 또는 5 %, 3 %, 2 % 또는 1 % (건조 중량 기준) 미만으로 함유하는 펩타이드의 제조물을 포함한다. 펩타이드를 화학 합성하여 생성하는 경우, 단리 또는 정제된 펩타이드는 전구체 물질 및 다른 화학 물질을 실질적으로 포함하지 않으며, 전구체 물질 및 다른 화학 물질을 실질적으로 포함하지 않는 펩타이드는, 전구체 물질 및 다른 화학 물질을 펩타이드 제조물의 용량의 약 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % 또는 1 % (건조 중량 기준) 미만으로 포함하는 펩타이드의 제조물을 포함한다. 특정 펩타이드 제조물이 단리 또는 정제된 펩타이드인 것은, 예를 들면, 도데실 황산 나트륨(SDS) - 폴리 아크릴 아마이드 겔 전기 영동법 및 겔의 코마시 브릴리언트 블루 염색 등의 후에 단일 밴드의 출현으로 확인할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드 및 폴리 뉴클레오티드는 단리 또는 정제되어 있다.
- [0023] "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"이라는 용어는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 폴리머를 가리킨다. 이 용어는 천연형 아미노산 폴리머 외에 1 개 또는 복수의 비천연형 아미노산 잔기를 포함하는 비천연형 아미노산 폴리머에도 적용된다. 비천연형 아미노산에는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체 등이 포함된다.
- [0024] 본 명세서에서 사용하는 "아미노산"이라는 용어는 천연 아미노산, 및 천연 아미노산과 동일한 기능을 하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 가리킨다. 천연 아미노산이란 유전 암호에 의해 코딩되는 아미노산 및 세포 내에서 번역 후에 수식된 아미노산(예를 들어, 하이드록시 프롤린, γ-카르복시 글루탐산 및 O-포스포세린 등)이다. "아미노산 유사체"라는 용어는 천연 아미노산과 동일한 기본 화학 구조(수소, 카르복시기, 아미노기 및 R기에 결합된 α 탄소)를 가지나, 수식된 R기 또는 수식된 골격을 갖는 화합물(예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설펍사이드 및 메티오닌 메틸 설포니움 등)을 가리킨다. "아미노산 모방체"라는 용어는 일반적인 아미노산과는 다른 구조를 가지고 있지만, 아미노산과 같은 기능을 갖는 화합물을 가리킨다. 아미노산은 L- 아미노산 또는 D- 아미노산 중 어느 것이라도 좋지만, 본 발명의 펩타이드는 L- 아미노산의 폴리머인 것이 바람직하다.
- [0025] "폴리 뉴클레오티드", "올리고 뉴클레오티드" 및 "핵산"이라는 용어는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 뉴클레오티드의 폴리머를 가리킨다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 "조성물"이라는 용어는 특정 양의 특정 성분을 포함하는 생성물 및 특정 양의 특정 성분의 조합에서 직접 또는 간접적으로 발생하는 임의의 생성물을 포함하는 것을 말한다. 조성물이 약학적 조성물인 경우에 조성물이라는 용어는, 유효 성분 및 불활성 성분을 포함하는 생성물, 및 임의의 두 가지 혹은 그 이상의 성분의 조합, 복합체 형성 또는 응집으로부터, 하나 또는 여러 성분의 해리로부터, 또한 하나 또는 여러 성분의 다른 종류의 반응 또는 상호 작용으로부터 직접 또는 간접적으로 발생하는 임의의 생성물을 포함하는 것을 말한다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은, 본 발명의 화합물 또는 세포 및 약학적 또는 생리 학적으로 허용되는 담체를 혼합함으로써 제조되는 임의의 조성물을 포함한다. 본 명세서에서 사용하는 "약학적으로 허용되는 담체" 또는 "생리학적으로 허용되는 담체"라는 용어는 액체 또는 고체 증량제, 희석제, 부형제, 용매 및 봉입 재료를 포함하나 이에 국한되지 않는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 재료, 조성물, 물질, 또는 매체를 의미한다.
- [0027] 특기하지 않는 한, "암"이라는 용어는 CDCA1 유전자를 과잉 발현하는 암을 말하며, 그 예로는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암,

신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 또한 예시적인 실시예에서, "암"은 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암이다.

[0028] 특기하지 않는 한, "세포 독성 T 림프구", "세포 독성 T 세포" 및 "CTL"이라는 용어는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 특히 특별한 규정이 없는 한 비자기세포(예를 들어, 종양 / 암 세포, 바이러스 감염 세포)를 인식하여 이러한 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 아군을 가리킨다.

[0029] 특기하지 않는 한, "HLA-A01 (HLA-A1)"라는 용어는 HLA-A * 01 : 01, HLA-A * 01 : 02, HLA-A * 01 : 03, HLA-A * 01 : 04 등 서브 타입을 포함하는 HLA-A01 형을 가리킨다.

[0030] 대상 또는 환자와의 관련에서, 본 명세서에서 사용되는 "대상의 (또는 환자의) HLA 항원은 HLA-A01이다"라는 표현은 대상 또는 환자가 MHC (주조직적합복합체) 클래스 I 분자로서의 HLA-A01 항원 유전자를 호모 접합으로 또는 헤테로 접합으로 보유하며 HLA-A01 항원이 대상 또는 환자의 세포에서 HLA 항원으로 발현되는 것을 가리킨다.

[0031] 본 발명의 방법 및 조성물이 암의 "치료"와 관련해서 유용하다면 치료가 임상적 이점, 예를 들어 대상에서 암의 크기, 확산 또는 전이 능력의 감소, 암의 진행 지연, 암의 임상 증상의 완화, 생존 기간 연장, 수술 후 재발의 억제 등을 초래하는 경우에 치료는 "유효하다"고 간주된다. 치료를 예방적으로 적용하는 경우 "유효한"이란, 치료에 의해 암의 형성이 지연 또는 방해되거나 암의 임상 증상이 방해 또는 완화되는 것을 의미한다. 유효성은 특정 종양의 종류를 진단 또는 치료하기 위한 임의의 공지의 방법과 관련하여 결정된다.

[0032] 본 발명의 방법 및 조성물이 암의 "예방"과 관련해서 유용하다면 "예방"이라는 용어는 본 명세서에서 질환으로 인한 사망률 또는 이환율의 부하를 경감시키는 임의의 작용을 포함한다. 예방은 "제1 차, 제2차 및 제3차 예방 수준"에서 이루어질 수 있다. 제1차 예방은 질환의 발생을 회피하는 반면, 제2차 및 제3차 수준의 예방은 질환의 진행 및 증상의 출현을 예방하는 것 외에 기능을 회복시키고, 한편 질환 관련 합병증을 감소시킴으로써 기존 질환의 악영향을 감소시키는 것을 목적으로 한 작용을 포함한다. 또는 예방은 특정 장애의 중증도를 완화하는 것, 예를 들어 종양의 증식 및 전이를 감소시키는 것을 목적으로 한 광범위한 예방적 치료를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명과 관련해서 암의 치료 및 / 또는 예방, 및 / 또는 수술 후 이의 재발의 예방은 암세포의 증식 저해, 종양의 퇴행 또는 퇴축, 관해 유도 및 암의 발생의 억제, 종양 퇴축, 및 전이의 감소 또는 저해, 암 수술 후 재발 억제, 및 생존 기간 연장 등의 증상 중 어느 하나를 포함한다. 암의 효과적인 치료 및 / 또는 예방은 사망률을 감소시켜 암을 가진 개체의 예후를 개선하고 혈중 종양 마커의 수준을 저하시키고, 또한 암에 따른 검출 가능한 증상을 완화한다. 예를 들어, 증상의 경감 또는 개선은 효과적인 치료 및 / 또는 예방을 구성하고, 10 %, 20 %, 30 % 또는 그 이상의 경감 또는 증상이 안정된 상태를 포함한다.

[0034] 본 발명과 관련해서 "항체"라는 용어는 지정된 단백질 또는 펩타이드와 특이적으로 반응하는 면역 글로불린 및 그 단편을 가리킨다. 항체는 인간 항체, 영장류화 항체, 키메라 항체, 이중 특이성 항체, 인간화 항체, 다른 단백질 또는 방사 표지와 융합시킨 항체 및 항체 단편이 포함될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "항체"는 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로는 온전한 모노 클로날 항체, 폴리 클로날 항체, 2 개 이상의 온전한 항체로부터 형성된 다중 특이성 항체(예를 들어, 이중 특이성 항체)를 포함하며 원하는 생물 활성을 나타내는 한, 항체 단편을 포함한다. "항체"는 어느 클래스(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)의 항체여도 좋다.

[0035] 특기하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 모두 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 공통적으로 이해되는 용어와 같은 의미를 가진다.

[0036] II. 펩타이드

[0037] HLA-A01은 백인들 중에서 흔히 볼 수 있는 HLA 아형이다(Cao et al., Hum Immunol 2001, 62 (9) : 1009-30). 따라서 HLA-A01에 의해 제한되는 CDCA1 유래의 CTL 유도성 펩타이드를 제공함으로써 많은 백인에게, CDCA1를 발현하는 암의 유효한 치료 방법을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명은 HLA-A01 제한적인 방식으로 CTL을 유도할 수 있는 CDCA1 유래의 펩타이드를 제공한다.

[0038] 본 발명의 펩타이드는 HLA-A01 제한적인 방식에서 CTL을 유도할 수 있는 CDCA1 유래 펩타이드이다. HLA-A01 제한적인 방식에서 CTL을 유도할 수 있는 펩타이드로는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 들 수 있다.

[0039] 이러한 펩타이드에서 펄스한 수지상 세포에 의한 T 세포의 시험관 내에서의 자극에 의해, 이러한 펩타이드에 특이적인 세포 독성 활성을 갖는 CTL이 수립될 수 있다. 수립된 CTL은 각 펩타이드를 펄스한 표적 세포에 특이적

세포 독성 활성을 나타낸다.

[0040] CDCA1 유전자는 암세포 예를 들어, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암 등의 암 세포에서 과잉 발현하고 있지만, 대부분의 정상 기관에서는 발현하지 않기 때문에 면역 요법을 위한 우수한 표적이다. 따라서 본 발명의 펩타이드는 암의 면역 요법을 위해 적합하게 사용할 수 있다. 바람직한 펩타이드는 노나펩타이드(아미노산 잔기 9 개로 이루어진 펩타이드) 또는 데카펩타이드(아미노산 잔기 10 개로 이루어진 펩타이드)이며, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37의 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 보다 바람직하다. 예를 들면, 서열 번호 : 8에 기재된 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 세포에 대하여 특이적인 세포 독성 활성을 나타내는 CTL의 유도에 적합하며, HLA-A01 양성 환자에서 암 면역 요법을 위해 적합하게 사용할 수 있다. 더 바람직한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 8의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드이다.

[0041] 본 발명의 펩타이드는 결과적으로 생기는 펩타이드가 원래 펩타이드 CTL 유도능을 유지하는 한, 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열에 부가적인 아미노산 잔기를 인디쉬킬 수 있다. 부가적인 아미노산 잔기는 그들이 원래 펩타이드 CTL 유도능을 해치지 않는 한, 임의의 종류의 아미노산으로 구성될 수 있다. 따라서 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 포함한다. 이러한 펩타이드는 예를 들어 약 40 아미노산 미만이며, 대부분의 경우에는 약 20 아미노산 미만이고, 일반적으로 약 15 아미노산 미만이다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 원래 펩타이드가 노나펩타이드라면, 해당 펩타이드에 부가적인 아미노산을 인디쉬킴으로써 발생하는 10 아미노산 길이, 또는 11 내지 40 아미노산 길이의 펩타이드를 포함한다. 또한 원래 펩타이드가 데카펩타이드라면, 11 내지 40 아미노산 길이의 펩타이드를 포함한다. 이러한 펩타이드는 예를 들어, 11 내지 20 아미노산 길이의 펩타이드일 수 있고, 11 내지 15 아미노산 길이의 펩타이드일 수 있다. 부가적인 아미노산 잔기의 바람직한 예는 CDCA1의 전장 아미노산 서열(예를 들면, 서열 번호 : 64)에서 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열에 인접한 아미노산 잔기이다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDCA1 펩타이드 단편이며, CTL 유도능을 갖는 펩타이드를 포함한다.

[0042] 일반적으로 특정 펩타이드 중 1 개, 2 개 또는 그 이상의 아미노산의 변형은 해당 펩타이드의 기능에 영향을 미치지 않고, 경우에 따라서는 원래 펩타이드의 원하는 기능을 더 강화시키기도 한다. 실제로, 변형된 펩타이드(즉, 원래의 참조 서열과 비교하여 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산 잔기가 변형된(즉, 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된) 아미노산 서열로 구성된 펩타이드)는 원래 펩타이드의 생물 활성을 유지하는 것으로 알려져 있다(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81 : 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10 : 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79 : 6409-13). 따라서 한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에 1 개, 2 개 또는 수개 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하고, CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다.

[0043] 당 업자는 원래 아미노산 측쇄의 특성의 보존을 초래하는 경향이 있는, 단일 아미노산 또는 작은 비율의 아미노산을 변경하는 아미노산 서열에 대한 개개의 치환을 인식할 수 있다. 따라서 그것들은 종종 "보존적 치환"또는 "보존적 변형"으로 불리우며, "보존적 치환" 또는 "보존적 변형"에 의한 단백질의 변형은 원래 단백질과 유사한 기능을 갖는 변형 단백질을 발생시킬 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환의 표는 해당 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 기능적으로 유사한 아미노산 측쇄의 특성의 예로는 예를 들어, 소수성 아미노산(A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) 및 다음의 작용기 또는 특징을 공통적으로 갖는 측쇄가 포함된다 : 지방족 측쇄(G, A, V, L, I, P); 하이드록실기를 함유하는 측쇄(S, T, Y); 황 원자를 함유하는 측쇄(C, M); 카복실산 및 아마이드를 함유하는 측쇄(D, N, E, Q); 염기를 함유하는 측쇄(R, K, H); 및 방향족을 함유하는 측쇄(H, F, Y, W). 게다가, 다음의 8 군은 각각 상호 보존적 치환으로서 해당 기술 분야에서 인정 받고 있는 아미노산을 포함한다 :

[0044] 1) 알라닌(A), 글리신(G);

[0045] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0046] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0047] 4) 아르기닌(R), 리신(K);

- [0048] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V);
- [0049] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);
- [0050] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및
- [0051] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M) (예를 들어, Creighton, Proteins 1984을 참조하길 바람).
- [0052] 이러한 보존적 변형 펩타이드 또한 본 발명의 펩타이드에 포함된다. 그러나, 본 발명의 펩타이드는 이에 한정되지 않고, 변형 펩타이드가 원래 펩타이드의 CTL 유도능을 유지하는 한, 비보존적 변형을 포함할 수 있다. 또한, 변형 펩타이드는 CDCA1의 다형변이체, 중간상동체 및 대립 유전자 유래의 CTL 유도 가능한 펩타이드를 배제하지 않는다.
- [0053] 원래 펩타이드 CTL 유도능을 유지하는 한, 소수의(예를 들면, 1 개, 2 개 또는 수 개의) 또는 작은 비율의 아미노산을 변형할 (즉, 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가할) 수 있다. 본 명세서에서 "수 개"라는 용어는 5 개 또는 그 미만의 아미노산, 예를 들어 4 개 또는 3 개 또는 그 미만을 의미한다. 변형하는 아미노산의 비율은 바람직하게는 20 % 또는 그 미만, 보다 바람직하게는 15 % 또는 그 미만, 더욱 바람직하게는 10 % 혹은 그 미만 또는 1 내지 5 %이다.
- [0054] 면역 요법과 관련하여 사용된 경우, 본 발명의 펩타이드는 바람직하게는 HLA 항원의 복합체로서 세포 또는 엑소솜의 표면에 제시된다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 HLA 항원에 대한 높은 결합 친화성을 갖는 것이 바람직하다. 따라서 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가에 의해 펩타이드를 변형하여 결합 친화성이 개선된 변형 펩타이드를 얻을 수 있다. HLA 항원으로의 결합에 의해 제시되는 펩타이드 서열의 규칙성은 이미 알려져 있기 때문에(Falk et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998, 52 : 501-9 ; Takiguchi et al., Tissue Antigens 2000, 55 : 296-302), 그러한 규칙성에 기반한 변형을 본 발명의 펩타이드에 도입할 수 있다.
- [0055] 예를 들어, HLA Class I에 대한 결합성을 갖는 펩타이드는 일반적으로 N 말단에서 2 번째 아미노산 및 C 말단의 아미노산이 HLA Class I로의 결합에 관여하는 앵커 잔기인 것이 많다(Rammensee HG et al., Immunogenetics 1995, 41 (4) : 178-228). 예를 들어, HLA-A01는 N 말단에서 3 번째 아미노산으로서 아스파르트산 및 글루탐산이, C 말단의 아미노산으로서 티로신이, HLA-A01에 대한 결합 친화성이 높은 앵커 잔기로 알려져 있다. 또한 HLA-A01에서는 N 말단에서 2 번째 위치에 보조적인 앵커 잔기를 갖고, N 말단에서 2 번째의 아미노산으로는 트레오닌 및 세린이 바람직한 것으로 알려져 있다(Kubo, R.T Journal of Immunology 1994, 152 : 3913-24, Gambacorti-Passerini, C.Clinical Cancer Research 1997, 3 : 675-83, Falk, K.Immunogenetics 1994; 40 : 238-41). 따라서 HLA-A01 결합 친화성을 증대시키기 위해서는, N 말단에서 3 번째의 아미노산을 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환하고, 및 / 또는 C 말단의 아미노산을 티로신으로 치환하는 것이 바람직할 가능성이 있다. 또한, N 말단에서 2 번째 아미노산을 트레오닌 또는 세린으로 치환하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에서 N 말단에서 2 번째 아미노산이 트레오닌 또는 세린으로 치환되고, N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환 하되 및 / 또는 C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환되는, 아미노산 서열을 포함하는 CTL 유도능을 가지는 펩타이드는 본 발명의 펩타이드에 포함된다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에서 N 말단에서 2 번째 아미노산이 트레오닌 또는 세린에서 치환되고, N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되고 및 / 또는 C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환되는 아미노산 서열로 이루어진 CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다. 즉, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에서 (a) 내지 (c) 속에서 선택되는 1 이상의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 포함한다 :
- [0056] (a) N 말단에서 2 번째 아미노산이 트레오닌 또는 세린으로 치환됨;
- [0057] (b) N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환됨;
- [0058] (c) C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환됨.
- [0059] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 상기 (a) 내지 (c) 중에서 선택되는 하나 이상의 치환이 된 아미노산 서열로 이루어진, CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다. 본 발명에서 바람직한 치환의 수는 상기 (a) 내지 (c) 중에서 선택되

는 1 개, 2 개 또는 3 개의 치환이다.

[0060] 또한, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에서 N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되고 및 / 또는 C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환되는 아미노산 서열을 포함하는 CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에서 N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산에서 치환되고 및 / 또는 C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환되는 아미노산 서열로 이루어진 CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다. 즉, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 (a)와 (b)에서 더 선택되는 하나 이상의 치환된 아미노산 서열을 포함하는 CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다 :

[0061] (a) N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환됨; 및

[0062] (b) C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환됨.

[0063] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 상기 (a) 내지 (b) 중에서 선택되는 하나 이상의 치환된 아미노산 서열로 이루어진, CTL 유도능을 가지는 펩타이드일 수 있다.

[0064] 앵커 부위의 아미노산에서뿐만 아니라 펩타이드의 잠재적인 T 세포 수용체(TCR) 인식 부위에서도 치환을 도입할 수 있다. 일부 연구는 예를 들어 CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2 / neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 또는 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ 등 아미노산 치환을 갖는 펩타이드가 원래 펩타이드와 동등한 활성을 가지거나 더 우수한 활성을 가질 수 있음을 입증하고 있다 (Zaremba et al. Cancer Res. 1997, 57, 4570-7, TK Hoffmann et al. J Immunol. 2002, 168 (3) : 1338- 47, SO Dionne et al. Cancer Immunol immunother. 2003, 52 : 199-206 및 SO Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy 2004, 53, 307-14).

[0065] 본 발명은 또한, 본 발명의 펩타이드(예를 들면, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드)의 N 말단 및 / 또는 C 말단에 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산을 부가할 수 있음을 도모한다. CTL 유도능을 유지하는 그러한 변형 펩타이드도 본 발명에 포함된다. 예를 들면, 서열 번호 : 8에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 N 말단 및 / 또는 C 말단에 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산이 부가된 펩타이드는 APC에 접촉시키면, APC내로 통합되고 프로세싱을 받아 서열 번호 : 8에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 된다. 그 후, 항원 제시 경로를 거쳐 APC의 세포 표면에 제시함으로써 CTL을 유도할 수 있다. 즉 본 발명의 펩타이드는 N 말단 및 C 말단 중 어느 하나 또는 양쪽에 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산이 부가된 펩타이드일 수 있다.

