



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0004914
(43) 공개일자 2023년01월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 14/74 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7043762(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년03월15일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7026097
원출원일자(국제) 2017년03월15일
심사청구일자 2020년03월16일
- (85) 번역문제출일자 2022년12월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/056049
(87) 국제공개번호 WO 2017/157972
국제공개일자 2017년09월21일
- (30) 우선권주장
1604458.8 2016년03월16일 영국(GB)
62/308,944 2016년03월16일 미국(US)
- (71) 출원인
이매틱스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 튀빙겐 파울-울리히-스트라쎄 15
- (72) 발명자
마르 안드레아
독일 72076 튀빙겐 키르헨베크 22
슈르 올리버
독일 72074 튀빙겐 아이흐탈텐스트라쎄 19
바인헨크 토니
독일 73773 아이흐발트 임 모르겐라인 15
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

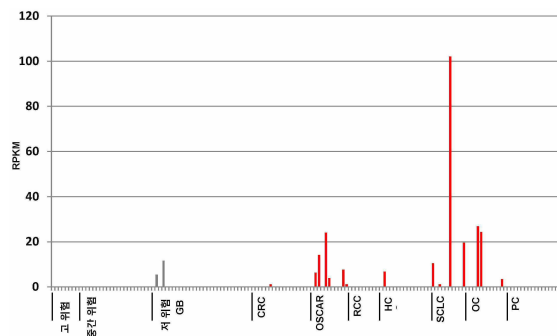
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **비소세포 폐암 및 기타 암에 대한 면역요법에 사용하기 위한 펩티드 및 펩티드의 조합**

(57) 요약

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

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2021.08)
C07K 14/4748 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/574 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

a) 합성 펩티드 또는 b) 펩티드의 약학적으로 허용가능한 염인 분자로서,
상기 펩티드 또는 염의 펩티드 서열이 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는, 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

펩티드가 클래스 I MHC 분자에 결합하는 능력을 갖고, 상기 MHC와 결합될 때 CD8 T 세포에 의해 인식될 수 있는, 합성 펩티드 또는 펩티드 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 염이 클로라이드 염, 아세트산 염, 트리플루오로아세트산 염, 인산 염, 질산 염, 황산 염, 브로마이드 염, 프로피온산 염, 글리콜산 염, 피루브산 염, 옥살산 염, 말산 염, 말레산 염, 말론산 염, 숙신산 염, 푸마르산 염, 주석산 염, 구연산 염, 벤조산 염, 계피산 염, 만델산 염, 메탄 술폰산 염, 에탄 술폰산 염, p-톨루엔술폰산 염, 살리실산 염, 소듐 염, 포타슘 염, 암모늄 염, 칼슘 염 또는 트리메틸아민 염인, 합성 펩티드 또는 펩티드 염.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 펩티드가 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함하고/거나,

b) 펩티드가 융합 단백질의 일부이고, 특히 HLA-DR 항원-연관 불변쇄(Ii)의 N-말단 아미노산을 포함하는 융합 단백질의 일부인

합성 펩티드 또는 펩티드 염.

청구항 5

MHC 분자에 결합될 때, 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체, 특히 가용성 또는 막-결합된 항체.

청구항 6

제5항에 있어서,

단클론 항체이거나 이중특이적 항체인, 항체.

청구항 7

서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 HLA 리간드와 반응성이거나, 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드를 포함하는 펩티드-MHC 복합체와 반응성인, T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 기능성 단편.

청구항 8

제7항에 있어서,

a) 상기 TCR이 가용성 분자로서 제공되고, 임의적으로 항체 단편, 면역 자극 도메인 및/또는 독소와 같은 또다른 효과기 기능을 갖고,

b) TCR이 알파 및 베타 쇠 불변 도메인 서열을 포함하는 알파/베타 이중이합체 TCR로서, 상기 불변 도메인 쇠가 예컨대 TRAC 엑손 2의 Cys4와 TRBC1 또는 TRBC2 엑손 2의 Cys2 사이의 자연적(native) 이황화 결합에 의해 연결되는, TCR이고/거나

c) TCR이 검출가능한 라벨, 치료제, 약동학(PK) 변형 모이어티 또는 성분, 또는 이들의 임의의 조합과 회합되는 TCR로서, 임의적으로 상기 치료제가 TCR 알파 또는 베타 쇠의 C-말단 또는 N-말단과 공유적으로 연결되는 항-CD3 항체인, TCR인

T 세포 수용체.