[0066] 또한 본 발명의 또 다른 실시예에서는 각 서열 번호에 의해 참조되는 아미노산 서열 중에 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산의 치환을 포함하고, 동시에 해당 치환 아미노산 서열의 N 말단 및 C 말단 중 하나 또는 모두에, 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산을 부가한 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0067] 본 발명의 펩타이드가 아미노산 치환을 포함하는 경우, 바람직한 치환 위치는 예를 들어, 본 발명의 펩타이드 중에 포함되어 있는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37에 의해 참조되는 아미노산 서열의 N 말단에서 2 번째, N 말단에서 3 번째 및 C 말단으로부터 선택되는 1 개, 2 개 또는 3 개일 수 있다.

[0068] 그러나 펩타이드의 아미노산 서열이 다른 기능을 갖는 내인성 또는 외인성 단백질의 아미노산 서열의 일부와 동일한 경우, 자가 면역 장애 및 / 또는 특정 물질에 대한 알레르기 증상 등의 부작용이 유발될 가능성이 있다. 따라서 펩타이드의 아미노산 서열이 다른 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 상황을 피하기 위해, 사용 가능한 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 하는 것이 바람직하다. 상동성 검색에서, 대상 펩타이드와 비교하여 1 개 또는 2 개의 아미노산이 다른 펩타이드조차도 존재하지 않는 것으로 밝혀진 경우에는 이러한 부작용의 위험을 수반하지 않고, HLA 항원과 그 결합 친화성을 증대시키기 위해, 및 / 또는 그 CTL 유도능을 증대시키기 위해, 해당 대상 펩타이드를 변형할 수 있다.

[0069] 본 발명의 펩타이드의 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산이 변형된 펩타이드는 원래 펩타이드의 CTL 유도능을 유지할 수 있는 것으로 예측되지만, 변형 펩타이드에 대해 CTL 유도능을 확인하는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 "CTL 유도능을 갖는 펩타이드"는 그 펩타이드로 자극된 APC에 의하여 CTL이 유도되는 펩타이드를 말한다. "CTL 유도"는 CTL로 분화 유도, CTL 활성화의 유도, CTL 증식의 유도, CTL 세포 독성 활성화의 유도, CTL에 의한 표적 세포의 용해 유도 및 CTL의 IFN- γ 생산 증가의 유도가 포함된다.

- [0070] CTL 유도능의 확인은 HLA 항원을 보유하는 APC(예를 들어 B 림프구, 대 식세포 및 수지상 세포)를 유도하여 펩타이드로 자극한 후, CD8 양성 T 세포와 혼합한 후 표적 세포에 대해 CTL에 의해 방출된 IFN- γ 를 측정함으로써 이루어진다. APC는 바람직하게는 인간 말초 혈액 단핵 백혈구 유래의 수지상 세포를 사용할 수 있다. 반응계로서 HLA 항원을 발현하도록 제작된 유전자 변형 동물을 이용할 수도 있다. 또한 예를 들어, 표적 세포를 51Cr 등으로 방사 표지하여 표적 세포에서 방출된 방사성 활성에서 펩타이드로 유도된 CTL의 세포 독성 활성을 산출할 수 있다. 또는 펩타이드로 자극한 APC의 존재하에 CTL에 의해 생산 및 방출된 IFN- γ 를 측정하여 항 IFN- γ 모노 클로날 항체를 이용하여 배지상의 저지대를 시각화하여 CTL 유도능을 평가할 수 있다.
- [0071] 상기의 변형에 더하여, 본 발명의 펩타이드는 결과적으로 생기는 연결 펩타이드가 CTL 유도능을 유지하는 한, 다른 펩타이드에 연결시킬 수도 있다. 본 발명의 펩타이드와 연결시키는 적절한 펩타이드의 예로는 TAA에서 유래한 CTL 유도성 펩타이드를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드끼리 연결시킬 수도 있다. 펩타이드 간의 연결에 사용할 수 있는 적절한 링커는 해당 기술 분야에서 공지이며, 예를 들면 AAY(PM Daftarian et al., J Trans Med. 2007, 5:26), AAA, NKRK(서열 번호 : 48)(RPM Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165 : 7308-15), 또는 K(S. Ota et al., Can Res.2002, 62, 1471-6, KS Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168 : 5709-15)와 같은 링커를 사용할 수 있다. 펩타이드는 다양한 배치(예를들어, 연쇄상, 중복 등)에 연결할 수 있으며, 3 개 이상의 펩타이드를 연결할 수도 있다.
- [0072] 본 발명의 펩타이드는 또한 결과적으로 생기는 연결 펩타이드가 CTL 유도능을 유지하는 한, 다른 물질에 연결시킬 수도 있다. 본 발명의 펩타이드와 연결시키는 적절한 물질의 예로는 예를 들어, 펩타이드, 지질, 당 또는 당쇄, 아세틸기 및 천연 또는 합성 폴리머 등을 들 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 CTL 유도능을 손상되지 않는 한, 당쇄 부가, 측쇄 산화, 또는 인산화 등의 수식을 할 수도 있다. 이런 종류의 수식을 실시하고, 추가적인 기능(예를 들어, 표적화 기능 및 송달 기능)을 부여하거나 펩타이드를 안정화할 수 있다.
- [0073] 예를 들어, 펩타이드의 생체 내 안정성을 높이기 위해, D-아미노산, 아미노산 모방체 또는 비천연 아미노산을 도입하는 것이 해당 기술 분야에서 공지이며, 이 개념을 본 발명의 펩타이드에 적합시킬 수 있다. 펩타이드의 안정성은 몇 가지 방법으로 분석할 수 있다. 예를 들어, 펩티다아제, 및 인간의 혈장 및 혈청 등의 다양한 생체 매질을 사용하여 안정성을 시험할 수 있다(예를 들어, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11 : 291-302을 참조하기 바람).
- [0074] 또한, 상술한 바와 같이, 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 변형 펩타이드 중에서 원래의 펩타이드와 비교하여 같거나 보다 높은 활성을 갖는 것을 스크리닝 또는 선택할 수 있다. 따라서 본 발명은 또한 원래의 것과 비교하여 같거나 보다 높은 활성을 갖는 변형 펩타이드를 스크리닝 또는 선택하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은, CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 스크리닝하는 방법으로 서 다음의 단계를 포함하는 방법을 제공한다 :
- [0075] (a) 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 원래의 아미노산 서열에 대하여 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 후보 서열을 생성하는 단계;
- [0076] (b) (a)에서 작성한 후보 서열 중에서 CDCA1 이외의 어떠한 공지된 인간 유전자 산물과도 유의한 상동성(서열 동일성)을 갖지 않는 후보 서열을 선택하는 단계;
- [0077] (c) (b)에서 선택된 후보 서열로 이루어진 펩타이드와 APC를 접촉시키는 단계;
- [0078] (d) (c)의 APC와 CD8 양성 T 세포를 접촉시키는 단계; 및
- [0079] (e) 원래의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드보다 동등하거나 또는 더 높은 CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 선택하는 단계. 본 발명에 있어서, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 펩타이드는 모두 HLA-A01 제한적인 CTL 유도 작용을 가지고 있다. 따라서 아미노산 서열을 변형한 것 중에서 CTL 유도능을 갖는 것을 선택하기 위해서 상기 단계 (c)의 APC는 HLA-A01를 가진 세포인 것이 바람직하다.
- [0080] 본 명세서에서 본 발명의 펩타이드는 또한 "CDCA1 펩타이드" 또는 "CDCA1 폴리 펩타이드"로도 기재된다.
- [0081] III. 본 발명의 펩타이드의 제조
- [0082] 주지의 기법을 이용하여, 본 발명의 펩타이드를 제조할 수 있다. 예를 들면, 재조합 DNA 기술 또는 화학 합성을 이용하여 본 발명의 펩타이드를 제조할 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 개별적으로 또는 둘 혹은 그 이상의 펩타이드를 포함하는 보다 긴 폴리 펩타이드로서 합성할 수 있다. 재조합 DNA 기술을 이용하여 숙주 세포 내에서

생산시킨 후, 또는 화학 합성한 후, 숙주 세포 또는 합성 반응물에서 본 발명의 펩타이드를 분리할 수 있다. 즉, 다른 숙주 세포 단백질 및 이들의 단편 또는 다른 어떠한 화학 물질도 실질적으로 포함하지 않도록 본 발명의 펩타이드를 정제 또는 분리할 수 있다.

- [0083] 본 발명의 펩타이드는 수식에 의해 원래 펩타이드의 생물학적 활성이 손상되지 않는 한, 당쇄 부가, 측쇄 산화 또는 인산화 등의 수식을 포함할 수 있다. 다른 예시적인 수식에는, 예를 들어 해당 펩타이드의 혈청 반감기를 연장시키기 위해 사용될 수 있는 D-아미노산 또는 다른 아미노산 모방체의 도입이 포함된다.
- [0084] 선택된 아미노산 서열에 따라 화학 합성에 의해 본 발명의 펩타이드를 얻을 수 있다. 해당 합성에 적합한 기존의 펩타이드 합성법의 예로는 다음과 같은 문헌에 기재된 방법이 포함된다 :
- [0085] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- [0086] (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- [0087] (iii) "펩타이드 합성"(일본어), 환선, 1975;
- [0088] (iv) "펩타이드 합성의 기초 실험"(일본어), 환선, 1985;
- [0089] (v) "의약품의 개발"(일본어), 속 제 14 권(펩타이드 합성), 광천 서점, 1991;
- [0090] (vi) W099 / 67288; 및
- [0091] (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, Solid Phase Peptide Synthesis, Academic Press, New York, 1980, 100-118.
- [0092] 또는 펩타이드를 생산하기 위한 임의의 공지의 유전자 공학적 방법을 적합시켜, 본 발명의 펩타이드를 얻을 수도 있다(예를 들어, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132 : 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Wu et al. Methods in Enzymology 1983, 101 : 347-62). 예를 들면, 우선, 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로(예를 들어, 프로모터 서열에 상응하는 조절 서열의 하류에) 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 적절한 벡터를 제조하고 적절한 숙주 세포에 형질 전환한다. 이어서, 해당 세포를 배양하여 본 발명의 펩타이드를 생산시킨다. 또는 시험관 내 번역 시스템을 이용하여 본 발명의 펩타이드를 시험관 내에서 제작할 수 있다.
- [0093] IV. 폴리 뉴클레오티드
- [0094] 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드 중 어느 하나를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 제공한다. 여기에는 천연 CDCA1 유전자(예를 들어, GenBank 액세스 번호 NM_145697(서열 번호 : 44) 또는 GenBank 액세스 번호 NM_031423(서열 번호 : 46)) 유래의 폴리 뉴클레오티드 및 그 보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리 뉴클레오티드를 포함한다. 본 명세서에서 "보존적으로 변형된 뉴클레오티드 서열"이라는 용어는 동일한 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 가리킨다. 유전 암호의 변형때문에 수많은 기능적으로 동일한 핵산이 임의의 특정 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산의 알라닌을 코딩한다. 따라서, 어느 코돈에 의해서 알라닌이 지정되는 임의의 위치에서, 코딩되는 폴리펩타이드를 변화시키지 않고, 해당 코돈을 상기의 대응하는 코돈 중 하나로 변경할 수 있다. 이러한 핵산의 변이는 "침묵 변이"이며, 보존적으로 변형된 변이의 일종이다. 펩타이드를 코딩하는 본 명세서 속의 모든 핵산 서열은 해당 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 나타낸다. 핵산 중의 각 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 보통 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG를 제외)을 변형하여 기능적으로 동일한 분자를 얻을 수 있음을 당업자는 인식할 것이다. 따라서 펩타이드를 코딩하는 핵산의 각 침묵 변이는 개시한 각 배열에서 비명시적으로 기재되어 있다.
- [0095] 본 발명의 폴리 뉴클레오티드는 DNA, RNA 및 그러한 유도체로 구성될 수 있다. DNA는 A, T, C, 및 G 등의 염기에서 적절하게 구성되며 RNA에서는 T가 U로 바뀐다.
- [0096] 본 발명의 폴리 뉴클레오티드는 개재하는 아미노산 서열을 사이에 개재하거나 또는 개재하지 않고, 본 발명의 여러 펩타이드를 코딩할 수 있다. 예를 들어, 개재하는 아미노산 서열은 폴리 뉴클레오티드 또는 번역된 펩타이드의 절단 부위(예를 들면, 효소 인식 서열)를 제공할 수 있다. 또한 폴리 뉴클레오티드는 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 코드 서열에 대한 임의의 부가적 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리 뉴클레오티드는 펩타이드의 발현에 필요한 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리 뉴클레오티드일 수 있고 또는 마커 유전자 등을 갖는 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드)일 수 있다. 일반적으로, 예를 들어 폴리머레이즈 및 엔도뉴클레이즈를 이용하는 기존의 재조합 기법으로 폴리 뉴클레오티드를 조작함으로써 그러한 재조합 폴리 뉴클레오티드를 제조할 수

있다.

[0097] 제조합 기법 및 화학 합성 기법 중 어느 것을 사용하여도 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 제작할 수 있다. 예를 들어, 적절한 벡터에 삽입하여 폴리 뉴클레오티드를 제작할 수 있으며, 이것은 컴피턴트 세포(competent cell)에 트랜스펙션(transfection) 한 경우에 발현될 수 있다. 혹은 PCR 기법 또는 적절한 숙주 내에서의 발현을 이용하여 폴리 뉴클레오티드를 증폭할 수도 있다(예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989을 참조하기 바람). 또는 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48 : 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3 : 801-5에 기재되어 있는 고상 기법을 이용하여 폴리 뉴클레오티드를 합성할 수도 있다.

[0098] V. 엑소좀

[0099] 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드와 HLA 항원 사이에 형성된 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀이라 불리는 세포 내 소포를 제공한다. 엑소좀은 예를 들어 특표형 11-510507 호 및 W099 / 03499에 설명되어 있는 방법을 이용하여 제조할 수 있으며, 치료 및 / 또는 예방의 대상이 되는 환자에게서 얻은 APC를 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 엑소좀은 본 발명의 펩타이드와 같은 양식으로, 백신으로 접종할 수 있다.

[0100] 상기 복합체에 포함된 HLA 항원의 형태는 치료 및 / 또는 예방을 필요로 하는 대상과 일치해야 한다. 예를 들어 HLA-A01(예를 들면, HLA-A * 01 : 01)은 백인에 높은 빈도로 인정되는 HLA 아형이며, 이 HLA 항원의 형태는 백인 환자의 치료에 적합하다고 생각된다. 일반적으로 임상에서 치료를 필요로 하는 환자의 HLA 항원의 형태를 미리 검토하여 특정 HLA 항원에 대한 높은 수준의 결합 친화성을 갖거나 또는 특정 HLA 항원을 통한 항원 제시에 의한 CTL 유도능을 가지는 펩타이드의 적절한 선택이 가능해진다.

[0101] 본 발명의 엑소좀은 본 발명의 펩타이드와 HLA-A01의 복합체를 그 표면에 제시한다. 본 발명의 펩타이드와 복합체를 형성하는 HLA가 HLA-A01인 경우, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 이의 변형 펩타이드인 것이 바람직하고, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 이의 변형 펩타이드인 것이 보다 바람직하다.

[0102] VI. 항원 제시 세포(APC)

[0103] 본 발명은 또한 HLA 항원 및 본 발명의 펩타이드 사이에 형성되는 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC를 제공한다. 또는, 본 발명은 HLA 항원 및 본 발명의 펩타이드 사이에 형성된 복합체를 세포 표면에 갖는 APC를 제공한다. 본 발명의 APC는 단리된 APC일 수 있다. 세포(APC, CTL 등)에 대해 사용되는 경우 "단리된"이라는 용어는, 해당 세포가 다른 종류의 세포로부터 분리되는 것을 말한다. 본 발명의 APC는 치료 및 / 또는 예방의 대상이 되는 환자에서 유래되는 APC에서 유도된 것이라도 되고 단독으로 또는 본 발명의 펩타이드, 엑소좀 또는 CTL을 포함한 다른 약물과 병용하여 백신으로 투여할 수 있다.

[0104] 본 발명의 APC는 특정 종류의 세포에 한정되지 않고, 림프구에 의해 인식되도록 자신의 세포 표면에 단백질성 항원을 제시하는 것으로 알려져 있는 세포, 예컨대 수지상 세포(dendritic cell : DC), 랑겔 한스 세포, 대식세포, B 세포 및 활성화 T 세포가 포함된다. DC는 APC에서 가장 강력한 CTL 유도 작용을 갖는 대표적인 APC이기 때문에 DC는 본 발명의 APC로 바람직하게 사용될 수 있다.

[0105] 예를 들어, 말초혈액 단핵 세포로부터 DC를 유도한 다음 그것들을 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 본 발명의 펩타이드로 자극하여 본 발명의 APC를 얻을 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 대상에 투여한 경우, 본 발명의 펩타이드를 제시하는 APC가 해당 대상의 체내에서 유도된다. 따라서, 본 발명의 APC는 본 발명의 펩타이드를 대상으로 투여한 후, 해당 대상에서 APC를 회수하여 얻을 수 있다. 또는, 본 발명의 APC는 대상에서 회수된 APC를 본 발명의 펩타이드와 접촉시킴으로써 얻을 수 있다.

[0106] 대상에서 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도하기 위해, 본 발명의 APC를 단독으로 또는 본 발명의 펩타이드, 엑소좀 또는 CTL을 포함하는 다른 약제와 병용하여 대상에 투여할 수 있다. 예를 들어, 생체 외 투여는 다음의 단계를 포함하여 얻는다 :

[0107] (a) 제1의 대상에서 APC를 회수하는 단계;

[0108] (b) 단계 (a)의 APC를 펩타이드와 접촉시키는 단계 및

[0109] (c) 단계 (b)의 APC를 제2의 대상에 투여하는 단계.

- [0110] 제1의 대상과 제2의 대상은 동일한 개체여도 되고, 또는 다른 개체여도 된다. 제1의 대상과 제2의 대상이 다른 개체인 경우, 제1의 대상과 제2의 대상의 HLA는 동일한 형태인 것이 바람직하다. 상기 단계 (b)에서 얻어진 APC는 암을 치료 및 / 또는 예방하기 위한 백신이 될 수 있다.
- [0111] 상기와 같은 방법에 의해 얻어진 본 발명의 APC는 CTL 유도능을 갖는다. APC에 대해 사용되는 "CTL 유도능"이라는 용어는 CD8 양성 T 세포와 접촉했을 때 CTL을 유도할 수 있는 APC의 능력을 가리킨다. 본 발명의 APC에 의해 유도된 CTL은 CDCA1에 특이적인 CTL이며, CDCA1 발현 세포에 특이적인 세포 독성 활성을 나타낸다.
- [0112] 본 발명의 APC는 상기 방법에 더하여, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 시험관 내에서 APC에 도입함으로써 제조할 수 있다. 도입하는 폴리 뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA의 형태여도 된다. 도입 방법의 예로는 특별히 한정되지 않고, 리포펙션, 일렉트로 포레이션 및 인산 칼슘법 등의 당 분야에서 종래부터 실시되고 있는 다양한 방법이 포함된다. 보다 구체적으로는, Cancer Res 1996, 56 : 5672-7; J Immunol 1998, 161 : 5607-13; J Exp Med 1996, 184 : 465-72; 공개 특허 공보 제 2000-509281 호에 기재되어 있는 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입함으로써, 해당 폴리 뉴클레오티드는 세포 내에서 전사, 번역 등을 받고, 그 다음에 생긴 펩타이드는 MHC 클래스 I에 의해 프로세싱되어 제시 경로를 거쳐 본 발명의 펩타이드가 APC 세포 표면에 제시된다.
- [0113] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 APC는 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01) 및 본 발명의 펩타이드 사이에 형성된 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하고 있는 APC이다. 본 발명의 펩타이드와 복합체를 형성하는 HLA가 HLA-A01 인 경우, 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 이의 변형 펩타이드인 것이 바람직하고, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것이 보다 바람직하다.
- [0114] 또한, 본 발명의 APC는 바람직하게는 다음의 (a) 또는 (b)에 기재된 단계를 포함하는 방법에 의해 유도된 APC이다 :
- [0115] (a) HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)를 발현하는 APC를 본 발명의 펩타이드와 접촉시키는 단계;
- [0116] (b) HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)를 발현하는 APC에, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 도입하는 단계.
- [0117] HLA-A01을 발현하는 APC와 접촉시키는 본 발명의 펩타이드는 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 또는 이의 변형 펩타이드인 것이 바람직하고, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것이 보다 바람직하다.
- [0118] 또한, 본 발명에 의하면, CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 본 발명의 펩타이드의 사용이 제공된다. 덧붙여, 본 발명은 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정을 제공한다. 나아가, 본 발명은 또한 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하기 위한 본 발명의 펩타이드를 제공한다.
- [0119] VII. 세포 독성 T 림프구(CTL)
- [0120] 본 발명의 펩타이드에 의해 유도된 CTL은 생체 내에서 CDCA1을 발현하는 암세포를 표적으로 하는 면역 반응을 강화하기 위하여, 본 발명의 펩타이드와 마찬가지로 백신으로 사용할 수 있다. 따라서 본 발명은 본 발명의 펩타이드에 의해 유도 또는 활성화된 CTL을 제공한다. 본 발명의 CTL은 본 발명의 펩타이드를 표적으로하는 CTL이며, 본 발명의 펩타이드와 HLA 항원의 복합체에 결합할 수 있는 CTL이다. 해당 복합체에 대한 CTL의 결합은 CTL 세포 표면에 존재하는 T 세포 수용체(TCR)를 통해 이루어진다. 본 발명의 CTL은 단리된 CTL 일 수 있다.
- [0121] 본 발명의 CTL은 (1) 본 발명의 펩타이드를 대상으로 투여하는 것, 또는 (2) 대상 유래의 APC 및 CD8 양성 T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell : PBMC)를 시험관 내에서 본 발명의 펩타이드로 자극하는 것, 또는 (3) CD8 양성 T 세포 또는 PBMC를, HLA 항원 및 본 발명의 펩타이드 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소좀과 시험관 내에서 접촉시키는 것 또는 (4) 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 T 세포 수용체(TCR)의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 CD8 양성 T 세포에 도입함으로써 얻을 수 있다. 상기 (2) 또는 (3)의 방법으로 사용되는 엑소좀 및 APC는 각각 "V. 엑소좀" 및 "VI. 항원 제시 세포(APC)"의 장에 기재된 방법에 의해 제조할 수 있으며 상기 (4)의 방법은 "VIII.T 세포 수용체 (TCR)"의 장에 기재한다.

[0122] 본 발명의 CTL 치료 및 / 또는 예방의 대상이 되는 환자에게 단독으로 투여할 수 있거나 또는 효과를 조절할 목적으로 본 발명의 펩타이드, APC 또는 엑소좀을 포함하는 다른 약물과 병용하여 투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 CTL은, 해당 CTL의 투여 대상이 되는 환자에서 유래된 CD8 양성 T 세포에서 유도된 CTL 일 수 있다. 본 발명의 CTL은 본 발명의 펩타이드, 예를 들어, 본 발명의 CTL의 유도에 사용된 것과 동일한 펩타이드를 제시하는 표적 세포에 대하여 특이적으로 작용한다. 표적 세포는 암세포처럼 CDCA1를 내인적으로 발현하는 세포 또는 CDCA1 유전자를 트랜스펙션한 세포일 수 있다. 본 발명의 펩타이드에 의한 자극에 의해 해당 펩타이드를 세포 표면에 제시하는 세포 또한, 본 발명에서의 CTL의 공격의 표적이 될 수 있다. 또한, 본 발명의 CTL의 표적 세포는 바람직하게는 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01) 양성의 세포이다.

[0123] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CTL은 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)과 CDCA1 모두를 발현하는 세포를 특이적으로 표적으로 한다. 본 명세서에서, CTL 세포를 "표적으로 한다"는 것은 HLA와 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 세포 표면에 제시하고 있는 세포를 CTL이 인식하여, 해당 세포에 대해 세포 독성 활성을 나타내는 것을 말한다. 또한 "특이적으로 표적으로 한다"는 것은 CTL이 해당 세포에 대해 세포 독성 활성을 나타내지만, 그 이외의 세포에 대해서는 독성 활성을 나타내지 않는 것을 말한다. 또한 CTL과 관련해서는 "세포를 인식한다"는 용어는 세포 표면에 제시되는 HLA와 본 발명의 펩타이드와의 복합체에 그 TCR을 통해 결합하고, 상기 세포에 특이적인 세포 독성 활성을 나타내는 것을 가리킨다. 따라서, 본 발명의 CTL은 바람직하게는 세포 표면에 제시된 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01) 및 본 발명의 펩타이드 사이에 형성된 복합체에 TCR을 통해 결합할 수 있는 CTL이다.

[0124] 또한, 본 발명의 CTL은 바람직하게는 다음의 (a) 또는 (b)에 기재된 단계를 포함하는 방법에 의해 유도된 CTL이다 :

[0125] (a) CD8 양성 T 세포를 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)와 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소좀과 시험관 내에서 접촉시키는 단계 ;

[0126] (b) CD8 양성 T 세포에 세포 표면에 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 도입하는 단계.

[0127] VIII. T 세포 수용체(TCR)

[0128] 본 발명은 또한 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 그것을 사용하는 방법을 제공한다. 해당 폴리 뉴클레오티드는 세포 표면에 HLA 항원에 의해 세포 표면에 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 TCR을 발현시킴으로써, CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 특이성을 CD8 양성 T 세포에 부여한다. 본 기술 분야에서 공지된 방법을 사용함으로써, 본 발명의 펩타이드에서 유도된 CTL의 TCR 서브 유닛으로의 α 사슬과 β 사슬을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 동정할 수 있다(WO2007 / 032255 및 Morgan et al., J Immunol 2003, 171, 3288). 예를 들어, TCR을 분석하기 위해서는 PCR 법이 바람직하다. 분석을 위한 PCR 프라이머는 예를 들어, 5 '측 프라이머로 5'-R 프라이머 (5'-gtctaccaggcattcgttcat-3') (서열 번호 : 40) 및 3 '측 프라이머로서, TCR α 사슬 C 영역에 특이적인 3-TRa-C 프라이머 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3 ') (서열 번호 : 41), TCR β 체인 C1 영역에 특이적인 3-TRb-C1 프라이머 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (서열 번호 : 42) 또는 TCR β 체인 C2 영역에 특이적인 3-TRb-C2 프라이머 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3 ') (서열 번호 : 43)이면 되나, 이에 한정되지 않는다. 동정된 폴리 뉴클레오티드를 CD8 양성 T 세포에 도입함으로써 형성되는 TCR은 본 발명의 펩타이드를 제시하는 표적 세포와 높은 결합력으로 결합할 수 있고 한편, 본 발명의 펩타이드를 제시하는 표적 세포의 효율적인 살상을 생체 내 및 시험관 내에서 매개한다.

[0129] VIII. T 세포 수용체(TCR)

[0130] 본 발명은 또한 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 그것을 사용하는 방법을 제공한다. 해당 폴리 뉴클레오티드는 세포 표면에 HLA 항원에 의해 세포 표면에 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 TCR을 발현시킴으로써, CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 특이성을 CD8 양성 T 세포에 부여한다. 본 기술 분야에서 공지된 방법을 사용함으로써, 본 발명의 펩타이드에서 유도된 CTL의 TCR 서브 유닛으로의 α 사슬과 β 사슬을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 동정할 수 있다(WO2007 / 032255 및 Morgan et al., J Immunol 2003, 171, 3288). 예를 들어, TCR을 분석하기 위해서는 PCR 법이 바람직하다. 분석을 위한 PCR 프라이머는 예를 들어, 5 '측 프라이머

로 5'-R 프라이머 (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (서열 번호 : 40) 및 3' 측 프라이머로서, TCR α 사슬 C 영역에 특이적인 3-TRa-C 프라이머 (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (서열 번호 : 41), TCR β 체인 C1 영역에 특이적인 3-TRb-C1 프라이머 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (서열 번호 : 42) 또는 TCR β 체인 C2 영역에 특이적인 3-TRb-C2 프라이머 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (서열 번호 : 43)이면 되나, 이에 한정되지 않는다. 동정된 폴리 뉴클레오티드를 CD8 양성 T 세포에 도입함으로써 형성되는 TCR은 본 발명의 펩타이드를 제시하는 표적 세포와 높은 결합력으로 결합할 수 있고 한편, 본 발명의 펩타이드를 제시하는 표적 세포의 효율적인 살상을 생체 내 및 시험관 내에서 매개한다.

[0131] TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드는 적절한 벡터, 예를 들어 레트로 바이러스 벡터에 통합시킬 수 있다. 이 벡터는 당 기술 분야에 있어 주지되고 있다. 해당 폴리 뉴클레오티드 또는 그들을 발현 가능한 형태로 포함하는 벡터를, CD8 양성 T 세포, 예를 들어 환자 유래의 CD8 양성 T 세포에 도입할 수 있다. 본 발명은 환자 자신의 T 세포 (또는 다른 대상 유래의 T 세포)의 신속한 변형에 의해 뛰어난 암세포 살상 특성을 갖는 변형 T 세포를 쉽고 용이하게 제작하는 것을 가능하게 하는 기성 조성물을 제공한다.

[0132] 본 명세서에서 특이적 TCR은 해당 TCR가 CD8 양성 T 세포의 표면에 존재하는 경우, 표적 세포 표면에 제시된 본 발명의 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 특이적으로 인식하여 표적 세포에 대한 특이적인 세포 독성 활성을 부여할 수 있는 TCR이다. 상기 복합체의 특이적 인식은 임의의 공지의 방법에 의해 확인할 수 있으며, 그 바람직한 예에는 HLA 분자 및 본 발명의 펩타이드를 사용하는 HLA 다량체 염색 분석 및 ELISPOT 분석 방법이 포함된다. ELISPOT 분석을 수행하여 상기 폴리 뉴클레오티드를 도입한 T 세포 TCR에 의해 표적 세포를 특이적으로 인식하고, 또한 신호가 세포 내에서 전달되는 것을 확인할 수 있다. 상기 TCR가 CD8 양성 T 세포 표면에 존재하는 경우, 해당 TCR가 CD8 양성 T 세포에 표적 세포 특이적인 세포 독성 활성을 부여하고 있다는 확인도 또한 공지의 방법으로 실시할 수 있다. 바람직한 방법에는 예를 들어, 크롬 방출 분석 방법 등에 의해 표적 세포에 대한 세포 독성 활성을 측정하는 것이 포함된다.

[0133] 또한, 본 발명은 HLA-A01와 관련하여, 예를 들어 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드에 결합하는 TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 CD8 양성 T 세포에 형질 도입하여 제조되는 CTL을 제공한다.

[0134] 형질 도입된 CTL은 생체 내에서 귀소할 수 있으며, 또한 잘 알려진 시험관 내 배양법에 의해 증식시킬 수 있다 (예를 들어, Kawakami et al., J Immunol. 1989, 142, 3452-61). 본 발명의 CTL 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 질환의 치료 또는 예방에 유용한 면역원성 조성물을 형성하는데 사용할 수 있다(이 내용을 참조하여 본 명세서에 삽입되는 WO2006 / 031221을 참조하기 바람).

[0135] IX. 약학적 조성물

[0136] 본 발명은 또한 다음 중에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분을 포함하는 조성물 또는 약학적 조성물을 제공한다 :

[0137] (a) 본 발명의 펩타이드;

[0138] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;

[0139] (c) 본 발명의 APC;

[0140] (d) 본 발명의 엑소좀;

[0141] (e) 본 발명의 CTL.

[0142] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효 성분에 더하여, 의약품에 통상적으로 사용되는 담체, 부형제 등을 특별히 제한없이 필요에 따라 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 사용 가능한 담체의 예로는 멸균수, 생리 식염수, 인산 완충액, 배양액 등을 들 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 다음의 (a) 내지 (e)에서 선택되는 적어도 하나 이상의 유효 성분 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다 :

[0143] (a) 본 발명의 펩타이드;

[0144] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;

[0145] (c) 본 발명의 APC;

- [0146] (d) 본 발명의 엑소좀;
- [0147] (e) 본 발명의 CTL.
- [0148] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요에 따라 안정제, 현탁액, 보존제, 계면 활성제, 용해 보조제, pH 조절제, 응집 억제제 등을 포함할 수 있다.
- [0149] CDCA1의 발현은 정상 조직에 비해 암세포에서 유의하게 상승한다. 따라서 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 암의 치료 및 / 또는 예방, 및 / 또는 수술 후 이의 재발의 예방에 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 암 치료 및 / 또는 예방, 및 / 또는 수술 후 이의 재발의 예방을 위한 약학적 조성물로서, 본 발명의 펩타이드 또는 폴리 뉴클레오티드의 1 종류 또는 여러종을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 제공한다. 또는 약학적 조성물로 사용하기 위해서는 본 발명의 펩타이드를 엑소좀 또는 APC 표면에 제시할 수 있다. 덧붙여, 본 발명의 펩타이드 중 하나를 표적으로 하는 본 발명의 CTL 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 유효 성분으로 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 치료적 유효량 또는 약학적 유효량의 상기 유효 성분을 포함할 수 있다.
- [0150] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 백신으로 사용될 수 있다. 본 발명과 관련해서 "백신"("면역원성 조성물"이라고도 불린다)이라는 용어는 동물에 접종했을 때, 항종양 작용을 초래하는 면역 반응을 유도하는 기능을 갖는 조성물을 가리킨다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 항종양 작용을 초래하는 면역 반응을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, APC, CTL 및 약학적 조성물에 의해 유도되는 면역 반응은 항종양 작용을 초래하는 면역 반응이면 특별히 한정되지 않지만, 예시적으로는 암세포에 특이적인 CTL의 유도 및 암 세포에 특이적인 세포 독성 활성의 유도를 포함한다.
- [0151] 본 발명의 약학적 조성물은 인간인 대상 또는 환자에서 암을 치료 및 / 또는 예방하기 위해, 및 / 또는 수술 후 이의 재발을 예방하기 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 HLA-A01 양성의 대상에 대해서, 바람직하게 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 암을 치료 및 / 또는 예방하기 위해, 및 / 또는 수술 후 이의 재발을 예방하기 위해, 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0152] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물의 제조에 있어서 다음 중에서 선택되는 유효 성분의 사용을 제공한다 :
- [0153] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0154] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0155] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0156] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0157] (e) 본 발명의 CTL.
- [0158] 또는, 본 발명은 나아가 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 제공한다 :
- [0159] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0160] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0161] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0162] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0163] (e) 본 발명의 CTL.
- [0164] 또는, 본 발명은 나아가 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서, 다음 중에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분 및 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체를 제제화하는 단계를 포함하는 방법 또는 공정을 제공한다 :
- [0165] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0166] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0167] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;

- [0168] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면상에 제시하는 엑소좀; 및
- [0169] (e) 본 발명의 CTL.
- [0170] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는 방법 또는 공정을 제공한다 :
- [0171] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0172] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0173] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면상에 제시하는 APC;
- [0174] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면상에 제시하는 엑소좀; 및
- [0175] (e) 본 발명의 CTL.
- [0176] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 HLA-A01 및 CDCA1를 발현하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서 다음 중에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다 :
- [0177] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0178] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0179] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면상에 제시하는 APC;
- [0180] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면상에 제시하는 엑소좀; 및
- [0181] (e) 본 발명의 CTL.
- [0182] 본 발명에 있어서, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 강력하고 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 HLA-A01 제한적인 에피토프 펩타이드로 발견되었다. 따라서, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드의 적어도 하나를 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 HLA 항원으로 HLA -A01(예 : HLA-A * 01 : 01)을 갖는 대상에 투여에 특히 적합하다. 동일하게 이러한 펩타이드 중 하나를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드(즉, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드), 이러한 펩타이드를 제시하는 APC 또는 엑소좀(즉, 본 발명의 APC 또는 엑소좀) 및 이러한 펩타이드를 표적으로 하는 CTL(즉, 본 발명의 CTL)를 포함한 약학적 조성물에도 해당된다. 즉 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드에 대한 유효 성분을 포함하는 약학적 조성물은 HLA-A01를 가진 대상(즉, HLA-A01 양성 대상)에 투여에 적합하다. 더 바람직한 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 서열 번호 : 8의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물이다.
- [0183] 본 발명의 약학적 조성물에 의해 치료 및 / 또는 예방되는 암은 CDCA1를 발현하는 암이면 특별히 한정되지 않고, 각종 암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암 등을 포함한다.
- [0184] 본 발명의 약학적 조성물은 전술한 유효 성분과 더불어, 암세포에 CTL을 유도하는 능력을 갖는 기타 펩타이드(예를 들면 다른 TAA 유래의 펩타이드 CTL 유도성 펩타이드), 해당 기타 펩타이드를 코딩하는 기타 폴리 뉴클레오티드, 해당 기타 펩타이드를 제시하는 기타 세포 등을 포함할 수 있다.
- [0185] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드 등의 상기 유효 성분의 항종양 효과가 저해되지 않는 한, 기타 치료 물질 또는 유효 성분으로 임의로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 항염증 조성물, 진통제, 화학요법약 등을 임의로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물 자체에 기타 치료 물질을 포함하는 것에 더해, 본 발명의 약학적 조성물을 하나 또는 여러 개의 기타 약학적 조성물과 연속 또는 동시에 투여할 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물 및 기타 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 사용하는 약학적 조성물의 종류, 치료하는 질환 및 투여 스케줄과 경로에 의존한다.
- [0186] 본 명세서에서 구체적으로 언급되는 성분에 덧붙여, 본 발명의 약학적 조성물은 제제의 종류를 고려하여 당 기술 분야에서 관례적인 기타 성분도 포함할 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0187] 본 발명은 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 포함하는 제품 또는 키트를 제공한다. 본 발명의 제품 또는 키트는 본 발명의 약학적 조성물을 수용한 용기를 포함할 수 있다. 적절한 용기의 예로는 병, 유리병 및 시험관을 들

수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 용기는 유리 또는 플라스틱 등 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기에는 라벨이 부착되어 있어도 되며, 라벨에는 본 발명의 약학적 조성물이 사용되어야 하는 질환 또는 질환의 상태를 기재할 수 있다. 라벨은 또한 투여 등에 관한 지시도 나타낼 수 있다.

[0188] 본 발명의 제품 또는 키트는 본 발명의 약학적 조성물을 수용한 용기에 덧붙여, 임의로 약학적으로 허용되는 희석제를 수용하는 제2의 용기를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 제품 또는 키트는 다른 완충액, 희석제, 필터, 주사 바늘, 주사기 및 사용 설명을 기재한 첨부 문서 등의 상업적 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 기타 재료를 더 포함할 수 있다.

[0189] 필요에 따라 유효 성분을 포함하는 하나 또는 여러개의 단위 제형을 포함할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치에서, 본 발명의 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 해당 팩은 예를 들어, 블리스터 팩과 같은 금속 호일 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여에 대한 설명서가 첨부될 수 있다.

[0190] (1) 유효 성분으로 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물

[0191] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물은 필요하다면 기존의 제제화법에 따라 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드 이외에 의약품에 통상적으로 사용되는 담체, 부형제 등을 특별히 제한없이 필요에 따라 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 사용 가능한 담체의 예로는 멸균수(예를 들어 주사용수), 생리 식염수, 인산 완충액, 인산 완충 생리 식염수, 트리스 완충 생리 식염수, 0.3 % 글리신, 배양액 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요에 따라 안정제, 현탁액, 보존제, 계면 활성제, 용해 보조제, pH 조절제, 응집 억제제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 특이적인 면역을 유도할 수 있기 때문에 암의 치료 또는 예방의 목적으로 사용할 수 있다.

[0192] 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 멸균수(예를 들어, 주사용수), 생리 식염수, 인산 완충액, 인산 완충 생리 식염수, 트리스 완충 생리 식염수 등의 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 수용성 담체에 용해되고, 필요에 따라 안정제, 현탁액, 보존제, 계면 활성제, 용해 보조제, pH 조절제, 응집 억제제 등을 첨가한 후, 해당 펩타이드 용액을 멸균함으로써 제조할 수 있다. 펩타이드 용액의 멸균 방법은 특별히 한정되지 않지만, 여과 멸균하는 것이 바람직하다. 여과 멸균은 예를 들어, 0.22 μm 이하의 기공 크기의 여과 멸균 필터를 이용하여 할 수 있다. 여과 멸균 후의 펩타이드 용액은 이에 한정되지 않지만, 예를 들면, 주사제로 대상에게 투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 펩타이드 용액을 동결 건조함으로써 동결 건조 제제로 제조할 수 있다. 동결 건조 제제는 상기와 같이 제조된 펩타이드 용액을 앰플, 유리병 또는 플라스틱 용기 등의 적절한 용기에 충전한 후, 동결 건조를 실시하여 복압 후에 멸균 세척한 고무 마개 등으로 용기를 봉입하여 제조할 수 있다. 동결 건조 제제는 투여 전에 멸균수(예를 들어, 주사용수), 생리 식염수, 인산 완충액, 인산 완충 생리 식염수, 트리스 완충 생리 식염수 등의 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 수용성 담체에 재용해한 후 대상에 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 예에는 이러한 여과 멸균된 펩타이드 용액의 주사제 및 해당 펩타이드 용액을 동결 건조한 동결 건조 제제가 포함된다. 또한 이러한 동결 건조 제제 및 재용해액을 포함하는 키트 또한 본 발명에 포함된다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물인 동결 건조 제제가 수용되는 용기와, 그 재용해액이 수납되어 있는 용기를 포함하는 키트도 본 발명에 포함된다.