청구항 9

MHC 분자에 결합된 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드에 특이적으로 결합하는 aptamer (aptamer).

청구항 10

약제, 바람직하게는 암의 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한, 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드, 제5항 또는 제6항에 따른 항체, 제7항 또는 제8항에 따른 T 세포 수용체 또는 단편, 또는 제9항에 따른 aptamer를 포함하는 약학 조성물.

청구항 11

약제, 바람직하게는 암의 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한, 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드, 제5항 또는 제6항에 따른 항체, 제7항 또는 제8항에 따른 T 세포 수용체 또는 단편, 또는 제9항에 따른 aptamer.

청구항 12

소세포 폐암, 비소세포 폐암, 신장세포암, 뇌암, 위암, 대장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암 및 식도암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 암의 치료에 사용하기 위한, 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드, 제5항 또는 제6항에 따른 항체, 제7항 또는 제8항에 따른 T 세포 수용체 또는 단편, 또는 제9항에 따른 aptamer.

청구항 13

a) 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드, 제5항 또는 제6항에 따른 항체, 제7항 또는 제8항에 따른 T 세포 수용체 또는 단편, 또는 제9항에 따른 aptamer를 용액 또는 동결건조된 형태로 포함하는 용기; 및

b) 동결건조된 제형을 위한 희석제 또는 재구성 용액을 함유하는 제2 용기

를 포함하는 암 치료 또는 암에 대항하는 약제의 제조를 위한 키트로서,

(i) 완충액, (ii) 희석제, (iii) 필터, (iv) 주사바늘, (v) 주사기 또는 (vi) 보조제 중 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

옵션 (vi) 보조제가 IL-12, IL-15 또는 이들의 조합인, 키트.

청구항 15

적절한 항원-제시 세포 또는 항원-제시 세포를 모방하는 인공 구축물의 표면에 발현된 항원-로딩된 인간 클래스 I 또는 II MHC 분자를 T 세포와 충분한 시간 동안 시험관 내에서 접촉시켜 상기 T 세포를 항원 특이적 방식으로 활성화하는 단계를 포함하되, 상기 항원이 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드인, 활성화된 T 세포의 시험관내 생산 방법.

청구항 16

서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하는, 제15항에 따른 방법에 의해 생산되는 활성화된 T 세포.

청구항 17

서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드를 제시하는 표적 세포를 괴사시키는 시험관내 방법으로서,

효과적인 수의 제16항에 따른 활성화된 T 세포를 환자에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 18

제5항 또는 제6항에 따른 항체 또는 제7항 또는 제8항에 따른 T 세포 수용체 또는 단편을 인코딩하는 핵산으로서, 임의적으로 이중 프로모터 서열 또는 상기 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 연결된 핵산.

청구항 19

제18항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포로서, 바람직하게는 T 세포 또는 NK 세포인, 숙주 세포.

청구항 20

제7항 또는 제8항에 따른 T 세포 수용체의 생산 방법으로서,

제14항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

상기 숙주 세포 및/또는 이의 배양 배지로부터 상기 T 세포 수용체를 단리하는 단계를 포함하는, 생산 방법.

청구항 21

특정 개인을 위한 개인화된 항암 백신, 또는 화합물-기반 및/또는 세포-기반 치료제의 생산 방법으로서,

a) 해당 개인으로부터의 종양 샘플에 의해 제시된 종양-연관 펩티드(TUMAP)를 동정하는 단계;

b) 단계 a)에서 동정된 펩티드를 정상 조직과 비교하여 종양에서 면역원성 및/또는 과다제시에 대해 사전선별된 펩티드의 창고(warehouse)와 비교하는 단계로서, 상기 펩티드의 창고가 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩티드를 포함하는, 단계;

c) 개인에서 동정된 TUMAP과 일치하는 하나 이상의 펩티드를 상기 창고로부터 선택하는 단계; 및

d) 단계 c)에서 선택된 창고 펩티드에 근거하여 개인화된 백신, 또는 화합물-기반 및/또는 세포-기반 치료제를 생산하고/거나 제형화하는 단계

를 포함하고, 상기 항암 백신, 또는 화합물-기반 및/또는 세포-기반 치료제가 사전선별된 펩티드의 창고로부터 선택된 펩티드를 포함하는, 생산 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

a1) 종양 샘플로부터의 발현 데이터를 종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플로부터의 발현 데이터와 비교하여 종양 샘플에서 과발현되거나 이상 발현된 단백질을 동정하는 단계; 및

a2) 상기 발현 데이터와 종양 샘플의 클래스 I 및/또는 클래스 II MHC 분자에 결합된 MHC 리간드의 서열의 상관 관계를 결정하여 종양에 의해 과발현되거나 이상 발현된 단백질로부터 유래하는 MHC 리간드를 동정하는 단계