[0193] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드의 2 종류 또는 그 이상의 종류의 조합을 포함할 수도 있다. 펩타이드의 조합은 펩타이드가 혼합된 각테일의 형태를 취해도 되며 또는 표준적인 기술을 이용하여 펩타이드를 서로 결합시켜도 된다. 예를 들어, 펩타이드를 화학적으로 결합시켜도 또는 단일 융합 폴리펩타이드 서열로 발현시켜도 된다. 본 발명의 펩타이드를 투여함으로써, 해당 펩타이드는 HLA 항원에 의해 APC상에 고밀도로 제시되고, 그 다음에 제시되는 펩타이드와 해당 HLA 항원 사이에 형성된 복합체에 대하여 특이적으로 반응하는 CTL이 유도된다. 또는 대상으로부터 APC(예를 들어, DC)을 꺼내 다음에 본 발명의 펩타이드에 의해 자극하여 본 발명의 펩타이드 중 어느 하나를 자신의 세포 표면에 제시하는 APC를 얻는다. 이 APC를 대상으로 다시 투여하여, 해당 대상에서 CTL을 유도하고 결과적으로 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 공격성을 증대시킬 수 있다.

[0194] 본 발명의 약학적 조성물은 세포성 면역을 효율적으로 확립하는 것으로 알려져 있는 아쥘반트(adjuvant)도 또한 포함할 수 있다. 아쥘반트는 면역학적 활성을 갖는 항원과 함께(또는 연속적으로) 투여한 경우에, 해당 항원에 대한 면역 반응을 증강하는 화합물을 말한다. 아쥘반트로는, 예를 들면 Clin Microbiol Rev 1994, 7 : 277-89 등의 문헌에 기재되어 있는 공지된 것을 사용할 수 있다. 적절한 아쥘반트의 예로는 알루미늄염(인산 알루미늄, 수산화 알루미늄, 옥시 수산화 알루미늄 등), 명반, 콜레라 독소, 살모넬라 독소, 불완전 프라운드 아쥘반트(Incomplete Freund's adjuvant(IFA)) 완전 프라운드 아쥘반트(Complete Freund's adjuvant(CFA)),

ISCOMatrix, GM-CSF 기타 면역 자극성 사이토카인, CpG 모티브를 포함하는 올리고데옥시 뉴클레오타이드(CpG7909 등), 수중 유형 에멀전, 사포닌 또는 그 유도체(QS21 등), 리피드 A 또는 그 유도체(QS21 등) 등의 리포다당(MPL, RC529, GLA, E6020 등), 리포펩타이드, 락토페린(lactoferrin), 플라게린(flagellin), 이중 가닥 RNA 또는 그 유도체(폴리 IC 등), 박테리아 DNA, 이미다조퀴놀린(이미키모드(Imiquimod), R848 등), C 형 렉틴 리간드(트레할로스 디베헨산(trehalose-6,6'-dibehenate : TDB) 등), CD1d 리간드(α -갈락토실세라미드 등), 스쿠알렌 에멀전(MF59, AS03, AF03 등), PLGA 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 아쥬반트는 일반적으로 면역학적 활성을 갖는 항원(즉 본 발명의 펩타이드)에 대하여 그 면역원성의 증강 또는 강화에 유효한 양을 배합할 수 있다. 아쥬반트는 본 발명의 약학적 조성물을 포함하는 키트에서 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물과는 다른 용기에 수용되어 있어도 된다. 이 경우, 해당 아쥬반트와 해당 약학적 조성물은 연속하여 대상에 투여되어도 되고, 대상에 투여 직전에 혼합되어도 된다. 이러한 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물 및 아쥬반트를 포함하는 키트도 또한, 본 발명에 의해 제공된다. 본 발명의 약학적 조성물이 동결 건조 제제인 경우에는, 해당 키트는 또한 재용해액을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물이 수용되는 용기와 아쥬반트가 수납되어 있는 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 해당 키트는 필요에 따라 재용해액이 수납되어 있는 용기를 더 포함할 수 있다.

[0195] 아쥬반트로 유성 아쥬반트를 사용하는 경우에는 본 발명의 약학적 조성물은 에멀전으로 제조되어도 된다. 에멀전은 예를 들면, 상기와 같이 제조된 펩타이드 용액과 유성 아쥬반트를 혼합 · 교반하여 제조할 수 있다. 펩타이드 용액은 동결 건조 후에 재용해 된 것이어도 된다. 에멀전은 W / O 형 에멀전 및 O / W 형 에멀전의 어느 것이라도 좋지만, 높은 면역 반응 증강 효과를 얻기 위해서는 W / O 형 에멀전인 것이 바람직하다. 유성 아쥬반트로 IFA를 바람직하게 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 에멀전의 제조는 대상에 투여되기 직전에 행해져도 되며, 이 경우에는 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드 용액 및 유성 아쥬반트를 포함하는 키트로 제공되어도 된다. 본 발명의 약학적 조성물이 동결 건조 제제인 경우에는, 해당 키트는 또한 재용해액을 포함할 수 있다.

[0196] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드를 봉입한 리포솜 제제, 직경수 마이크로미터의 비즈에 펩타이드가 결합되어 있는 과립 제제 또는 펩타이드에 지질이 결합된 제제여도 된다.

[0197] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 또한 약학적으로 허용되는 염 형태로 투여할 수 있다. 염의 바람직한 예로는 알칼리 금속(리튬, 칼륨, 나트륨 등)의 염, 알칼리 토류 금속의 염(칼슘, 마그네슘 등), 기타 금속(구리, 철, 아연, 망간 등)의 염, 유기 염기의 염, 아민염, 유기산(아세트산, 포름산, 프로피온산, 푸마르산, 말산, 숙신산, 주석산, 구연산, 말산, 옥살산, 벤조산, 메탄 설폰산 등)의 염 및 무기산(염산, 인산, 브롬화 수소산, 황산, 질산 등)의 염이 포함된다. 따라서, 본 발명의 펩타이드의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물 또한, 본 발명에 포함된다. 또한 "본 발명의 펩타이드"는 유리체의 펩타이드 외에 그 약학적으로 허용되는 염이 포함된다.

[0198] 몇가지 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 CTL을 자극하는 성분을 더 포함할 수 있다. 지질은 바이러스 항원에 대한 생체 내에서 CTL을 자극할 수 있는 물질로서 동정되었다. 예를 들어, 팔미트산 잔기를 리신 잔기의 ϵ 아미노기와 α 아미노기에 부착시킨 다음 본 발명의 펩타이드에 연결시킬 수 있다. 이어 지질이 부가된 펩타이드를 미셀 또는 입자 상태로 직접 투여하거나 리포솜 중에 통합시켜 투여하거나 아쥬반트 중에 유화시켜 투여할 수 있다. CTL 응답의 지질에 의한 자극의 다른 예로서 적절한 펩타이드에 공유 결합되어 있는 경우, 트리팔미토일-S-글리세릴시스테인-세틸-세린(P3CSS) 등의 대장균(E.coli) 리포단백질을 사용하여 CTL을 자극할 수 있다(예를 들어, Deres et al., Nature 1989, 342 : 561-4을 참조하기 바람).

[0199] 본 발명의 펩타이드 또는 약학적 조성물의 투여 방법의 예로는 경구, 피부 내, 피하, 근육 내, 골 내, 복막 및 정맥 내 주사 등 및 전신 투여 또는 표적 부위 근처에 국소 투여가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 바람직한 투여 방법으로는 거드랑이 또는 사타구니 등의 림프절 근처에 피하 주사를 들 수 있다. 투여는 단회 투여하여 수행할 수도 있고, 또는 여러 번 투여에 의해 향상될 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 암을 치료하기 위한 치료적 또는 약학적 유효량 또는 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역(보다 구체적으로는 CTL)을 유도하기 위한 치료적 또는 약학적 유효량으로 대상에 투여할 수 있다. 본 발명의 펩타이드의 용량은 치료되는 질환, 환자의 연령, 체중, 투여 방법 등에 따라 적절히 조정할 수 있으며, 이것은 각 본 발명의 펩타이드에 대해 보통 0.001mg ~ 1000mg, 예를 들면 0.01mg ~ 100mg, 예를 들면 0.1mg ~ 30mg, 예를 들면 0.1mg ~ 10mg이며, 예를 들면 0.5mg ~ 5mg일 수 있다. 또한 투여 간격은 수일 ~ 수개월에 한 번일 수 있으며, 예를 들어 주 1회 간격으로 투여할 수 있다. 당 업자는 적절한 용량을 적절하게 선택할 수 있다.

- [0200] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 치료적 유효량의 본 발명의 펩타이드 및 약학적 또는 생리학적 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 치료적 유효량의 본 발명의 펩타이드, 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 담체 및 아쥘반트를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드를 0.001mg ~ 1000mg, 바람직하게는 0.01mg ~ 100mg, 보다 바람직하게는 0.1mg ~ 30mg, 더욱 바람직하게는 0.1mg ~ 10mg, 예를 들면 0.5mg ~ 5mg을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물이 주사제인 경우에는 본 발명의 펩타이드를 0.001mg / ml ~ 1000mg / ml, 바람직하게는 0.01mg / ml ~ 100mg / ml, 보다 바람직하게는 0.1mg / ml ~ 30mg / ml, 더욱 바람직하게는 0.1mg / ml ~ 10mg / ml, 예를 들면 0.5mg / ml ~ 5mg / ml의 농도로 포함할 수 있다. 이 경우, 예를 들어 0.1 ~ 5ml, 바람직하게는 0.5ml ~ 2ml의 본 발명의 약학적 조성물을 주사를 통해 대상에 투여할 수 있다.
- [0201] 또는, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 약학적 조성물을 대상에 투여하는 것을 포함하는 암 치료 및 / 또는 예방하기 위한 및 / 또는 수술 후 이의 재발을 예방하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 펩타이드는 위와 같이 보통 0.001mg ~ 1000mg, 예를 들면 0.01mg ~ 100mg, 예를 들면 0.1mg ~ 30mg, 예를 들면 0.1mg ~ 10mg이며, 예를 들면 0.5mg ~ 5mg을 1 회 투여에서 대상으로 투여할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 아쥘반트와 함께 대상에게 투여된다. 또한 투여 간격은 수일 ~ 수개월에 한 번, 바람직하게는 수일 ~ 1개월에 한 번 간격일 수 있으며, 예를 들어, 주 1 회 또는 2 주에 1 회 간격일 수 있다.
- [0202] 본 발명의 CDCA1 펩타이드는 HLA-A01 제한적인 CTL 유도 작용을 갖는다. 즉, 그 치료 효과도 HLA-A01 양성 대상에서 유효하다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CDCA1 펩타이드의 투여에 앞서 미리 HLA-A01 양성 대상을 선택할 수 있다. 또한, 본 발명의 CDCA1의 치료 효과가 CDCA1 특이적이므로 대상의 암이 CDCA1을 발현하고 있는 것도 바람직 조건이 된다. 즉 본 발명의 암 치료 방법은 CDCA1 펩타이드의 투여에 앞서, HLA-A01 양성인 대상을 선택하는 공정과, CDCA1을 발현하고 있는 암을 가지고 있는 대상을 선택하는 공정을 포함할 수 있다.
- [0203] (2) 유효 성분으로 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물
- [0204] 본 발명의 약학적 조성물은 또한, 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 "발현 가능한 형태로"라는 용어는 폴리 뉴클레오티드가 세포에 도입된 경우에 본 발명의 펩타이드가 발현되는 것을 의미한다. 예시적인 실시예에서, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드의 서열은 본 발명의 펩타이드의 발현에 필요한 조절 요소를 포함한다. 본 발명의 폴리 뉴클레오티드는 표적 세포의 게놈에 대한 안정된 삽입이 달성되는 데 필요한 서열을 대비할 수 있다(상동 재조합 카세트 벡터의 설명에 관해서는 예를 들어 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51 : 503-12을 참조하기 바람). 예를 들어, Wolff et al., Science 1990, 247 : 1465-8; 미국 특허 제 5,580,859 호; 제 5,589,466 호; 제 5,804,566 호; 제 5,739,118 호; 제 5,736,524 호; 제 5,679,647 호; 및 WO98 / 04720 참조하기 바람. DNA에 기반한 송달 기술의 예는 "naked DNA", 촉진된(부피바카인(bupivacaine), 폴리머, 펩타이드 매개성) 송달, 양이온 지질 복합체 및 입자 매개("유전자 총") 또는 압력 매개성의 송달이 포함된다(예를 들어, 미국 특허 제 5,922,687 호를 참조하기 바람).
- [0205] 바이러스 벡터 또는 세균 벡터에 의해 본 발명의 펩타이드를 발현시킬 수도 있다. 발현 벡터의 예로는 백신시아(vaccinia) 바이러스 또는 계두(fowlpox) 바이러스 등의 약독화 바이러스 숙주가 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드를 발현시키기 위한 벡터로서 백신시아 바이러스를 사용할 수 있다. 숙주에 도입하면 재조합 백신시아 바이러스는 면역원성 펩타이드를 발현하고 이를 통해 면역 반응을 유발한다. 면역화 프로토콜에 유용한 백신시아 벡터 및 방법은 예를 들어 미국 특허 제 4,722,848 호에 기재되어 있다. 다른 벡터는 BCG(갈뎃겔란 간균)이다. BCG 벡터는 Stover et al., Nature 1991, 351 : 456-60에 기재되어 있다. 치료적인 투여 또는 면역화에 유용한 다양한 다른 벡터, 예를 들면 아데노 바이러스 벡터 및 아데노 연관 바이러스 벡터, 레트로 바이러스 벡터, 티푸스균(Salmonella typhi) 벡터, 무독화 탄저균 독소 벡터 등이 명백하다. 예를 들어, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6 : 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68 : 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14 : 571-85 참조하기 바람.
- [0206] 본 발명의 폴리 뉴클레오티드의 환자내에서의 송달은 직접이어도 되고, 이 경우에는 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 보유하는 벡터에 환자를 직접 노출할 수 있다. 또는 간접적이어도 되며, 이 경우에는 우선 시험관 내에서 세포를 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 보유하는 벡터로 형질 전환한 다음, 해당 세포를 환자 내에 이식한다. 이 두 가지 접근 방식은 각각 생체 내 및 생체 외의 유전자 치료로 공지된다.
- [0207] 유전자 치료 방법의 일반적인 총설에 관해서는 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12 : 488-505; Wu

and Wu, Biotherapy 1991, 3 : 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33 : 573-96; Mulligan, Science 1993, 260 : 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62 : 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11 (5) : 155-215을 참조하기 바란다. 본 발명에 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술 분야에서 일반적으로 공지 방법은 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 및 Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990에 기재되어 있다. 투여 방법은 경구, 피부 내, 피하, 정맥 주사 등이어도 되고, 전신 투여 또는 표적 부위 근처에 국소 투여가 사용된다. 투여는 단회 투여하여 수행할 수도 있고, 또는 여러 번 투여에 의해 향상될 수 있다. 본 발명의 폴리 뉴클레오티드는 암을 치료하기 위한 치료적 또는 약학적 유효량 또는 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역(더 구체적으로는 CTL)을 유도하기 위한 치료적 또는 약학적 유효량으로 대상에게 투여할 수 있다. 적절한 담체 중의 폴리 뉴클레오티드의 용량 또는 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드에서 형질 전환된 세포 중의 폴리 뉴클레오티드의 용량은 치료되는 질환, 환자의 연령, 체중, 투여 방법 등에 따라 적절히 조정할 수 있으며, 이것은 보통 0.001mg ~ 1000mg, 예를 들면 0.01mg ~ 100mg, 예를 들면 0.1mg ~ 30mg, 예를 들면 0.1mg ~ 10mg, 예를 들면 0.5mg ~ 5mg일 수 있다. 투여 간격은 수일에 한번 ~ 수개월에 한번일 수 있으며, 예를 들어 주 1회 간격으로 투여할 수 있다. 당 업자는 적절한 용량을 적절히 선택할 수 있다.

[0208] X. 펩타이드, 엑소좀, APC 및 CTL을 이용하는 방법

[0209] 본 발명의 펩타이드 및 폴리 뉴클레오티드를 이용하여 APC 및 CTL을 유도할 수 있다. 본 발명의 엑소좀 및 APC를 사용하여 CTL을 유도할 수도 있다. 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, 엑소좀 및 APC는 그 CTL 유도능이 저해되지 않는 한, 임의의 다른 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, APC 및 엑소좀 중 어느 하나를 포함하는 약학적 조성물을 이용하여 본 발명의 CTL을 유도할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드 또는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물을 이용하여 본 발명의 APC를 유도할 수 있다.

[0210] (1) APC를 유도하는 방법

[0211] 본 발명은 본 발명의 펩타이드 또는 폴리 뉴클레오티드를 이용하여 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는 방법을 제공한다.

[0212] 본 발명의 방법은 APC를 본 발명의 펩타이드와 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 접촉시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, APC를 해당 펩타이드와 생체 외로 접촉시키는 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다 :

[0213] (a) 대상에서 APC를 회수하는 단계; 및

[0214] (b) 단계 (a)의 APC를 본 발명의 펩타이드와 접촉시키는 단계.

[0215] 상기 APC는 특정 종류의 세포에 한정되지 않고, 림프구에 의해 인식되도록 자신의 세포 표면에 단백질 항원을 제시하는 것으로 알려져 있는 DC, 랑겔 한스 세포, 대식세포, B 세포 및 활성화 T 세포를 사용할 수 있다. DC는 APC에서 가장 강력한 CTL 유도능을 가지고 있기 때문에, 바람직하게는 DC를 사용할 수 있다. 본 발명의 임의의 펩타이드를 단독으로 또는 본 발명의 다른 펩타이드와 함께 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드와 다른 CTL 유도성 펩타이드(예를 들어, 다른 TAA 유래의 CTL 유도 펩타이드)를 조합하여 사용할 수도 있다.

[0216] 한편, 본 발명의 펩타이드를 대상으로 투여한 경우, APC는 해당 펩타이드와 생체 내에서 접촉하여 결과적으로 높은 CTL 유도능을 갖는 APC가 해당 대상의 체내에서 유도된다. 따라서 본 발명의 방법은 본 발명의 펩타이드를 대상으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 발현 가능한 형태로 대상에 투여하는 경우, 본 발명의 펩타이드가 생체 내에서 발현되고 이것이 APC와 생체 내에서 접촉하여 결과적으로 높은 CTL 유도능을 갖는 APC가 해당 대상의 체내에서 유도된다. 따라서 본 발명은 또한, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 대상으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0217] 본 발명은 또한 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하기 위해, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0218] (a) 대상에서 APC를 회수하는 단계; 및

[0219] (b) 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 단계 (a)의 APC에 도입하는 단계.

[0220] 단계 (b)는 "VI. 항원 제시 세포 (APC)"의 장에서 상술한 바와 같이 수행할 수 있다.

[0221] 따라서 하나의 실시예에서, 본 발명은 다음의 (a) 또는 (b) 단계를 포함하는 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는

방법을 제공한다 :

[0222] (a) APC를 본 발명의 펩타이드에 접촉시키는 단계;

[0223] (b) 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하는 단계.

[0224] 또한, 본 발명은 다음의 (a) 또는 (b) 단계를 포함하는 CTL 유도능을 갖는 APC를 제조하는 방법을 제공한다 :

[0225] (a) APC를 본 발명의 펩타이드에 접촉시키는 단계;

[0226] (b) 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하는 단계.

[0227] 상기의 방법은 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내 중의 어느 것이든 실시할 수 있지만, 시험관 내 또는 생체 외로 하는 것이 바람직하다. 상기 방법에서 사용되는 APC는 유도된 APC의 투여가 예정되어 있는 대상에서 유래하는 것이라도 좋으나, 다른 대상에 유래하는 것일 수 있다. 투여가 예정되어 있는 대상과 다른 대상(기증자)에서 유래한 APC를 사용하는 경우, 투여 대상자와 기증자의 HLA 형은 동일할 필요가 있다. 본 발명의 방법에 있어서, 본 발명의 펩타이드로서 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 또는 변형 펩타이드를 사용하는 경우, 투여 대상자와 기증자의 HLA 형은 모두 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)인 것이 바람직하다. 또는 위의 방법으로 사용하는 APC는 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)를 발현하는 APC인 것이 바람직하다. APC는 기증자로부터 채취된 혈액에서 비중원심분리법 등으로 PBMC를 분리한 후, 해당 PBMC로부터 공지의 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0228] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0229] 또는, 본 발명은 나아가 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하기 위한 약학적 조성물의 제조에 있어서, 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드의 사용을 제공한다.

[0230] 또는, 본 발명은 나아가 CTL 유도능을 갖는 APC의 유도에 사용하기 위한 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 제공한다.

[0231] 또는, 본 발명은 나아가 APC를 유도하기 위한 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서, 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드 및 약학적으로 또는 생리적으로 허용되는 담체를 제제화하는 단계를 포함하는 방법 또는 공정을 제공한다.

[0232] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하기 위한 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서, 본 발명의 펩타이드 또는 해당 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는 방법 또는 공정을 제공한다.

[0233] 본 발명의 방법에 의해 유도된 APC는 CDCA1에 특이적인 CTL(즉 본 발명의 CTL)을 유도할 수 있다.

[0234] (2) CTL을 유도하는 방법

[0235] 본 발명은 또한, 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, 엑소좀 또는 APC를 사용하여 CTL을 유도하는 방법을 제공한다.