에 의해 TUMAP이 동정되는, 생산 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서,

종양 샘플로부터 단리된 MHC 분자로부터 결합된 펩티드를 용출시키고, 용출된 리간드를 서열결정(sequencing)함

으로써, MHC 리간드의 서열이 동정되는, 생산 방법.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

종양 샘플의 조직 유형에 상응하는 정상 조직이 동일한 개인으로부터 취득되는, 생산 방법.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

참고에 포함된 펩티드가 다음 단계에 근거하여 동정되는, 생산 방법:

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

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 참고에 포함된 펩티드의 면역원성이 시험관내 면역원성 검정, 개별 HLA 결합에 대한 환자 면역모니터링, MHC 멀티머 염색, ELISPOT 검정 및/또는 세포내 시토키인 염색을 포함하는 방법에 의해 결정되고/거나
- b) 해당 개인으로부터의 상응하는 정상 조직과 비교하여 종양 샘플에 고유한 하나 이상의 돌연변이를 동정하고, 상기 돌연변이와 상관관계가 있는 펩티드를 백신에 포함시키거나 세포 치료제를 생성하기 위해 선택하는 단계를 추가로 포함하고, 이때 임의적으로 상기 하나 이상의 돌연변이가 전체 게놈 서열결정에 의해 동정되는 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 면역요법 방법에 사용하기 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 예를 들어 항종양 면역 반응을 촉진시키거나 T 세포를 생체의 자극하여 환자로 이전시키는 백신 조성물의 활성 약학 성분으로 작용할 수 있는 종양 관련 T 세포 펩티드 에피토프 단독 또는 기타 종양 관련 펩티드와의 조합에 관한 것이다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

본 발명은 또한 암 세포에 대한 표적에 필요한 종양 관련 항원(TAA)에 결합하는 특이적 T 세포 수용체(TCR)의

[0001]

[0002]

생성을 위한 상기 펩티드의 사용, 이를 발현하는 T 세포의 생성 및 이를 사용하는 모든 암 치료의 방법에 관한 것이다. 인간 종양 세포의 HLA 클래스 I 분자로부터 유래하는 신규 펩티드 서열 및 이들의 변이체는 항종양 면역 반응을 이끌어내는 백신 조성물에서 또는 약학적/면역학적 활성 화합물 및 세포의 개발을 위한 표적으로 사용할 수 있다. 바람직한 것은 아미노산 서열 KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1)를 갖는 펩티드이다.

배경 기술

- [0003] 비소세포 폐암(NSCLC)은 현미경 하 관찰 시 그 암 세포의 크기에 따라 명명되며 소세포 폐암(SCLC)과는 차별화되어야 한다. NSCLC는 모든 폐암의 약 85 내지 90퍼센트를 차지한다(미국 암협회, 2015).
- [0004] 두 폐암(SCLC 및 NSCLC)은 남녀 모두에서 2번째로 흔한 암이다. 폐암은 암 사망의 주요 원인이며 약 25퍼센트를 차지한다. 그러므로, 매년 결장암, 유방암 및 전립선암을 합친 것보다 더 많은 사람이 폐암으로 사망한다. 더욱이, 두 폐암은 모든 신규 암 건수의 약 13퍼센트(180만 건 초과)를 차지한다. 폐암은 주로 고령자에서 발생한다. 진단 시의 평균 연령은 약 70세이다. 모든 건의 2퍼센트 미만이 45세 미만의 사람에서 진단된다.
- [0005] 네 가지 주요 유형의 NSCLC가 있으며, 즉, 선암종, 편평 세포 암종, 기관지 폐포 암종 및 대세포 암종이다. 선암종과 편평 세포 암종은 세포 형태학에 근거하여 가장 흔한 유형의 NSCLC이다(Travis *et al.*, Lung Cancer Principles and Practice, Lippincott-Raven, New York, 361-395, 1996). 선암종은 폐에서 보다 말단 위치의 특징을 가지며 흔히 K-ras 종양 유전자에서 돌연변이를 갖는다(Gazdar *et al.*, Anticancer Res., 14, 261-267, 1994). 편평 세포 암종은 전형적으로 보다 중앙에 위치하며 빈번히 p53 유전자 돌연변이를 보유한다(Niklinska *et al.*, Folia Histochem. Cytobiol., 39, 147-148, 2001).
- [0006] 폐암의 발생 및 진행과 연관된 다수의 유전적 변형이 보고되었지만, 정확한 분자적 기전은 여전히 불분명하다(Sozzi, G. Eur. J. Cancer 37: 63-73 (2001)). NSCLC의 대다수는 ras 돌연변이의 존재와 그로 인해 알려진 키나제 억제제에 의한 치료에 대한 상대적으로 환자가 민감하지 않게 되는 특징을 가진다. 그 결과, 폐암의 현재 치료는 일반적으로 세포독성 약물, 수술 및 방사선 요법으로 제한된다. 파클리탁셀, 도세탁셀, 젬시타빈, 비노렐빈 등 지난 10년에 걸쳐 새로 개발된 세포독성 제제들이 진행성 NSCLC 환자를 위해 다수의 치료 선택을 제공하는 것으로 나타났다. 하지만 이러한 새 요법들은 모두 시스플라틴 기반 요법에 비해 크지 않은 생존 혜택을 제공할 수 있다(Schiller, J. H. *et al.*, N. Engl. J. Med. 346: 92-98 (2002); Kelly, K. *et al.*, J. Clin. Oncol. 19: 3210-3218 (2001)). 그러므로, 임상가들은 분자 표적 대상 제제의 개발과 같은 새로운 치료 전략을 간절히 기다리고 있다.
- [0007] 암의 면역요법은 부작용을 최소화시키는 반면, 암 세포에 대한 특이적 표적화의 옵션을 나타낸다. 암 면역요법은 종양 관련 항원의 존재를 이용한다.
- [0008] 종양 관련 항원(TAA)의 현재 분류는 다음과 같은 그룹으로 분류할 수 있다:
- [0009] a) 암-고환 항원: 제일 처음으로 식별되었으며, T 세포에 의해 인식가능한 TAA가 이 종류에 속하며, 이는 그 구성원들의 발현이 조직학적으로 인간 종양과 다르며, 정상 조직 중, 고환의 정모 세포/정원 세포에서만 있고, 때로는 태반에서도 있기 때문에 원래 암-고환(CT) 항원이라고 불려졌다. 고환의 세포들이 클래스 I 또는 II HLA 분자를 발현하지 않기 때문에, 이 항원들은 정상 세포에 있는 T 세포에 의해 인식될 수 없으며 면역학적으로 종양 특이적이라고 간주될 수 있다. CT 항원의 잘 알려진 예로는 MAGE 계열 구성원들 및 NY_ESO_1이 있다.
- [0010] b) 분화 항원들: 이 TAA는 종양과 그 종양이 발생한 정상 조직 사이에 공유된다. 대부분의 알려진 분화 항원들은 흑색종과 정상 멜라닌 세포에서 발견된다. 이러한 멜라닌 세포 혈통 관련 단백질의 다수는 멜라닌의 생합성에 관련되어 있고, 따라서 종양 특이적이지 아니지만 암 면역요법에 널리 사용된다. 예로는, 티로시나아제 및 흑색종을 위한 멜라닌-A/MART-1 또는 전립선암을 위한 PSA가 포함되지만 이로 국한되지 않는다.
- [0011] c) 과발현된 TAA: 일반적으로 낮은 발현 수준이 있는 많은 정상 조직뿐만 아니라 조직학적으로 다른 유형의 종양에서 유전자 인코딩에서 널리 발현된 TAA가 발견된다. 정상 조직에 의해 처리되고 잠재적으로 제시되는 많은 에피토프가 T 세포 인식의 임계치 수준보다 낮을 수 있고, T 세포의 종양 세포에서의 과발현은 이전에 확립된 내성을 중단시켜 항암 반응을 개시할 수 있다. 이 클래스 TAA의 두드러진 예로는 Her-2/neu, 서마이빈, 텔로머라제 또는 WT1가 있다.
- [0012] d) 종양 특이적 항원: 이러한 독특한 TAA는 정상 유전자의 변이로써 발생한다(β -카테닌, CDK4 등). 이러한 분자 변경의 일부는 종양 변이 및/또는 진행과 관련되어 있다. 종양 특이적 항원은 일반적으로 강한 면역 반응을 정상 조직에 대한 자기 면역 반응에 대한 위험성 없이 유도할 수 있다. 반면에, 대부분의 경우 TAA는 발견되어