[0236] 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, 엑소좀 또는 APC를 대상으로 투여하면 해당 대상의 체내에서 CTL이 유도되고 CDCA1을 발현하는 암세포를 표적으로하는 면역 반응의 강도가 증강된다. 따라서 본 발명의 방법은 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, APC 또는 엑소좀을 대상으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0237] 또는 그것들을 시험관 내 또는 생체 외로 사용함으로써 CTL을 유도할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다 :

[0238] (a) 대상에서 APC를 회수하는 단계;

[0239] (b) 단계 (a)의 APC를 본 발명의 펩타이드와 접촉시키는 단계 및

[0240] (c) 단계 (b) APC를 CD8 양성 T 세포와 공동 배양하는 단계.

[0241] 유도된 CTL은 그 후 대상으로 되돌려도 된다.

[0242] 상기 단계 (c)에서 CD8 양성 T 세포와 공동 배양하는 APC는 "VI. 항원 제시 세포 (APC) "장에서 상술한 바와 같이, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하여 제조할 수 있다. 그러나, 본 발명의

방법에서 사용되는 APC는 이에 한정되지 않고, HLA 항원과 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 임의의 APC를 사용할 수 있다.

- [0243] 본 발명의 방법에서는 그러한 APC 대신 HLA 항원과 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀을 사용할 수도 있다. 즉, 본 발명의 방법은 HLA 항원과 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀을 공동 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 그런 엑소좀은 "V. 엑소좀"장에서 상술한 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0244] 또한 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 있는 TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 CD8 양성 T 세포에 도입하여 CTL을 유도할 수도 있다. 이러한 형질 도입은 "VIII.T 세포 수용체 (TCR) "장에서 상술한 바와 같이 할 수 있다.
- [0245] 따라서 하나의 실시예에서, 본 발명은 다음 중에서 선택되는 단계를 포함하는 CTL을 유도하는 방법을 제공한다 :
- [0246] (a) CD8 양성 T 세포를 HLA 항원과 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC와 공동 배양하는 단계;
- [0247] (b) CD8 양성 T 세포를 HLA 항원과 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀과 공동 배양하는 단계; 및
- [0248] (c) 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 본 발명의 펩타이드에 결합할 수 TCR의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를, CD8 양성 T 세포에 도입하는 단계.
- [0249] 상기의 방법은 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내의 어느 것이든 실시할 수 있지만, 시험관 내 또는 생체 외로 하는 것이 바람직하다. 상기 방법에서 사용되는 APC 또는 엑소좀 및 CD8 양성 T 세포가 유도된 CTL의 투여가 예정되어 있는 대상에 유래하는 것이어도 되지만, 다른 대상에 유래하는 것이어도 된다. 투여가 예정되어 있는 대상과 다른 대상(기증자)에서 유래하는 APC 또는 엑소좀 및 CD8 양성 T 세포를 사용하는 경우, 투여 대상자와 기증자의 HLA 형은 동일할 필요가 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드로서 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 또는 변형 펩타이드를 사용하는 경우, 투여 대상자와 기증자 HLA 형은 모두 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)인 것이 바람직하다. 또는 상기의 방법으로 사용하는 APC 또는 엑소좀은 HLA-A01(보다 바람직하게는 HLA-A * 01 : 01)와 본 발명의 펩타이드(서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 또는 이의 변형 펩타이드)와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC 또는 엑소좀인 것이 바람직하다. 이 경우 유도된 CTL은 HLA-A01와 본 발명의 펩타이드와의 복합체를 제시하는 세포(예를 들어 CDCA1을 발현하는 HLA-A01 양성 세포)에 대하여 특이적인 세포 독성 활성을 나타낸다.
- [0250] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 다음 중에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분을 포함하는 CTL을 유도하기 위한 조성물 또는 약학적 조성물을 제공한다 :
- [0251] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0252] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0253] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC; 및
- [0254] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀.
- [0255] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 CTL을 유도하기 위한 조성물 또는 약학적 조성물의 제조에 있어서 다음 중에서 선택되는 유효 성분의 사용을 제공한다 :
- [0256] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0257] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0258] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC; 및
- [0259] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀.
- [0260] 또는, 본 발명은 또한 CTL의 유도에 사용하기 위한 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 제공한다 :
- [0261] (a) 본 발명의 펩타이드;

- [0262] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0263] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC; 및
- [0264] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀.
- [0265] 또는, 본 발명은 나아가 CTL을 유도하기 위한 조성물 또는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서 다음 중에서 선택되는 유효 성분 및 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체를 제제화하는 단계를 포함하는 방법 또는 공정을 제공한다 :
- [0266] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0267] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0268] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC; 및
- [0269] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀.
- [0270] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 CTL을 유도하기 위한 조성물 또는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는 방법 또는 공정을 제공한다 :
- [0271] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0272] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0273] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC; 및
- [0274] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀.
- [0275] XI. 면역 반응을 유도하는 방법
- [0276] 또한 본 발명은 CDCA1을 발현하는 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 적용 가능한 암에는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암 등이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 또한 암은 HLA-A01을 발현하는 것이 바람직하다.
- [0277] 본 발명은 또한 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. CDCA1은 위와 같은 각종 암에서 과잉 발현되고 있는 것이 인정된다. 따라서 CDCA1을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응이 유도되면, 결과적으로 암 세포의 증식이 저해된다. 따라서, 본 발명은 또한 CDCA1을 발현하는 암세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 특히 CDCA1과 HLA-A01을 발현하는 암세포의 증식 저해에 적합하다.
- [0278] 본 발명의 방법은 본 발명의 펩타이드 중 어느 하나 또는 그것들을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 또한, 본 발명의 펩타이드 중 어느 하나를 제시하는 엑소좀 또는 APC의 투여를 기도한다. 자세한 내용은 "IX. 약학적 조성물"의 항, 특히 본 발명의 약학적 조성물의 백신으로서의 사용에 대해 기재하고 있는 부분을 참조하기 바란다. 이와 더불어, 면역 반응을 유도하기 위해 본 발명의 방법에 사용할 수 있는 엑소좀 및 APC는 상기의 "V. 엑소좀", "VI. 항원 제시 세포(APC)", 및 "X. 펩타이드, 엑소좀, APC 및 CTL을 사용하는 방법"의 (1) 및 (2) 항에서 자세히 설명되어 있다.
- [0279] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 CDCA1과 HLA-A01을 발현하는 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학적 조성물 또는 백신으로서 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 포함하는 약학적 조성물 또는 백신을 제공한다 :
- [0280] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0281] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0282] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0283] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0284] (e) 본 발명의 CTL.
- [0285] 또는, 본 발명은 나아가 CDCA1과 HLA-A01을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학적 조성물 또는 백신으로서 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 포함하는 약학적 조성물 또는 백신을 제공한다 :

- [0286] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0287] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0288] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0289] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0290] (e) 본 발명의 CTL.
- [0291] 또는, 본 발명은 나아가 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암세포의 증식을 저해하기 위한 약학적 조성물 또는 백신으로서 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 포함하는 약학적 조성물 또는 백신을 제공한다 :
- [0292] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0293] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0294] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0295] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0296] (e) 본 발명의 CTL.
- [0297] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학적 조성물 또는 백신의 제조에 있어서 다음 중에서 선택되는 유효 성분의 사용을 제공한다 :
- [0298] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0299] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0300] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0301] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0302] (e) 본 발명의 CTL.
- [0303] 또는, 본 발명은 나아가 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학적 조성물 또는 백신의 제조에 있어서 다음 중에서 선택되는 유효 성분의 사용을 제공한다 :
- [0304] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0305] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0306] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0307] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0308] (e) 본 발명의 CTL.
- [0309] 또는, 본 발명은 나아가 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암세포의 증식을 저해하기 위한 약학적 조성물 또는 백신의 제조에 있어서 다음 중에서 선택되는 유효 성분의 사용을 제공한다 :
- [0310] (a) 본 발명의 펩타이드;
- [0311] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;
- [0312] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;
- [0313] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0314] (e) 본 발명의 CTL.
- [0315] 본 발명은 또한 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암에 대한 면역 반응을 유도하는 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법 또는 공정으로서, 본 발명의 펩타이드를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 혼합 또는 제제화하는 단계를 포함할 수 있는 방법을 제공한다.
- [0316] 또는, 본 발명은 다음 중에서 선택되는 유효 성분을 포함한 백신 또는 약학적 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함하는 혈관 신생에 의해 매개되는 질환의 질환 부위에서 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암 세포의 증식을 저해

하기 위한 방법 또는 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다 :

[0317] (a) 본 발명의 펩타이드;

[0318] (b) 본 발명의 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 폴리 뉴클레오티드;

[0319] (c) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 APC;

[0320] (d) 본 발명의 펩타이드를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀; 및

[0321] (e) 본 발명의 CTL.

[0322] 본 발명과 관련해서 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, APC, 엑소좀 및 / 또는 CTL을 투여함으로써 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암을 치료할 수 있다. 또는, 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, APC, 엑소좀 및 / 또는 CTL을 투여함으로써 CDCA1를 발현하는 암에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 이러한 암의 예로는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암 등이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 본 발명의 펩타이드, 폴리 뉴클레오티드, APC, 엑소좀 및 / 또는 CTL을 투여함으로써 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암세포에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 따라서 위의 유효 성분을 포함한 백신 또는 약학적 조성물을 투여하기 전에 치료 대상 질환 부위의 CDCA1의 발현 수준이 증강되었는지 여부를 확인하는 것이 바람직하다. 마찬가지로 치료의 대상이 HLA-A01 양성임을 확인하는 것도 바람직하다. 즉, 본 발명은 바람직한 실시예에서, HLA-A01 양성에서 CDCA1를 발현하는 암을 갖는 대상을 선택하고 선택된 대상에 본 발명의 백신 또는 약학적 조성물을 투여할 수 있다.

[0323] 따라서, 하나의 실시예에서, 본 발명은 CDCA1와 HLA-A01을 발현하는 암의 치료를 필요로 하는 환자에 해당 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 다음의 단계를 포함한다 :

[0324] i) 암이 있는 HLA-A01 양성 대상 질환 부위에서 채취된 생체 시료 중의 CDCA1의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0325] ii) i)에서 측정된 CDCA1의 발현 수준에 기초하여 CDCA1를 발현하는 암을 갖는 대상을 특정하는 단계; 및 iii) 상기 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 정상대조와 비교하여 CDCA1를 과잉 발현하는 암을 갖는 대상에게 투여하는 단계.

[0326] 또는, 본 발명은 또한 CDCA1를 발현하는 암을 가진 HLA-A01 양성 대상에 투여하기 위한, 상기의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분을 포함하는 백신 또는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 상기의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분으로 치료하는 대상을 특정 또는 선택하는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 다음의 단계를 포함한다 :

[0327] i) 암이 있는 HLA-A01 양성 대상 질환 부위에서 채취된 생체 시료 중의 CDCA1의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0328] ii) i)에서 측정된 CDCA1의 발현 수준에 따라 CDCA1를 발현하는 암을 갖는 대상을 특정하는 단계; 및

[0329] iii) ii)에서 특정된 대상을 상기의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분으로 치료될 수 있는 대상으로 특정 또는 선택하는 단계.

[0330] 상기의 방법에서 CDCA1의 발현 수준을 측정하기 위해 대상에서 채취되는 생체 시료는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 생검 등에서 채취된 암세포를 포함한 조직 시료를 바람직하게 사용할 수 있다. 생체 시료 중의 CDCA1의 발현 수준은 공지된 방법으로 측정할 수 있으며, 예를 들어, CDCA1 유전자의 전사 산물을 프로브 및 PCR법으로 검출하는 방법(예를 들면, cDNA 마이크로어레이법, 노던 블랏법, RT-PCR법 등), CDCA1 유전자의 번역 산물을 항체 등으로 검출하는 방법(예를 들어, 웨스턴 블랏법, 면역 염색법 등) 등을 사용할 수 있다. 또한 생체 시료는 혈액 시료도 좋고, 이 경우에는 CDCA1 대한 항체의 혈중 수준을 측정하고 해당 혈중 수준에 기반하여 질환 부위에서 CDCA1의 발현 수준을 평가해도 된다. CDCA1 대한 항체의 혈중 수준의 측정은 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있으며, 예를 들어, CDCA1 단백질과 본 발명의 펩타이드를 항원으로 이용한 효소 면역 측정법(EIA), 효소 결합 면역 흡착 측정법(ELISA) 및 방사 면역 측정법(RIA) 등을 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드에 특이적인 CTL을 검출하여 질환 부위의 CDCA1의 발현 수준을 평가해도 된다. 본 발명의 펩타이드에 특이적인 CTL 수준의 측정은, 예를 들어 대상에서 채취된 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 본 발명의 펩타이드를 펄스한 표적 세포에 대한 세포 독성 활성을 측정함으로써 수행할 수 있다. 세포 독성 활성의 측정은, 예를 들어 인터페론 γ 의 방출량 등으로 측정할 수 있다. 또한 다음에 기술된 본 발명의 펩타이드와 HLA와의 복합체도 CTL 수준의 측정에 사용할 수 있다. 또한 대상이 가지는 암이 CDCA1을 발현하고 있는지 여부를 판단은 암을 갖지 않

는 대상에서 채취된 동종의 생체 재료의 측정 결과와 비교하여 수행할 수 있다. 즉, 암을 갖지 않는 대상에서 채취된 동종의 생체 재료에 있어서 측정 대상물의 수준(정상 대조 수준)과 비교하여 암을 갖는 대상에서 채취된 생체 시료의 해당 수준이 상승하고 있는 경우에는 암을 갖는 대상의 암은 CDCA1을 발현하고 있다고 판단할 수 있다.

[0331] 바람직한 실시예에서는 상기의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분을 투여하기 전에 대상의 HLA 형을 확인하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드에 대한 유효 성분의 투여 대상으로는 HLA-A01 양성 대상의 대상을 선택하는 것이 바람직하다. 대상의 HLA는 대상에서 채취한 세포 표면의 HLA를 HLA-A01 특이 항체에 의해 면역학적으로 검출하여 확인할 수 있다. 또는 대상에서 채취한 세포에서 얻은 게놈 DNA와 mRNA의 유전자 정보 해석을 통해 대상의 HLA를 결정할 수도 있다. 본 발명은 대상이 HLA-A01 양성이면 유효한 치료를 기대할 수 있다. 즉, HLA-A01를 호모 또는 헤테로로 갖는 대상을 투여의 대상으로 할 수 있다.

[0332] 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드와 HLA와의 복합체를 제공한다. 상기 본 발명의 복합체는 단량체이어도 다량체이어도 된다. 본 발명의 복합체가 다량체일 경우, 중합수는 특별히 한정되지 않고, 임의의 중합수의 다량체일 수 있다. 예로는 4량체, 5량체, 6량체 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한 텍스트라머(dextramer)(WO2002 / 072631), 스트렙타머(streptamer)(Knabel M et al., Nat Med. 2002; 8 (6) : 631-7.)도 본 발명의 다량체에 포함된다. 본 발명의 펩타이드와 HLA와의 복합체는 공지의 방법에 따라 제조할 수 있다(예를 들어, Altman JD et al., Science.1996,274 (5284) : 94-6, WO2002 / 072631, WO2009 / 003492, Knabel M et al., Nat Med. 2002; 8 (6) : 631-7. 등). 본 발명의 복합체는 예를 들어, 본 발명의 펩타이드에 특이적인 CTL의 정량에 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물을 투여한 대상에서 혈액 시료를 채취하여 PBMC를 분리한 후 CD4 음성 세포를 조정하여, 형광 색소를 결합시킨 본 발명의 복합체 및 해당 CD4 음성 세포를 접촉시킨다. 그 후, 플로우 사이토메트리(flow cytometry)로 해석함으로써, 본 발명의 펩타이드에 특이적인 CTL의 비율을 측정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 전, 투여 중 및 / 또는 투여 후에 본 발명의 펩타이드에 특이적인 CTL을 측정함으로써, 본 발명의 약학적 조성물에 의한 면역 반응 유도 효과를 모니터링할 수 있다.

[0333] XII. 항체

[0334] 본 발명은 나아가 본 발명의 펩타이드에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 항체는 본 발명의 펩타이드에 특이적으로 결합하여 본 발명의 펩타이드가 아닌 것에는 결합하지 않는다(또는 약하게 결합한다). 항체의 결합 특이성은 저해 시험에서 확인할 수 있다. 즉, 분석하는 항체와 전장 CDCA1 폴리펩타이드 사이의 결합이 본 발명의 펩타이드의 존재하에서 저해되는 경우, 이 항체가 본 발명의 펩타이드에 특이적으로 결합됨을 나타낸다. 본 발명의 펩타이드에 대한 항체는 질환의 진단 및 예후 진단 분석, 및 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상의 선택 및 본 발명의 약학적 조성물의 모니터링에 사용될 수 있다.

[0335] 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드 또는 그 단편을 검출 및 / 또는 정량하기 위한 다양한 면역학적 분석 방법을 제공한다. 이러한 면역학적 분석 방법은 방사 면역 측정법, 면역 크로마토그래피법, 효소 결합 면역 흡착 측정법(ELISA), 효소 결합 면역 형광 측정법(ELIFA) 등을 포함하되 이에 국한되지 않는, 당 기술 분야에서 잘 알려진 다양한 면역학적 분석 형식의 범위 내에서 이루어진다.

[0336] 본 발명의 항체는 CDCA1을 발현하는 질환을 검출할 수 있는 면역학적 이미징 방법에 사용될 수 있으며, 그 예는 본 발명의 표지 항체를 사용하는 방사성 스inti그래피 이미징 방법(radioactive scintigraphic imaging)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 분석 방법은 CDCA1을 발현하는 암의 검출, 모니터링 및 예후 진단에 있어서 임상적으로 사용되며, 그러한 암의 예로는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암 등이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0337] 본 발명의 항체는 예를 들어 모노 클로날 항체 또는 폴리 클로날 항체 등의 임의의 형태로 사용할 수 있으며, 토끼 등의 동물을 본 발명의 펩타이드로 면역함으로써 얻은 항혈청, 모든 클래스의 폴리 클로날 항체 및 모노 클로날 항체, 인간 항체 및 유전자 재조합에 의해 제작된 키메라 항체 및 인간화 항체를 더 포함할 수 있다.

[0338] 항체를 얻기 위한 항원으로 사용되는 본 발명의 펩타이드 또는 그 단편은 본 명세서에 개시된 아미노산 서열에 기반하여 화학 합성에 의해 또는 유전자 공학적 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0339] 면역 항원으로 사용되는 펩타이드는 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 펩타이드의 단편일 수 있다. 또한 면역

원성을 높이기 위해 펩타이드를 담체와 결합 또는 연결시켜도 된다. 담체로서 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole limpet hemocyanin(KLH))이 잘 알려져 있다. KLH와 펩타이드를 결합하는 방법도 또한 본 기술 분야에서 잘 알려져 있다.

[0340] 임의의 포유 동물을 상기 항원에 면역할 수 있지만, 모노 클로날 항체를 제작하는 경우에는 세포 융합에 사용되는 모세포와의 적합성을 고려하는 것이 바람직하다. 일반적으로 설치목(Rodentia), 토끼목(Lagomorpha) 또는 영장목(Primate)의 동물을 사용할 수 있다. 설치목과의 동물에는, 예를 들어 생쥐(mice), 쥐(rats) 및 햄스터(hamsters)가 포함된다. 토끼목과의 동물에는, 예를 들어 토끼가 포함된다. 영장목과의 동물에는, 예를 들어 필리핀 원숭이(Macaca fascicularis), 붉은털 원숭이, 망토 개코 원숭이 및 침팬지 등의 협비원류(Catarrhini) (구 세계 원숭이) 원숭이가 포함된다.

[0341] 동물을 항원으로 면역하는 방법은 본 기술 분야에서 공지되어 있다. 항원의 복강 내 주사 또는 피하 주사는 포유 동물을 면역하기 위한 표준적인 방법이다. 보다 구체적으로는 항원을 적당량의 인산 완충 식염수(PBS), 생리 식염수 등으로 희석하여 현탁시킨다. 필요에 따라 항원 현탁액을 프라운드 완전 아쥬반트 등의 적당량의 표준 아쥬반트와 혼합하여 유화한 후, 포유 동물에 투여할 수 있다. 그 후, 적당량의 프라운드 불완전 아쥬반트와 혼합한 항원을 4 ~ 21 일 간격으로 여러 차례 투여하는 것이 바람직하다. 면역화에 적절한 담체를 이용해도 좋다. 상기와 같이 면역한 후 혈청을 원하는 항체의 양의 증가에 대해 표준적인 방법으로 알아낼 수 있다.

[0342] 본 발명의 펩타이드에 대한 폴리 클로날 항체는 면역 후 혈청 중의 원하는 항체 수준의 상승이 확인된 포유 동물에서 혈액을 회수하고 임의의 기준법에 의해 혈액에서 혈청을 분리하여 제조할 수 있다. 폴리 클로날 항체는 폴리 클로날 항체를 포함하는 혈청이어도 좋고, 또 폴리 클로날 항체를 포함하는 분획을 해당 혈청에서 단리시켜도 된다. 면역글로불린 G 또는 M은 본 발명의 펩타이드만을 인식하는 분획에서 예를 들어, 본 발명의 펩타이드를 결합시킨 친화성 컬럼을 사용하여 이 분획을 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼을 사용하여 더 정제하여 제조할 수 있다.