일반적으로 많은 개별 종양에서 대개 공유되지 않은 해당 종양에만 적절하다. 종양 특이적(연관된) 아형을 갖는 단백질의 경우 펩티드가 종양(관련) 엑손으로부터 비롯된다면 펩티드의 종양 특이성(또는 연관성) 또한 발생할 수 있다.

- [0013] e) 비정상 번역 후 변형에서 발생하는 TAA: 이러한 TAA는 특이적이 아니고 과발현되지도 않는 단백질에서 발생할 수 있지만 종양에서 주로 활동적인 번역 후 과정에 의해 종양과 관련된다. 이 클래스의 예는 종양 특이적일 수도 있고 아닐 수도 있는 분해 과정 동안 단백질 스플라이싱과 같은 이벤트 또는 MUC1의 경우 종양의 새로운 에피토프로 이끄는 변화된 당화 패턴에서 발생한다.
- [0014] f) 종양 바이러스 단백질: 이러한 TAA는 종양발생 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 바이러스 단백질이며, 그들이 이질적이기 때문에(인간 태생이 아닌), T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이런 단백질의 예로는 인간 유두종 타입 16 바이러스 단백질, 및 경부 암종에서 발현하는 E6와 E7이 있다.
- [0015] T 세포 기반의 면역요법은 종양 관련 또는 종양특이 단백질로부터 유래된 펩티드 에피토프를 표적으로 하며, 이는 구조적 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 종양특이적 세포 독성 T 림프구에 의해 인식되는 항원, 즉 그들의 에피토프는, 발현되고, 같은 원조의 변형없는 세포들에 비해서, 각각의 종양의 대개 상향조절된 세포인 효소, 수용체, 전자 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 분자일 수 있다.
- [0016] MHC 분자에는 두 클래스가 있고, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II이다. MHC 클래스 I 분자는 알파 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린으로 구성되어 있고, MHC 클래스 II 분자는 알파와 베타 쇠로 구성되어 있다. 이들의 3차원 형태는 결합 홈을 형성하며, 이는 펩티드와의 비공유결합에 사용된다. MHC 클래스 I 분자는 대부분의 유헥 세포에서 찾을 수 있다. 이는 대부분 내인성 단백질, 결손 리보솜 생성물(DRIP)과 보다 큰 펩티드의 단백질분해성 절단으로 인해 생성된 펩티드를 제시한다. 하지만, 엔도솜 구획이나 외생 출처로부터 유래된 펩티드 또한 MHC 클래스 I 분자에서 발견된다. 이러한 비고전적 방식의 클래스 I 제시를 문헌에서는 교차 제시라고 칭한다 (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). MHC 클래스 II 분자는 대부분 전문적인 항원 제시 세포(APC)에서 찾아볼 수 있고, 이들은 주로 APC에 의해 섭취된 외인성 또는 막형단 단백질의 펩티드를 제시하며(예컨대, 세포내 이입 동안), 이는 차후에 처리된다.
- [0017] 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적절한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8 양성 T 세포에 의해서 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4 양성 조력 T 세포에 의해 인식된다. TCR, 펩티드 및 MHC가 이로써 1:1:1의 화학량론적 반응량으로 존재한다는 사실은 잘 알려져 있다.
- [0018] CD4 양성 보조 T 세포는 CD8 양성 세포 독성 T 세포에 의한 효과적인 반응을 유도하고 지속하는데 중요한 역할을 한다. 종양 연관 항원(TAA)에서 유도된 CD4 양성 T 세포 에피토프의 동정은 항종양 면역 반응을 일으키기 위한 의약품의 개발에 아주 중요하다(Gnjatic et al., 2003). 종양 부위에서, 보조 T 세포는, 세포독성 T 세포(CTL) 친화적 시토카인 주위 환경을 지원하고(Mortara et al., 2006) 효과기 세포, 예를 들어 CTL, 자연 살해(NK) 세포, 대식 세포, 과립구를 유치한다(Hwang et al., 2007).
- [0019] 염증이 없는 경우, MHC 클래스 II 분자의 발현은 주로 면역계의 세포, 특히 전문적 항원 제시 세포(APC), 예를 들어, 단핵 세포, 단핵 세포로 유도된 세포, 대식 세포, 수지상 세포로 제한된다. 환자에서, 종양의 세포는 MHC 클래스 II를 발현하는 것으로 밝혀졌다(Dengjel et al., 2006). 본원의 연장된 펩티드는 MHC 클래스 II 활성화 에피토프로 작용할 수 있다.
- [0020] MHC 클래스 II에 의해 활성화된 조력 T 세포는 항종양 면역에서 CTL 효과기 기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다. CD8 양성 킬러 T 세포의 TH1 유형 지원 효과기 기능의 조력 T 세포 반응을 일으키는 조력 T 세포 에피토프는, 세포 표면에 종양 관련 펩티드/MHC 복합체를 보이는 종양 세포에 대한 세포 독성 기능을 포함한다. 이런 식으로 종양 관련 조력 T 세포 펩티드 에피토프는, 따로 또는 다른 종양 관련 펩티드와 함께, 항종양 면역 반응을 자극하는 백신 조성의 활성 약학 원료로 사용될 수 있다.
- [0021] 예를 들어, 생쥐 같은 포유류 동물 모델에서는 심지어 CD8 양성 T 림프구의 부재하에서도, CD4 양성 T 세포가 인터페론-감마(IFN γ)의 분비에 의한 혈관신생의 저해를 통해 종양 발현을 억제하는데 충분한 것으로 나타났다(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). CD4 T 세포가 직접적 항종양 효과기라는 증거가 있다(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).
- [0022] 이전에는 HLA 클래스 II 분자의 구성적 발현이 일반적으로 면역 세포로 제한되기 때문에, 클래스 II 펩티드를 원발성 종양에서 직접 분리하는 것은 가능하지 않다고 간주되었다. 하지만, 덴젤(Dengjel) 등은 MHC 클래스 II

에피톱을 종양에서 직접적으로 식별하는데 성공했다(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

- [0023] CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 함께 상승작용에 의해 항종양 효과에 기여하므로, CD8+ T 세포(리간드:MHC 클래스 I 분자 + 펩티드 에피톱) 또는 CD4 양성 조력 T 세포(리간드:MHC 클래스 II 분자 + 펩티드 에피톱)에 의해 인식되는 종양 관련 항원의 식별 및 특성화가 종양 백신의 개발에 중요하다.
- [0024] MHC 클래스 I 펩티드가 세포 면역 반응을 촉발(유도)하려면 MHC 분자에도 결합해야 한다. 이 과정은 MHC 분자의 대립형질 및 그 펩티드의 아미노산 서열의 특정적 다형성에 의존한다. MHC 클래스 I 결합 펩티드는 대개 길이가 8 내지 12개의 아미노산 잔기이며 또한 대개 그 서열 내에 MHC 분자의 상응하는 결합 홈과 상호작용하는 두 개의 유지되는 잔기("고정부")를 포함하고 있다. 이렇게 함으로써 각 MHC 대립형질은 어떤 펩티드가 결합 홈에 특정적으로 결합할 수 있는지 결정하는 "결합 모티프"를 갖는다.
- [0025] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며, 또한 추후 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.
- [0026] 종양 특이 또는 연관 항원으로서 T 림프구에 의해 단백질이 인식되고, 치료에 사용된다면, 특정한 전제 조건이 충족되어야 한다. 항원은 주로 종양 세포에 의해 발현되어야 하며 비교적 소량일지라도 건강한 정상 조직에 의해서 발현되어서는 안 된다. 바람직한 구현에서, 펩티드는 건강한 정상 조직과 비교하여 종양 세포에 의해 과다 제시되어야 한다. 더욱이, 각각의 항원이 하나의 유형의 종양에서 뿐만 아니라 높은 농도로 나타나는 것이 바람직하다(즉, 세포마다 펩티드의 각각의 사본 번호). 종양 특이 및 종양 관련 항원은 흔히 기능(예컨대, 세포 주기 조절 또는 세포자멸사의 억제) 때문에 정상 세포를 종양 세포로 전환하는 것과 직접 관련된 단백질에서 유도된다. 또한, 변환을 직접적으로 일으키는 단백질의 하류 표적은 상향조절될 수 있고, 따라서 간접적으로 종양과 연관될 수 있다. 이러한 간접적 종양 관련 항원은 백신 접근법의 표적이 될 수도 있다(Singh-Jasuja et al., 2004). 종양 관련 항원에서 유도된 그러한 펩티드("면역성 펩티드")가 시험관내 또는 생체내 T 세포 반응을 유도하도록 하기 위해서 에피톱이 항원의 아미노산 서열에 나타나는 것이 필수적이다.
- [0027] 그러므로, TAA는 종양 백신으로 제한되지 않지만 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다. TAA의 식별과 특성화의 방법은 대개 환자 또는 건강한 대상에서 분리될 수 있는 CTL의 사용에 기반하거나, 다른 전송 프로파일 또는 종양과 정상 조직 사이의 차등 전사 프로파일이나 차등 펩티드 발현 패턴의 생성에 기반한다. 그러나, 종양 조직 또는 인간 종양 세포주에서 과발현되거나 그런 조직 또는 세포주에서 선택적으로 발현되는 유전자의 식별은 면역 요법에서 이런 유전자에서 전사된 항원의 이용에 대한 정밀한 정보를 제공하지 않는다. 이것은 상응하는 TCR이 있는 T 세포가 나타나야 하고 이 특정 에피톱에 대한 면역 내성이 없거나 최소화되어야 하므로 이러한 항원의 에피톱의 개개의 하위집단만이 그런 응용에 적합하기 때문이다. 따라서, 본원의 매우 바람직한 구현에서, 기능성 및/또는 증식성 T 세포가 발견될 수 있는, 과발현되거나 선택적으로 발현된 펩티드만 선택하는 것이 중요하다. 이러한 기능성 T 세포는 특정 항원에 의해 자극되었을 때 클론에 의해 확대되고 효과기 기능("효과기 T 세포")을 실행할 수 있는 T 세포로 정의된다.