[0343] 모노 클로날 항체를 제조하기 위해서는 면역 후 혈청 중의 원하는 항체 수준의 상승을 확인한 후, 포유 동물에서 면역 세포를 회수하고, 세포 융합에 제공한다. 세포 융합에 사용되는 면역 세포는 바람직하게 비장에서 얻을 수 있다. 상기 면역 세포와 융합되는 다른 한쪽의 모세포, 예를 들어, 포유 동물의 골수종 세포, 바람직하게는 약물에 의한 융합 세포의 선택을 위한 특성을 획득한 골수종 세포를 사용할 수 있다.

[0344] 공지의 방법, 예를 들면, Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73 : 1981, 3-46)의 방법에 따라 상기의 면역 세포와 골수종 세포를 융합시킬 수 있다.

[0345] 세포 융합에 의해 얻어진 하이브리도마는 그들을 HAT 배지(히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함하는 배지) 등의 표준 선택 배지 중에서 배양하여 선택할 수 있다. 세포 배양은 전형적으로 HAT 배지 중에서 원하는 하이브리도마를 제외한 다른 모든 세포(비융합세포)가 사멸하는데 충분한 기간(예를 들면 수일에서 수주일)에 걸쳐 계속된다. 그 후, 표준적인 한계 희석을 하여, 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 스크리닝 및 클로닝할 수 있다.

[0346] 하이브리도마를 제조하기 위해 비인간 동물을 항원으로 면역하는 상기의 방법과 더불어, EB 바이러스에 감염된 림프구 등의 인간 림프구를 펩타이드, 펩타이드를 발현하는 세포 또는 그 용해물로 시험관 내에서 면역할 수도 있다. 이어서 면역 후 림프구를 U266 등의 무한 분열 가능한 인간 유래 골수종 세포와 융합시켜, 해당 펩타이드에 결합할 수 있는 원하는 인간 항체를 생성하는 하이브리도마를 얻을 수 있다(특 63-17688 호).

[0347] 이어서, 얻어진 하이브리도마를 마우스의 복강 내에 이식하여 복수를 추출한다. 얻어진 모노 클로날 항체는 예를 들면, 황산 암모늄 침전, 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼, DEAE 이온 교환 크로마토그래피, 또는 본 발명의 펩타이드를 결합시킨 친화성 컬럼을 통해 정제할 수 있다.

[0348] 또는 면역한 림프구 등의 항체를 생성하는 면역 세포를 암 유전자에 의해 불사화하여 모노 클로날 항체의 제조에 사용할 수 있다.

[0349] 이렇게 얻어진 모노 클로날 항체는 유전자 조작 기법을 이용하여 재조합에 의해 제조할 수도 있다(예를 들어, MacMillan Publishers LTD (1990)에 의해 영국에서 간행된 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies를 참조하기 바람). 예를 들어, 항체를 코딩하는 DNA를, 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 면역화 림프구 등의 면역 세포에서 클로닝하고 적절한 벡터에 삽입한 후 숙주 세포에 도입하여 재조합 항체를 제조할 수 있다. 본 발명은 또한, 상기와 같이 제조된 재조합 항체를 제공한다.

- [0350] 또한, 본 발명의 항체는 본 발명의 펩타이드에 결합하는 한, 항체 단편 또는 수식 항체이어도 된다. 예를 들어, 항체 단편은 Fab, F(ab')₂, Fv 또는 H 사슬 및 L 사슬 유래의 Fv 단편이 적절한 링커에 의해 연결되어 있는 단일 가닥 Fv(scFv)일 수 있다(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85 : 5879-83). 보다 구체적으로는 항체 단편은 항체를 파쇄된 또는 펩신과 같은 효소로 처리하여 제조할 수 있다. 또는 항체 단편을 코딩하는 유전자를 구축하고 발현 벡터에 삽입하고 적절한 숙주 세포 내에서 발현시킬 수 있다(예를 들면, Co et al., J Immunol 1994, 152 : 2968-76; Better and Horwitz, Methods Enzymol 1989, 178 : 476-96; Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 1989, 178 : 497-515; Lamoyi, Methods Enzymol 1986, 121 : 652-63; Rousseaux et al., Methods Enzymol 1986, 121 : 663-9; Bird and Walker, Trends Biotechnol 1991, 9 : 132-7을 참조하기 바람).
- [0351] 항체는 폴리 에틸렌 글리콜(PEG) 등의 다양한 분자와의 결합에 의해 수식할 수 있다. 본 발명은 그러한 수식 항체를 제공한다. 수식 항체는 항체를 화학적으로 수식함으로써 얻을 수 있다. 이러한 수식법은 당 기술 분야에서 관례적이다.
- [0352] 또는, 본 발명의 항체는 비인간 항체에서 유래하는 가변 영역과 인간 항체에서 유래하는 정상 영역 사이의 키메라 항체로 또는 비인간 항체에서 유래하는 상보성 결정 영역(CDR)과 인간 항체에서 유래하는 프레임 워크 영역(FR) 및 정상 영역을 포함하는 인간화 항체로 얻을 수 있다. 이러한 항체는 공지의 기술에 따라 제조할 수 있다. 인간화는 비인간 항체의 CDR 배열에서 인간 항체의 대응하는 서열을 치환함으로써 실시할 수 있다(예를 들어, Verhoeven et al., Science 1988, 239 : 1534-6을 참조하기 바람). 따라서 이러한 인간화 항체는 실질적으로 온전하지 않은 인간 가변 도메인이 비인간종 유래의 해당 서열로 치환된 키메라 항체이다.
- [0353] 인간 프레임워크 영역 및 정상 영역 외에, 인간 가변 영역을 포함하는 온전한 인간 항체를 사용할 수도 있다. 이러한 항체는 당 기술 분야에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 시험관 내 방법에는 박테리오파지에 제시된 인간 항체 단편의 재조합 라이브러리의 사용이 포함된다(예를 들어, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 1991 227 : 381). 마찬가지로, 인간 면역 글로불린 유전자 자리를 내인성 면역 글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 트랜스제닉 동물, 예를 들면 마우스에 도입함으로써 인간 항체를 제조할 수 있다. 이 방법은 예를 들어 미국 특허 제 6,150,584 호, 제 5,545,807 호; 제 5,545,806 호; 제 5,569,825 호; 제 5,625,126 호; 제 5,633,425 호; 제 5,661,016 호에 기재되어 있다.
- [0354] 상기와 같이하여 얻어진 항체가 균일하게 될 때까지 정제할 수 있다. 예를 들어, 일반적인 단백질에 사용되는 분리법 및 정제법에 따라 항체의 분리 및 정제를 할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지 않지만, 친화성 크로마토그래피 등의 컬럼 크로마토그래피, 필터, 한외 여과, 염석, 투석, SDS 폴리 아크릴 아미드 겔 전기 영동 및 등전점 전기 영동의 사용을 적절하게 선택하고 조합하여 항체를 분리 및 단리할 수 있다(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). 단백질 A 컬럼 및 단백질 G 컬럼을 친화성 컬럼으로 사용할 수 있다. 이용되어야 하는 예시적인 단백질 A 컬럼은 예를 들어, Hyper D, POROS 및 Sepharose F.F. (Pharmacia)가 포함된다.
- [0355] 예시적인 크로마토그래피에는 친화성 크로마토그래피 이외에, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과, 역상 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 등이 포함된다(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). 크로마토그래피 단계는 HPLC 및 FPLC 등의 액상 크로마토그래피에 의해 실시할 수 있다.
- [0356] 예를 들어, 흡광도 측정, 효소 결합 면역 흡착 측정법(ELISA), 효소 면역 측정법(EIA), 방사 면역 측정법(RIA) 및 / 또는 면역 형광법(IF)을 이용하여 본 발명의 항체 항원 결합 활성을 측정할 수 있다. ELISA의 경우, 본 발명의 항체를 플레이트 상에 고정화하여 본 발명의 펩타이드를 해당 플레이트에 첨가한 후 항체 생성 세포의 배양 상청액 또는 정제 항체와 같은 원하는 항체를 포함하는 시료를 첨가한다. 이어서 1차 항체를 인식하고, 알칼리 인산 분해 효소 등의 효소로 표지된 2차 항체를 첨가하고, 플레이트를 인큐베이팅한다. 이어서 세척 후, p-니트로 페닐 인산 등의 효소 기질을 해당 플레이트에 첨가하여 흡광도를 측정하여 시료의 항원 결합 활성을 평가한다. 항체의 결합 활성을 평가하기 위해 C 말단 또는 N 말단 단편 등의 펩타이드 단편을 항원으로 사용하여도 된다. 본 발명의 항체의 활성을 평가하기 위해 BIAcore(Pharmacia)을 이용해도 된다.
- [0357] 본 발명의 항체를 본 발명의 펩타이드를 포함하는 것으로 여겨지는 시료에 폭로하고 해당 항체와 해당 펩타이드에 의해 형성된 면역 복합체를 검출 또는 측정함으로써, 상기와 같은 방법으로 본 발명의 펩타이드의 검출 또는

측정이 가능하게 된다.

[0358] 예를 들어, 본 발명의 항체는 대상의 혈액 시료(예를 들어 혈청 시료) 안에 존재하는 본 발명의 펩타이드를 검출하기 위해 사용할 수도 있다. 또는 반대로, 대상의 혈액 시료(예를 들어 혈청 시료) 안에 존재하는 본 발명의 항체를 본 발명의 펩타이드를 이용하여 검출할 수도 있다. 대상의 혈액 시료 중에서 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 항체를 측정할 결과는 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상의 선택, 또는 본 발명의 약학적 조성물의 효과를 모니터링하는 데 도움을 줄 수 있다.

[0359] XIII. 벡터 및 숙주 세포

[0360] 본 발명은 또한, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 해당 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 벡터는 숙주 세포 중에 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 유지하기 위해, 숙주 세포에 본 발명의 펩타이드를 발현시키기 위해, 또는 유전자 치료용으로 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 투여하기 위해 사용될 수 있다.

[0361] 대장균이 숙주 세포이며 벡터를 대장균(예를 들어 JM109, DH5 α , HB101 또는 XL1-Blue) 내에서 증폭하여 대량으로 생성하는 경우, 벡터는 대장균 내에서 증폭하기 위한 "복제 기점"과 형질 전환된 대장균을 선택하기 위한 마커 유전자(예를 들어, 앰피실린, 테트라 사이클린, 카나마이신, 클로람페니콜 등의 약물에 의해 선택되는 약물 내성 유전자)를 가질 필요가 있다. 예를 들어, M13계 벡터, pUC 벡터, pBR322, pBluescript, pCR-Script 등을 이용할 수 있다. 더불어, pGEM-T, pDIRECT 및 pT7 또한 상기 벡터와 마찬가지로 클로닝을 위해 사용될 수 있다. 벡터를 본 발명의 펩타이드의 생산에 사용하는 경우에는 발현 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 대장균 내에서 발현시키는 발현 벡터는 대장균 내에서 증폭하기 위해 상기의 특징을 가질 필요가 있다. JM109, DH5 α , HB101 또는 XL1-Blue 등의 대장균을 숙주 세포로 사용하는 경우, 벡터는 대장균에서 원하는 유전자를 효율적으로 발현할 수 있는 프로모터 예를 들어, lacZ 프로모터 (Ward et al., Nature 1989 341 : 544-6; FASEB J. 1989 6 : 2422-7), araB 프로모터 (Better et al., Science 1988, 240 : 1041-3), T7 프로모터 등이 있을 필요가 있다. 이 점에 관해서 예를 들어, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress 시스템" (Qiagen), pEGFP 및 pET(이 경우, 숙주는 바람직하게는 T7 RNA 중합 효소를 발현하는 BL21임)을 상기의 벡터 대신 사용할 수 있다. 또한 벡터는 펩타이드 분비를 위한 신호 서열을 포함할 수 있다. 펩타이드를 대장균의 주변 세포질에 분비시키는 예시적인 신호 배열은 pelB 신호 배열 (Lei et al., J Bacteriol. 1987, 169 : 4379)이다. 벡터를 표적 숙주 세포에 도입하는 방법으로는 예를 들어 염화칼슘법 및 일렉트로포레이션법이 포함된다.

[0362] 대장균과 더불어, 예를 들면, 포유 동물 유래의 발현 벡터(예를 들어, pcDNA3(Invitrogen) 및 pEGF-BOS(Nucleic Acids Res 1990, 18 (17) : 5322), pEF, pCDM8), 곤충 세포 유래의 발현 벡터(예를 들어, "Bac-to-BAC 바콜로 바이러스 발현계" (GIBCO BRL), pBacPAK8), 식물 유래의 발현 벡터(예를 들어, pMH1, pMH2), 동물 바이러스 유래의 발현 벡터(예를 들어, pHSV, pMV, pAdexLcw), 레트로 바이러스 유래의 발현 벡터(예를 들어, pZIpneo), 효모 유래의 발현 벡터(예를 들어, "피키아 (Pichia) 발현 키트" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) 및 고초균(Bacillus subtilis) 유래의 발현 벡터(예를 들어, pPL608, pKTH50)를 본 발명의 폴리펩타이드의 생산에 사용할 수 있다.

[0363] 벡터를 CHO, COS 또는 NIH3T3 세포 등의 동물 세포 내에서 발현시키기 위해 벡터는 이러한 세포의 발현에 필요한 프로모터, 예를 들어, SV40 프로모터 (Mulligan et al., Nature 1979, 277 : 108), MMLV-LTR 프로모터, EF1 α 프로모터 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. 1990, 18 : 5322), CMV 프로모터 등, 및 바람직하게는 형질 전환체를 선택하기 위한 마커 유전자(예를 들어, 약물(예를 들어, 네오 마이신, G418)에 의해 선택되는 약물 내성 유전자)을 가질 필요가 있다. 이러한 특징을 갖는 공지의 벡터의 예로는, 예를 들면 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV 및 pOP13이 포함된다.

[0364] 상기 설명에 근거한 본 발명의 실시예를 다음에 예시하지만, 본 발명은 이에 한정되지 않는다.

[0365] [1] 다음 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 세포 독성 T 세포(CTL) 유도능을 갖는 15 아미노산 미만의 펩타이드 :

[0366] (a) 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열; 및

[0367] (b) 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열에 대해, 1 개, 2 개, 3 개 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가되어 있는 아미노산 서열.

[0368] [2] 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열에 대해, 다음

의 (a) ~ (c)에서 선택되는 1 이상(즉, 1 개, 2 개 또는 3 개)의 치환이 된 아미노산 서열을 포함하는, [1]에 기재된 펩타이드 :

- [0369] (a) N 말단에서 2 번째 아미노산이 트레오닌과 세린로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 치환됨;
- [0370] (b) N 말단에서 3 번째 아미노산이 아스파르트산 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 치환됨; 및
- [0371] (c) C 말단의 아미노산이 티로신으로 치환됨.
- [0372] [3] 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 [1]에 기재된 펩타이드.
- [0373] [4] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드.
- [0374] [5] 약학적으로 허용되는 담체와 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 포함하는 조성물 :
- [0375] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0376] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드;
- [0377] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0378] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0379] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0380] [6] 상기 성분이 다음의 (a) ~ (d)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분이며, CTL을 유도하기 위한 조성물인 [5]에 기재된 조성물 :
- [0381] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0382] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드;
- [0383] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포(APC); 및
- [0384] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소좀.
- [0385] [7] 약학적 조성물인 [5]에 기재된 조성물.
- [0386] [8] (i) 암의 치료, (ii) 암 예방 및 (iii) 암 수술 후 재발의 예방으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 용도를 위한 약학적 조성물인 [7]에 기재된 조성물.
- [0387] [9] 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 [7]에 기재된 조성물.
- [0388] [10] 암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 [8] 또는 [9]에 기재된 조성물.
- [0389] [11] HLA-A01 양성인 대상에 대한 투여를 위해 제제화되는 [5] ~ [10] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0390] [12] 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 단계를 포함하는 CTL 유도능을 갖는 APC를 유도하는 방법 :
- [0391] (a) APC를 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 접촉시키는 단계, 및
- [0392] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 APC에 도입하는 단계.

- [0393] [13] 다음의 (a) ~ (c)로 이루어진 군에서 선택되는 단계를 포함하는 CTL을 유도하는 방법 :
- [0394] (a) CD8 양성 T 세포를 HLA 항원과 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC와 공동 배양하는 단계;
- [0395] (b) CD8 양성 T 세포를 HLA 항원과 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 엑소좀과 공동 배양하는 단계 및
- [0396] (c) 세포 표면에 HLA 항원에 의해 제시된 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드에 결합할 수 있는 T 세포 수용체(TCR)의 각 서브 유닛을 코딩하는 폴리 뉴클레오티드를 CD8 양성 T 세포에 도입하는 단계.
- [0397] [14] HLA 항원과 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와의 복합체를 자신의 표면에 제시하는 APC.
- [0398] [15] [12]에 기재된 방법에 의해 유도되는 [14]에 기재된 APC.
- [0399] [16] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0400] [17] [13]에 기재된 방법에 의해 유도되는 [16]에 기재된 CTL.
- [0401] [18] 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 대상으로 투여하는 단계를 포함하는 암에 대한 면역 반응을 유도하는 방법 :
- [0402] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0403] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드;
- [0404] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0405] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0406] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0407] [19] 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 대상으로 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 및 / 또는 예방하는 및 / 또는 수술 후 이의 재발을 예방하는 방법 :
- [0408] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0409] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드;
- [0410] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0411] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0412] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0413] [20] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드에 결합하는 항체.
- [0414] [21] CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 스크리닝하는 방법으로서 다음의 단계를 포함하는 방법 :
- [0415] (a) 서열 번호 : 1, 8, 10, 13, 25, 33 내지 35 및 37 중에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 원래의 아미노산 서열에 대하여 1 개, 2 개 또는 수 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 삽입 및 / 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 후보 서열을 생성하는 단계;
- [0416] (b) (a)에서 작성한 후보 서열 중에서 CDCA1 이외의 어떠한 공지된 인간 유전자 산물과도 유의한 상동성(서열 동일성)을 갖지 않는 후보 서열을 선택하는 단계;
- [0417] (c) (b)에서 선택된 후보 서열로 이루어진 펩타이드와 APC를 접촉시키는 단계;
- [0418] (d) (c)의 APC와 CD8 양성 T 세포를 접촉시키는 단계; 및

- [0419] (e) 원래의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드보다 동등하거나 더 높은 CTL 유도능을 가지는 펩타이드를 선택하는 단계.
- [0420] [22] 암에 대한 면역 반응을 유도하는 조성물의 제조에 있어서, 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유효 성분의 사용 :
- [0421] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0422] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리뉴클레오티드;
- [0423] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0424] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 엑소좀; 및
- [0425] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0426] [23] 암의 치료 및 / 또는 예방, 및 / 또는 수술 후 이의 재발의 예방을 위한 약학적 조성물의 제조에 있어서, 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분의 사용 :
- [0427] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0428] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리뉴클레오티드;
- [0429] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0430] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 엑소좀; 및
- [0431] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0432] [24] 암에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분의 사용 :
- [0433] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0434] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리뉴클레오티드;
- [0435] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0436] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 엑소좀; 및
- [0437] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0438] [25] 암을 치료 및 / 또는 예방하는 및 / 또는 수술 후 재발을 예방하기 위한 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분의 사용 :
- [0439] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0440] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리뉴클레오티드;
- [0441] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0442] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면상에 제시하는 엑소좀; 및

- [0443] (e) [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0444] [26] 다음의 (a) ~ (e)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 대상으로 투여하는 단계를 포함하는 CDCA1을 발현하는 세포에 대한 세포 독성 활성을 유도하는 방법 :
- [0445] (a) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드;
- [0446] (b) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 발현 가능한 형태로 코딩하는 1 종류 또는 여러 종류의 폴리 뉴클레오티드;
- [0447] (c) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 항원 제시 세포(APC);
- [0448] (d) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드와 HLA 항원과의 복합체를 자신의 세포 표면에 제시하는 엑소좀; 및
- [0449] (e) [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 표적으로 하는 CTL.
- [0450] [27] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드를 포함하는 동결 건조 제제.
- [0451] [28] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드를 수용성 담체에 용해하여 여과 멸균하는 것을 포함하는 방법으로 제조된 약학적 조성물 .
- [0452] [29] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드 수용성 담체를 포함하는 수용액으로, 여과 멸균된 수용액.
- [0453] [30] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 1종류 또는 여러 종류의 펩타이드, 수용성 담체 및 유성 아췌반트를 포함하는 에멀전.
- [0454] [31] [5] ~ [11] 중 어느 한 항에 기재된 조성물이 수용되어 있는 용기 및 아췌반트가 수납되어 있는 용기를 포함하는 키트.
- [0455] [32] [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드를 포함하는 동결 건조 제제가 수납되어 있는 용기, 아췌반트가 수납되어 있는 용기 및 동결 건조 제제를 위한 재용해액을 수납되어 있는 용기를 포함한 키트. 본 발명의 키트는 바람직하게는, 또한 부가적으로 HLA-A01 검출 시약을 포함한다.
- [0456] 본 발명을 그 특정 실시예에 관하여 본 명세서에서 상세하게 설명하여 왔지만, 전술한 설명은 사실상 예시적이고 설명적인 것으로서, 본 발명 및 그 바람직한 실시예를 설명하는 것을 의도하고 있음을 이해해야 한다. 당업자는 관례적인 실험을 통해 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않고 다양한 변경 및 수정이 그 속에서 이루어질 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 따라서 본 발명은 상기의 설명에 의해 규정되는 것이 아니라 첨부된 특허 청구 범위 및 그 등가물에 의해 규정되는 것이 의도된다.
- [0457] 이하, 실시예를 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 재료, 방법 및 실시예는 본 발명의 어떤 형태의 제작 및 사용에 있어서 당업자를 지원하기 위해서 도움이 될 수 있는 한편, 본 발명의 국면을 설명하기 위한 것에 불과하며, 따라서 본 발명 범위를 결코 한정하는 것을 의도하지 않는다. 당업자는 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료를 본 발명의 실시 또는 시험에 사용할 수 있다.
- [0458] 실시예
- [0459] 재료 및 방법
- [0460] 세포주
- [0461] HLA-A 및 HLA-B 음성 인간 B 림프아구형 세포주인 C1R, 및 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주인 COS7는 ATCC에서 구입하였다.
- [0462] HLA-A * 01 : 01을 정상적으로 발현하는 표적 세포 제작
- [0463] HLA-A * 01 : 01을 정상적으로 발현하는 C1R 세포(C1R-A01)는 CTL을 자극하기 위한 세포로 사용되었다. HLA-A * 01 : 01 유전자를 코딩하는 cDNA를 PCR로 증폭하여 발현 벡터에 통합하였다. HLA-A * 01 : 01 유전자 발현 벡터를 도입한 C1R 세포를 G418(Invitrogen)를 포함하는 배지에서 2 주간 약제 선택 배양하였다. G418 내성 C1R 세포 현탁액을 희석한 후 96웰 플레이트에 파종하고 G418을 포함하는 배지에서 추가로 30 일간 선택

배양하였다. C1R 세포에서 HLA-A * 01 : 01의 발현을 플로우 사이토메트리 분석으로 확인하였다.