- [0028] 본원에 따른 특정 TCR(예컨대, 가용성 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(골격)에 의해 펩티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 펩티드의 면역원성은 이차적인 것이다. 이러한 경우, 제시가 결정 요인이다.
- [0029] TAA에 관한 기초 및 임상 연구의 상당한 발전에도 불구하고(Rosenbeg et al., Nature Med. 4: 321-7 (1998); Mukherji et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8078-82 (1995); Hu et al., Cancer Res. 56: 2479-83 (1996)), 암 치료에 사용가능한 후보 TAA는 그 숫자가 제한되어 있다. 암 세포에서 풍부히 발현되며 동시에 그 발현이 암 세포로 제한되는 TAA는 면역요법 표적의 유망한 후보일 것이다. 더욱이, 강력하고 특정 항종양 면역 반응을 유도하는 새로운 TAA는 면역요법 표적의 유망한 후보일 것이다(Boon and van der Bruggen, J. Exp. Med. 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., J. Exp. Med. 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., J. Exp. Med. 180: 347-52 (1994); Shichijo et al., J. Exp. Med. 187: 277-88 (1998); Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-8 (1997); Harris, J. Natl. Cancer Inst. 88: 1442-5 (1996); Butterfield et al., Cancer Res. 59: 3134-42 (1999); Vissers et al., Cancer Res. 59: 5554-9 (1999); van der Burg et al., J Immunol 156: 3308-14 (1996); Tanaka et al., Cancer Res. 57: 4465-8 (1997); Fujie et al., Int. J. Cancer 80: 169-72 (1999); Kikuchi et al., Int. J. Cancer 81: 459-66 (1999); Oiso et al., Int. J. Cancer 81: 387-94 (1999)).
- [0030] 더욱이, 암 요법을 위한 분자 표적화 약물의 개발에서 진전이 있었지만, 반응하는 종양 유형의 범위 및 치료의 유효성이 여전히 매우 제한적이다. 그러므로, 악성 종양 세포에 대해 고도로 특이적인 분자를 표적으로 하며 유

해 반응을 유발할 가능성이 거의 없거나 전혀 없는 새로운 항암 제제의 개발이 시급하다. 또한, 암의 보다 나은 진단, 예후의 평가 및 치료 성공의 예측을 유도하는 암 전반, 특히 NSCLC를 위한 바이오마커를 표시하는 요인의 파악도 필요하다.