[0464] CDCA1 유래 펩타이드의 선택

[0465] HLA-A * 01 : 01에 결합이 기대되는 CDCA1 유래 8mer, 9mer 및 10mer 펩타이드를 결합 예측 서버 "NetMHC 3.2" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.2/) (Buus et al., Tissue Antigens 2003, 62 (5) : 378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003, 12 (5) : 1007-17, Lundegaard C et al., Bioinformatics 2008, 24 (11) : 1397-98), "BIMAS" (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) (Parker KC et al., J Immunol 1994, 152 (1) : 163-75) 및 "SYFPEITHI" (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) (Rammensee HG et al., Immunogenetics 1999, 50 (3-4) : 213-9)을 사용하여 결정하였다.

[0466] 펩타이드 합성

[0467] 펩타이드는 American Peptide Company (Sunnyvale, CA)에 의해 표준 고상 합성법에 따라 화학적으로 합성하여 역상 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 정제되었다. HPLC 및 질량 분석법에 의해 해당 펩타이드의 품질(순도 90 % 이상)이 보증되었다. 펩타이드는 디메틸설폭사이드에 용해되어(최종 농도 : 20mg / ml), - 80 겐에서 저장하였다.

[0468] 시험관 내에서의 CTL 유도

[0469] 단핵구 유래의 수지상 세포(DC)를 항원 제시 세포로 사용하여 인간 백혈구 항원(HLA) 상에 제시된 펩타이드에 대한 특이적인 세포 독성 T 림프구(CTL)을 유도하였다. 이미 문헌에 보고된 바와 같이 DC는 시험관 내에서 제조하였다(Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63 (14) : 4112-8). 구체적으로는, Ficoll-Paque plus(Pharmacia) 용액에 의해 정상적인 지원자(HLA-A * 01 : 01 양성)에서 채취한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 플라스틱제의 조직 배양 디쉬(Corning)에 뿌리고 PBMC 중 단핵구를 디쉬에 접촉시킨 후 1000 IU / ml의 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(R & D System) 및 1000 IU / ml의 인터루킨 (IL)-4(R & D System)의 존재하에서 7 일간 배양하였다. 배지로는 비활성화된 AB 형 혈청(MP Biomedicals)을 포함하는 AIM-V 배지(Invitrogen)을 이용하였다(2 % ABS / AIM-V 배지). 사이토 카인에 의해 단핵구에서 분화 유도된 DC에 20 µg / ml의 각 합성 펩타이드를 펄스하였다(37 겐, 3 시간). 펩타이드 펄스는 AIM-V 배지에서 실행하였다. 펩타이드를 펄스한 이 DC를 X 선 조사(20Gy)에 의해 불활성화하고, CD8 Positive Isolation Kit(Invitrogen)를 이용하여 얻은 자기 CD8 양성 T 세포와 1:20의 비율(1.5×10^4 개의 DC와 3×10^5 개의 CD8 양성 T 세포)로 혼합하여 48웰 플레이트(Corning)에서 배양하였다. 1 well 당 2 % ABS / AIM-V 배지량은 0.5ml로 하고, 거기에 IL-7(R & D System)를 첨가하였다(최종 농도 10ng / ml). 배양 개시부터 2 일 후, IL-2 (Novartis)를 첨가하였다(최종 농도 20IU / ml). 배양 7 일째 및 배양 14 일째에 펩타이드를 펄스한 DC로 CD8 양성 T 세포를 더욱 자극하였다. DC는 상기와 동일한 방법으로 사용시 제조하였다. 21 일째 이후(3 회 DC 자극 후) 펩타이드를 펄스한 C1R-A01에 대한 CD8 양성 T 세포의 IFN-γ 생산을 효소 결합 면역 스팟(ELISPOT) 분석으로 확인하였다(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84 (1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84 (8) : 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96 (8) : 498-506).

[0470] CTL 증식 단계

[0471] Riddell(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333 (16) : 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2 (2) : 216-23)에 의해 보고된 방법과 비슷한 방법을 이용하여 CTL을 증식시켰다. 조직 배양용 플라스크(FALCON)에서 마이트마이신 C로 처리한 2 종류의 인간 B 림프 아구형 세포주(각 5×10^6 개) 및 항 CD3 항체(BD biosciences, 최종 농도 : 40ng / ml)와 함께 CTL을 5 % ABS / AIM-V 배지에서 배양하였다(배양액량 25ml / 병). 배양을 시작한 다음날, IL-2를 해당 배양물에 첨가하였다(IL-2 최종 농도 120IU / ml). 5, 8 및 11 일째에 60IU / ml의 IL-2를 포함하는 5 % ABS / AIM-V 배지에 따른 배지 교환을 하였다(IL-2 최종 농도 : 30IU / ml) (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84 (1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84 (8) : 1052-7, Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97 (5) : 411-9, Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96 (8) : 498-506).

[0472] CTL 클론의 수립(한계 희석법)

[0473] 시험관 내에서의 CTL 유도 후, 96 둥근 바닥 마이크로 플레이트(Corning)에서 CTL을 1 개 / 웰 또는 10 개 / 웰 이 되도록 파종하였다. 마이트마이신 C로 처리한 2 종류의 인간 B 림프아구형 세포주(각 1×10^4 개), 항 CD3

항체(최종 농도 : 30ng / ml) 및 IL-2(최종 농도 : 125IU / ml)와 함께 CTL를 5 % ABS / AIM-V 배지에서 배양하였다(배양액량 150 μ l / 웰). 10 일 후, 500IU / ml의 IL-2를 포함하여 5 % ABS / AIM-V 배지 50 μ l를 해당 배양물에 첨가하였다. 14 일째 이후, ELISPOT 분석에서 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산을 나타낸 CTL을 앞서 기술한 방법으로 증식시켰다(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96 (8)) : 498-506).

[0474] IFN- γ 생산의 확인

펩타이드를 이용하여 유도된 CTL의 펩타이드 특이적 IFN- γ 생산을 확인하기 위해 IFN- γ ELISPOT 분석 및 IFN- γ ELISA를 실시하였다. 펩타이드를 펄스한 C1R-A01를 표적 세포로 제조하였다. IFN- γ ELISPOT 분석 및 IFN- γ ELISA는 분석 키트 제조자의 권장하는 절차에 따라 실시하였다.

[0476] CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01를 강제 발현시킨 표적 세포의 수립

CDCA1 또는 HLA-A * 01 : 01 유전자를 코딩하는 cDNA를 PCR로 증폭하였다. PCR 증폭 산물을 각각 발현 벡터에 통합하였다. 리포펙타민 2000(Invitrogen)를 사용하여 제조업자의 권장하는 절차에 따라 HLA 음성 세포주인 COS7 세포에 CDCA1 유전자 발현 벡터 및 HLA-A * 01 : 01 유전자 발현 벡터 중 하나 또는 모두를 도입하였다. 유전자 도입의 다음날 COS7 세포를 베르센(Invitrogen)을 이용하여 박리하고 표적 세포로 사용하였다.

[0478] 결과

[0479] CDCA1에서 유래한 HLA-A * 01 : 01 결합 펩타이드의 선택

표 1a, 표 1b 및 표 1c는 "NetMHC 3.2"에 의해 HLA-A * 01 : 01에 결합이 예측된 CDCA1 유래의 8mer, 9mer 및 10mer 펩타이드를 각각 결합 친화성이 높은 순으로 나타낸다. 표 2a 및 표 2b는 "BIMAS"에 의해 HLA-A * 01 : 01에 결합이 예측된 CDCA1 유래의 9mer 및 10mer 펩타이드를 결합 스코어가 높은 순으로 보여준다. 표 3a와 표 3b는 "SYFPEITHI"에 의해 HLA-A * 01 : 01에 결합이 예측된 CDCA1 유래 9mer 및 10mer 펩타이드를 결합 스코어가 높은 순으로 보여준다. 각 표에서 Start Position 숫자는 펩타이드의 첫 번째 아미노산이 CDCA1 단백질의 N 말단부터 계산하여 몇 번째에 해당하는지를 나타낸다. HLA-A * 01 : 01 결합능을 가질 가능성이 있는 총 39 종의 펩타이드를 에피토프 펩타이드 후보로 하였다.

[0481] [표 1a]

[0482] NetMHC3.2에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 8mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	친화성 (nM)	서열번호
138	YMEFLWQY	50	1

[0484] [표 1b]

[0485] NetMHC3.2에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 9mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	친화성 (nM)	서열번호
183	LSDGIQELQ	2486	2
49	YMRALQIVY	2570	3
325	ESDESELKK	3358	4
303	LSDNREKLA	6648	5
57	YGIRLEHFI	6700	6
380	VQEKRGAVY	8200	7

[0487] [표 1c]

[0488] NetMHC3.2에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 10mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	친화성(nM)	서열번호
136	ETymeFLWQY	92	8
66	MMPVNSEVMY	455	9
56	VYGIRLEHFY	1040	10
121	LSGIINFIFH	2410	11
287	PSCQLEVQLY	2630	12
48	IYMRALQIVY	2933	13
325	ESDESELKKL	4331	14
436	GIEKAAEDSY	4636	15
379	KVQEKRGAVY	4867	16
129	HFREACRETY	7569	17
335	KTEENSFKRL	8751	18
424	LNLKTALEKY	9039	19
451	KTAEKRRKMF	9261	20
146	KSSADKMQL	9961	21

[0489]

[0490] [표 2a]

[0491] BIMAS에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 9mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	스코어	서열번호
335	KTEENSFKR	112.5	22
41	KPEVLHMIY	56.25	23
25	GADGKNLTK	50	24
290	QLEVQLYQK	36	25
244	IVDSPEKLLK	10	26

[0492]

[0493] [표 2b]

[0494] BIMAS에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 10mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	스코어	서열번호
452	TAEKRRKMFK	90	27
91	HLDSFLPICR	25	28
323	QIESDESELK	18	29
290	QLEVQLYQKK	18	30
447	KIDEKTAELK	10	31
106	TADILCPKAK	10	32

[0495]

[0496] [표 3a]

[0497] SYFPEITHI에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 9mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	스코어	서열번호
130	FREACRETY	24	33
246	DSPEKLKNY	19	34
268	ARQEVVEKY	18	35
1	METLSFPRY	18	36
288	SCQLEVQLY	18	37

[0498]

[0499] [표 3b]

[0500] SYFPEITHI에 의해 HLA-A*01:01에 결합이 예상되는 CDCA1-유래 10 mer 펩타이드

개시위치	아미노산 서열	스코어	서열번호
303	LSDNREKLAS	18	38
245	VDSPEKLKNY	18	39

[0501]

[0502] HLA-A * 01 : 01 제한적인 CDCA1 유래 펩타이드에 의한 CTL 유도

[0503] CDCA1 유래 펩타이드 특이적 CTL을 "재료 및 방법"에 기재한 프로토콜에 따라 유도하였다. IFN- γ ELISPOT 분석에 의해서, 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산을 측정하였다(도 1).

[0504] CDCA1-A01-8-138 (서열 번호 : 1)을 이용한 웰 번호 # 1 (a)

[0505] CDCA1-A01-9-290 (서열 번호 : 25)를 이용한 웰 번호 # 7 (b)

[0506] CDCA1-A01-9-130 (서열 번호 : 33)를 이용한 웰 번호 # 5 (c)

[0507] CDCA1-A01-9-246 (서열 번호 : 34)를 이용한 웰 번호 # 7 (d)

[0508] CDCA1-A01-9-268 (서열 번호 : 35)를 이용한 웰 번호 # 1 (e)

[0509] CDCA1-A01-9-288 (서열 번호 : 37)를 이용한 웰 번호 # 3 (f)

[0510] CDCA1-A01-10-136 (서열 번호 : 8)을 이용한 웰 번호 # 2 (g)

[0511] CDCA1-A01-10-56 (서열 번호 : 10)를 이용한 웰 번호 # 6 (h) 및

[0512] CDCA1-A01-10-48 (서열 번호 : 13)를 이용한 웰 번호 # 6 (i)에서 대조 웰과 비교하여 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산이 인정되었다. 한편, 표 1b, 표 1c, 표 2a, 표 2b, 표 3a 및 표 3b에 도시된 그 외에 펩타이드에 대한 특이적인 IFN- γ 생산은 인정되지 않았다. 전형적인 음성 데이터의 예이지만, CDCA1-A01-10-66(서열 번호 : 9)에 대한 특이적 IFN- γ 생산은 인정되지 않았다(j). 어느 펩타이드도 HLA-A * 01 : 01에 결합할 수 있었지만, 결과적으로 CDCA1에 유래하는 9 종의 펩타이드를 강력한 CTL 유도능을 갖는 펩타이드로 선택하였다.

[0513] HLA-A * 01 : 01 제한적인 CDCA1 유래 펩타이드 특이적인 CTL 클론의 수립

[0514] IFN- γ ELISPOT 분석에서 CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8)에 대한 특이적인 IFN- γ 생산을 나타낸 웰 번호 # 2(도 1g), CDCA1-A01-10-56 (서열 번호 : 10)에 대한 특이적인 IFN- γ 생산을 나타낸 웰 번호 # 6(도 1h) 및 CDCA1-A01-10-48 (서열 번호 : 13)에 대한 특이적인 IFN- γ 생산을 나타낸 웰 번호 # 6(도 1i)의 세포에서 한 계 희석법에 의해 CTL 클론을 수립하였다. ELISA에 의한 IFN- γ 측정의 결과, CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8), CDCA1-A01-10-56(서열 번호 : 10) 또는 CDCA1-A01-10-48(서열 번호 : 13)로 자극된 CTL 클론은 펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산을 나타냈다(도 2).

[0515] CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01을 발현하는 표적 세포에 대한 CTL의 IFN- γ 생산

[0516] CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01을 발현하는 표적 세포에 대한 CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8) 특이적 CTL 클론의 IFN- γ 생산을 검증하였다. CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01 모두를 발현시킨 COS7 세포를 표적 세포로 제조하였다. CDCA1 또는 HLA-A * 01 : 01의 어느 한쪽을 발현시킨 COS7 세포를 음성 대조 세포로 제조하였다. CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8) 특이적 CTL 클론은 CDCA1 및 HLA-A * 01 : 01 모두를 발현시킨 COS7 세포에 대한 IFN- γ 생산을 나타냈다(도 3). 반면 음성 대조 세포에 대한 유의한 IFN- γ 생산은 인정되지 않았다. 이 때문에 CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8)이 항원 프로세싱에 의해 발생하는 펩타이드이며 또한 HLA-A01 분자와 함께 세포 표면에 제시되어 CTL에 의해 인식되는 것이 명확하게 입증되었다. 이 결과는 CDCA1-A01-10-136 (서열 번호 : 8)이, CDCA1의 발현이 항진하고 있는 암 환자를 대상으로 한, 암 백신으로 유용하다는 것을 시사하는 것이다.

[0517] 항원 펩타이드의 상동성 해석

[0518] CDCA1-A01-8-138(서열 번호 : 1), CDCA1-A01-9-290(서열 번호 : 25), CDCA1-A01-9-130(서열 번호 : 33), CDCA1-A01-9-246(서열 번호 : 34), CDCA1-A01-9-268(서열 번호 : 35), CDCA1-A01-9-288(서열 번호 : 37), CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8), CDCA1-A01-10-56(서열 번호 : 10) 및 CDCA1-A01-10-48(서열 번호 : 13)은

펩타이드 특이적인 IFN- γ 생산을 나타내는 CTL을 유도할 수 있는 것으로 확인되었다. 그래서 CDCA1-A01-8-138(서열 번호 : 1), CDCA1-A01-9-290(서열 번호 : 25), CDCA1-A01-9-130(서열 번호 : 33), CDCA1-A01-9-246(서열 번호 : 34), CDCA1-A01-9-268(서열 번호 : 35), CDCA1-A01-9-288(서열 번호 : 37), CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8), CDCA1-A01-10-56(서열 번호 : 10) 및 CDCA1-A01-10-48(서열 번호 : 13)의 서열이 CDCA1에만 유래하는지 확인하기 위해 BLAST 알고리즘([http : // blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))를 이용하여 펩타이드 서열의 상동성 해석을 실시하였다. 그 결과 CDCA1-A01-8-138(서열 번호 : 1), CDCA1-A01-9-290(서열 번호 : 25), CDCA1-A01-9-130(서열 번호 : 33), CDCA1-A01-9-246(서열 번호 : 34), CDCA1-A01-9-268(서열 번호 : 35), CDCA1-A01-9-288(서열 번호 : 37), CDCA1-A01-10-136(서열 번호 : 8), CDCA1-A01-10-56(서열 번호 : 10) 및 CDCA1-A01-10-48(서열 번호 : 13)의 서열은 CDCA1에서만 인정되었다. 따라서 본 발명자들이 알기로는 이 펩타이드는 CDCA1 특유의 것이며, 인간 면역 체계를 감작한다고 이미 알려진 같은 CDCA1 이외의 분자에 대한 의도하지 않은 면역 반응을 일으킬 가능성은 거의 없다고 여겨진다. 결론적으로, CDCA1 유래의 신규 HLA-A * 01 : 01 제한적인 에피토프 펩타이드가 동정되어, 암 면역요법에 적용될 수 있다는 것이 나타났다.

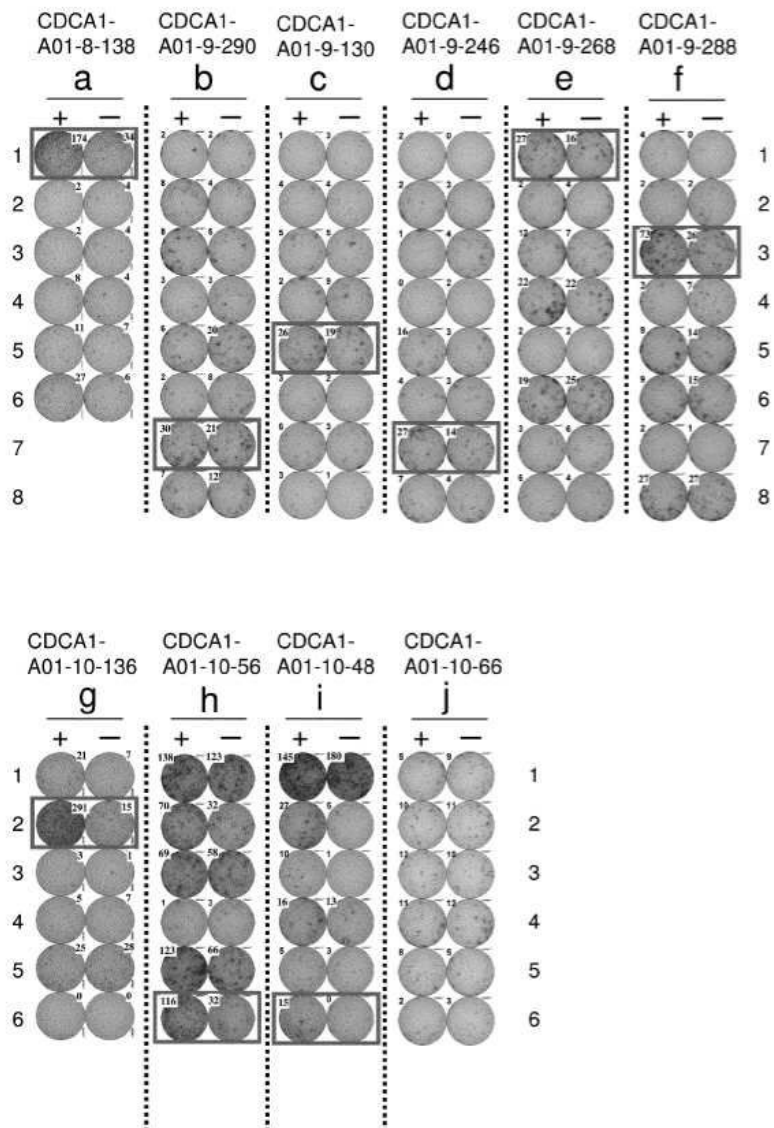
[0519] (산업상 이용 가능성)

[0520] 본 발명은 강력하고 특이적인 항종양 면역 반응을 유도하고 따라서 다양한 암의 종류에 대한 적용성을 가질 수 있는 CDCA1 유래의 신규 HLA-A01 제한적인 에피토프 펩타이드를 제공한다. 본 발명의 펩타이드 조성물, APC 및 CTL은 CDCA1를 발현하는 암, 예를 들어, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관세포암, 만성 골수성 백혈병(CML), 식도암, 위암, 비소세포폐암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신장암, 소세포폐암, 두경부암, 연조직 종양 및 대장암에 대한 펩타이드 백신으로 사용될 수 있다.

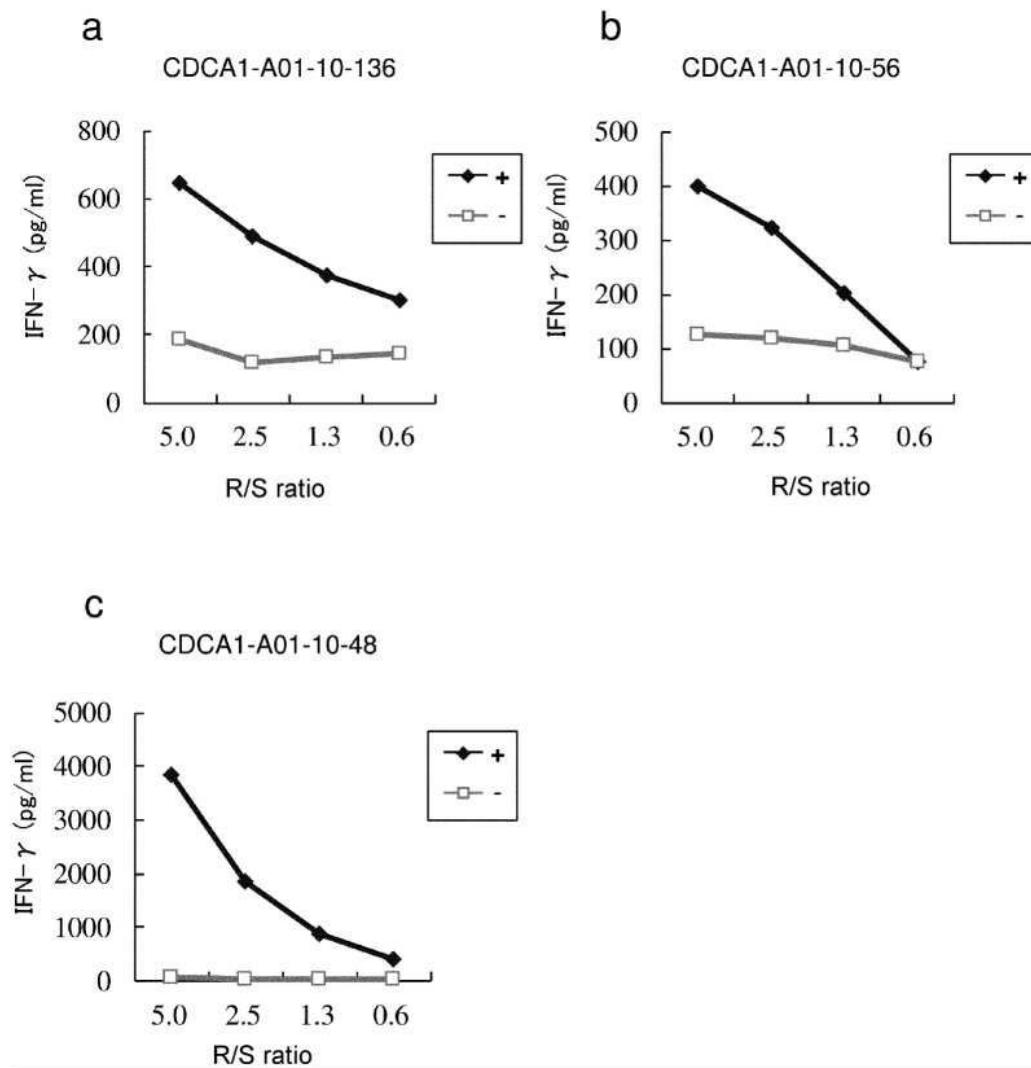
[0521] 본 명세서에서 본 발명을 그 특정 실시예에 대해 상세하게 설명하고 있지만, 위의 설명은 본질적으로 예시적이고 설명적인 것으로서, 본 발명 및 그 바람직한 실시예를 설명하기 위하여 의도하고 있는 것으로 이해되어야 한다. 관례적인 실험을 통해 당 업자는 그 경계 및 한계가 첨부된 특허 청구 범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신과 범위에서 벗어나지 않고 다양한 변경 및 변형이 그 안에서 이루어질 수 있음을 쉽게 인식한다.

도면

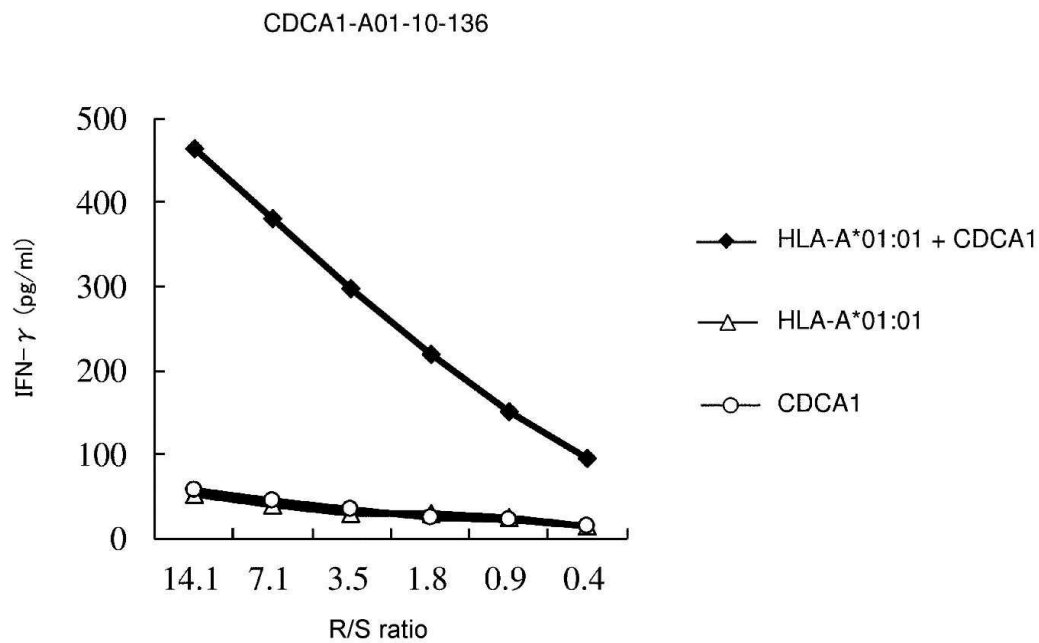
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
 <120> PEPTIDES DERIVED FROM CDCA1 AND VACCINES CONTAINING THE SAME
 <130> ONC-A1801P
 <150> JP 2018-145607
 <151> 2018-08-02
 <160> 48
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 1
 Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 2
 Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 3
 Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr
 1 5
 <210> 4
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 4

Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 5

Leu Ser Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 6

Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe Tyr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 7

Val Gln Glu Lys Arg Gly Ala Val Tyr

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 8

Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 9

Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 10

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 11

Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile His Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a peptide derived from CDCA1

<400> 12

Pro Ser Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 13

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 14

Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 15

Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 16

Lys Val Gln Glu Lys Arg Gly Ala Val Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 17

His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 18

Lys Thr Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400>

> 19

Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 20

Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe

1 5 10
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 21

Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu

1 5 10
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 22

Lys Thr Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg

1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 23

Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile Tyr

1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 24

Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr Lys

1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 25
 Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 26
 Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys
 1 5
 <210> 27

 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 27
 Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 28
 His Leu Asp Ser Phe Leu Pro Ile Cys Arg
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 29
 Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 30

Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys
 1 5 10

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 31

Lys Ile Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a peptide derived from CDCA1
 <400> 32

Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro Lys Ala Lys
 1 5 10

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 33

Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 34

Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 35

Ala Arg Gln Glu Val Val Glu Lys Tyr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 36

Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 37

Ser Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 38

Leu Ser Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a peptide derived from CDCA1

<400> 39

Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a PCR primer for the TCR analysis

<400> 40

gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a PCR primer for the TCR analysis

<400> 41

tcagctggac cacagccgca gcgt	24
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> a PCR primer for the TCR analysis	
<400> 42	
tcagaaatcc tttctcttga c	21
<210> 43	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> a PCR primer for the TCR analysis	
<400> 43	
ctagcctctg gaatcctttc tctt	24
<210> 44	
<211> 1989	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221>	
CDS	
<222> (301)..(1695)	
<400> 44	
gcggaatggg gcgggacttc cagtaggagg cggcaagttt gaaaagtgat gacggttgac	60
gtttgctgat ttttgacttt gctttagct gtcctccgaa ctgccgtct tctgtcggc	120
ggccggcact gtaggtgagc gcgagaggac ggaggaagga agcctgcaga cagacgcctt	180
ctccatccca aggcgcgggc aggtgccggg acgctgggcc tggcgggtgtt ttcgtcgtgc	240
tcagcgggtgg gaggaggcgg aagaaaccag agcctgggag attaacagga aacttccaag	300
atg gaa act ttg tct ttc ccc aga tat aat gta gct gag att gtg att	360
Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile	
1 5 10 15	
cat att cgc aat aag atc tta aca gga gct gat ggt aaa aac ctc acc	396
His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr	

20	25	30	
aag aat gat ctt tat cca aat cca aag cct gaa gtc ttg cac atg atc			444
Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile			
35	40	45	
tac atg aga gcc tta caa ata gta tat gga att cga ctg gaa cat ttt			492
Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe			
50	55	60	
tac atg atg cca gtg aac tct gaa gtc atg tat cca cat tta atg gaa			540
Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu			
65	70	75	80
ggc ttc tta cca ttc agc aat tta gtt act cat ctg gac tca ttt ttg			588
Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu			
85	90	95	
cct atc tgc cgg gtg aat gac ttt gag act gct gat att cta tgt cca			636
Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro			
100	105	110	
aaa gca aaa cgg aca agt cgg ttt tta agt ggc att atc aac ttt att			684
Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile			
115	120	125	
cac ttc aga gaa gca tgc cgt gaa acg tat atg gaa ttt ctt tgg caa			732
His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln			
130	135	140	
tat aaa tcc tct gcg gac aaa atg caa cag tta aac gcc gca cac cag			780
Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln			
145	150	155	160
gag gca tta atg aaa ctg gag aga ctt gat tct gtt cca gtt gaa gag			828
Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu			
165	170	175	
caa gaa gag ttc aag cag ctt tca gat gga att cag gag cta caa caa			876
Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln			
180	185	190	

tca cta aat cag gat ttt cat caa aaa acg ata gtg ctg caa gag gga	924
Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly	
195 200 205	
aat tcc caa aag aag tca aat att tca gag aaa acc aag cgt ttg aat	972
Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn	
210 215 220	
gaa cta aaa ttg tcg gtg gtt tct ttg aaa gaa ata caa gag agt ttg	1020
Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu	
225 230 235 240	
aaa aca aaa att gtg gat tct cca gag aag tta aag aat tat aaa gaa	1068
Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu	
245 250 255	
aaa atg aaa gat acg gtc cag aag ctt aaa aat gcc aga caa gaa gtg	1116
Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val	
260 265 270	
gtg gag aaa tat gaa atc tat gga gac tca gtt gac tgc ctg cct tca	1164
Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser	
275 280 285	
tgt cag ttg gaa gtg cag tta tat caa aag aaa ata cag gac ctt tca	1212
Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser	
290 295 300	
gat aat agg gaa aaa tta gcc agt atc tta aag gag agc ctg aac ttg	1260
Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu	
305 310 315 320	
gag gac caa att gag agt gat gag tca gaa ctg aag aaa ttg aag act	1308
Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr	
325 330 335	
gaa gaa aat tcg ttc aaa aga ctg atg att gtg aag aag gaa aaa ctt	1356
Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu	
340 345 350	
gcc aca gca caa ttc aaa ata aat aag aag cat gaa gat gtt aag caa	1404

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

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

ggt gct gtc tat gaa cga gta acc aca att aat caa gaa atc caa aaa 1500
Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys
385 390 395 400

att aaa ctt gga att caa caa cta aaa gat gct gct gaa agg gag aaa 1548

Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys
405 410 415

ctg aag tcc cag gaa ata ttt cta aac ttg aaa act gct ttg gag aaa 1596
Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys
420 425 430

tac cac gac ggt att gaa aag gca gca gag gac tcc tat gct aag ata 1644
Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile
435 440 445

gat gag aag aca gct gaa ctg aag agg aag atg ttc aaa atg tca acc 1692
Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr
450 455 460

tga ttaac aaaattacat gtctttttgt aaatggcttg ccacttttta attttctatt 1750

465

tagaaagaaa agttgaagcg aatggaagta tcagaagtac caaataatgt tggcttcac 1810

agtttttata cactctcata agtagttaat aagatgaatt taatgtaggc ttttattaat 1870
ttataattaa aataacttgt gcagctattc atgtctctac tctgcccctt gttgtaaata 1930
gtttgagtaa aacaaaacta gttacctttg aaatatatat atttttttct gttactatc 1989

<210> 45
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu

85 90 95

Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro

100 105 110

Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile

115 120 125

His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln

130 135 140

Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln

145 150 155 160

Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu

165 170 175

Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln

180 185 190

Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly

195 200 205

Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn

210 215 220

Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu

225 230 235 240

Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu
 245 250 255
 Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val
 260 265 270
 Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser
 275 280 285
 Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser
 290 295 300
 Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu

 305 310 315 320
 Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr
 325 330 335
 Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu
 340 345 350
 Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln
 355 360 365
 Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg
 370 375 380

 Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys
 385 390 395 400
 Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys
 405 410 415
 Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys
 420 425 430
 Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile
 435 440 445
 Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr

 450 455 460
 <210> 46
 <211> 1843
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (155)..(1549)

<400> 46

gcggaatggg gcgggacttc cagtaggagg cggcaagttt gaaaagtgat gacggttgac 60

gtttgctgat tttgacttt gctttagct gctccccgaa ctgcccgtct tctgtcggc 120

ggccggcact gtagattaac aggaaacttc caag atg gaa act ttg tct 169

Met Glu Thr Leu Ser

1 5

ttc ccc aga tat aat gta gct gag att gtg att cat att cgc aat aag 217

Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile Arg Asn Lys

10 15 20

atc tta aca gga gct gat ggt aaa aac ctc acc aag aat gat ctt tat 265

Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr Lys Asn Asp Leu Tyr

25 30 35

cca aat cca aag cct gaa gtc ttg cac atg atc tac atg aga gcc tta 313

Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile Tyr Met Arg Ala Leu

40 45 50

caa ata gta tat gga att cga ctg gaa cat ttt tac atg atg cca gtg 361

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

55 60 65

aac tct gaa gtc atg tat cca cat tta atg gaa ggc ttc tta cca ttc 409

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

70 75 80 85

agc aat tta gtt act cat ctg gac tca ttt ttg cct atc tgc cgg gtg 457

Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu Pro Ile Cys Arg Val

90 95 100

aat gac ttt gag act gct gat att cta tgt cca aaa gca aaa cgg aca 505

Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro Lys Ala Lys Arg Thr

105 110 115

agt cgg ttt tta agt ggc att atc aac ttt att cac ttc aga gaa gca 553

Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile His Phe Arg Glu Ala

120	125	130	
tgc cgt gaa acg tat atg gaa ttt ctt tgg caa tat aaa tcc tct gcg			601
Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln Tyr Lys Ser Ser Ala			
135	140	145	
gac aaa atg caa cag tta aac gcc gca cac cag gag gca tta atg aaa			649
Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln Glu Ala Leu Met Lys			
150	155	160	165
ctg gag aga ctt gat tct gtt cca gtt gaa gag caa gaa gag ttc aag			697
Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu Gln Glu Glu Phe Lys			
170	175	180	
cag ctt tca gat gga att cag gag cta caa caa tca cta aat cag gat			745
Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln Ser Leu Asn Gln Asp			
185	190	195	
ttt cat caa aaa acg ata gtg ctg caa gag gga aat tcc caa aag aag			793
Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly Asn Ser Gln Lys Lys			
200	205	210	
tca aat att tca gag aaa acc aag cgt ttg aat gaa cta aaa ttg tcg			841
Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn Glu Leu Lys Leu Ser			
215	220	225	
gtg gtt tct ttg aaa gaa ata caa gag agt ttg aaa aca aaa att gtg			889
Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu Lys Thr Lys Ile Val			
230	235	240	245
gat tct cca gag aag tta aag aat tat aaa gaa aaa atg aaa gat acg			937
Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu Lys Met Lys Asp Thr			
250	255	260	
gtc cag aag ctt aaa aat gcc aga caa gaa gtg gtg gag aaa tat gaa			985
Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val Val Glu Lys Tyr Glu			
265	270	275	
atc tat gga gac tca gtt gac tgc ctg cct tca tgt cag ttg gaa gtg			1033
Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser Cys Gln Leu Glu Val			
280	285	290	

cag tta tat caa aag aaa ata cag gac ctt tca gat aat agg gaa aaa	1081
Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser Asp Asn Arg Glu Lys	
295 300 305	
tta gcc agt atc tta aag gag agc ctg aac ttg gag gac caa att gag	1129
Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu Glu Asp Gln Ile Glu	
310 315 320 325	
agt gat gag tca gaa ctg aag aaa ttg aag act gaa gaa aat tcg ttc	1177
Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr Glu Glu Asn Ser Phe	
330 335 340	
aaa aga ctg atg att gtg aag aag gaa aaa ctt gcc aca gca caa ttc	1225
Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu Ala Thr Ala Gln Phe	
345 350 355	
aaa ata aat aag aag cat gaa gat gtt aag caa tac aaa cgc aca gta	1273
Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln Tyr Lys Arg Thr Val	
360 365 370	
att gag gat tgc aat aaa gtt caa gaa aaa aga ggt gct gtc tat gaa	1321
Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg Gly Ala Val Tyr Glu	
375 380 385	
cga gta acc aca att aat caa gaa atc caa aaa att aaa ctt gga att	1369
Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys Ile Lys Leu Gly Ile	
390 395 400 405	
caa caa cta aaa gat gct gct gaa agg gag aaa ctg aag tcc cag gaa	1417
Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys Leu Lys Ser Gln Glu	
410 415 420	
ata ttt cta aac ttg aaa act gct ttg gag aaa tac cac gac ggt att	1465
Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys Tyr His Asp Gly Ile	
425 430 435	
gaa aag gca gca gag gac tcc tat gct aag ata gat gag aag aca gct	1513
Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile Asp Glu Lys Thr Ala	
440 445 450	
gaa ctg aag agg aag atg ttc aaa atg tca acc tga t taacaaaatt	1560

Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr ***

455 460 465

acatgtcttt ttgtaaatgg cttgccatct ttttaatttc tatttagaaa gaaaagttga 1620

agcgaatgga agiatcagaa gtaccaaata atgttggctt catcagtttt tatacactct 1680

cataagtagt taataagatg aatttaatgt aggcctttat taatttataa ttaaaataac 1740

ttgtgcagct attcatgtct ctactctgcc ccttgttgta aatagtttga gtaaaacaaa 1800

actagttacc ttgaaatat atatattttt ttctgttact atc 1843

<210> 47

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu

85 90 95

Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro

100 105 110

Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile

115 120 125

His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln

130 135 140

Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln

145 150 155 160

Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu

165 170 175

Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln

180 185 190

Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly

195 200 205

Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn

210 215 220

Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu

225 230 235 240

Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu

245 250 255

Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val

260 265 270

Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser

275 280 285

Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser

290 295 300

Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu

305 310 315 320

Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr

325 330 335

Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu

340 345 350

Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln

355 360 365

Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg

370 375 380

Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys

385 390 395 400

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

405 410 415
 Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys
 420 425 430
 Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile
 435 440 445
 Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr

450 455 460
 <210> 48
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a linker peptide
 <400> 48

Asn Lys Arg Lys