발명의 내용

[0031] 한 양태에서, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 대해 적어도 65%, 바람직하게는 적어도 77%, 더욱 바람직하게는 적어도 85% 상동성인(바람직하게는 적어도 75% 또는 적어도 85% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로서, 상기 변이체는 MHC에 결합 및/또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며, 상기 펩티드는 기저의 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0032] 또한, 본 발명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 본 발명의 펩티드나 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 대해 적어도 65%, 바람직하게는 75%, 더욱 바람직하게는 85% 상동성인(바람직하게는 적어도 75% 또는 적어도 85% 동일한) 이의 변이체(여기서 상기 펩티드나 그 변이체는 8개 내지 100개, 바람직하게는 8개 내지 30개, 가장 바람직하게는 8개 내지 14개 아미노산의 전장을 가지며, 여기서 상기 펩티드나 변이체는 MHC에 결합 및/또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며) 또는 그 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

[0033] 다음 표는 본 발명에 따른 펩티드들 및 그 각각의 서열 식별 번호를 나타낸다.

[0034] [표 1]

[0035] 본 발명에 따른 펩티드

서열 식별 번호	서열
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVVRL
3	KVLEHVVRA
4	KVLEHVVRI
5	KLLEHVVRV
6	KLLEHVVRL
7	KLLEHVVRA
8	KLLEHVVRI
9	KALEHVVRV
10	KALEHVVRL
11	KALEHVVRA
12	KALEHVVRI
13	YLLEHVVRV
14	YLLEHVVRL
15	YLLEHVVRA
16	YLLEHVVRI
17	YALEHVVRV
18	YALEHVVRL
19	YALEHVVRA
20	YALEHVVRI
21	YVLEHVVRV
22	YVLEHVVRL
23	YVLEHVVRA
24	YVLEHVVRI

[0036]

[0037] 다른 양태에서, 본 발명은 하기 일반식 I에 따른 아미노산 서열을 포함하는 MAG-003 펩티드, 예를 들어 분리된 펩티드 또는 그 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0038] [일반식 I]

- [0039] $X_1X_2LEHVVRX_3$ (서열 식별 번호 5)
- [0040] 상기 식에서, X_1 은 아미노산 K 및 Y에서 선택되고, X_2 는 아미노산 V, L 및 A에서 선택되고, X_3 은 V, L, A 및 I에서 선택되며, 또한 상기 펩티드는 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 분자에 결합 및/또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도한다. 한 양태에서, 상기 펩티드는 기저의 전장 폴리펩티드가 아니다.
- [0041] 본원은 또한 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장세포암, 뇌암, 위암, 대장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암과 같은 증식성 질병의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩티드에 일반적으로 관련된 것이다.
- [0042] 특히 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24로 구성되는 군으로부터 선택된 본 발명에 따른 단독 또는 조합의 펩티드이다. 더 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24(표 1 참조)로 구성되는 군으로부터 선택된 단일 또는 조합의 펩티드들, 및 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장세포암, 뇌암, 위암, 대장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암, 바람직하게는 아교모세포종, 위암, 폐암, 간세포 암종, 대장암, 췌장암, 식도암, 난소암 및 비소세포 폐암의 면역요법에서 이들의 용도이다.
- [0043] 본원은 또한 인간 주조직 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 길이 변이체와 같은 연장된 형태의 MHC 클래스 II의 분자와 결합하는 능력을 가진 본 발명에 따른 펩티드에 관한 것이다.
- [0044] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드들에 관한 것으로서, 상기 펩티드들(각각)은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 따른 아미노산 서열을 포함하거나 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다.
- [0045] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 변형되며/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0046] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 용합 단백질의 일부이며 특히 HLA-DR 항원 연관된 불변쇄(Ii)의 N-말단 아미노산에 융합되거나, 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 그 서열 안으로) 융합된다.
- [0047] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본원은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본원에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0048] 본원은 또한 본원에 따른 핵산을 발현할 수 있으며/거나 발현하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0049] 본원은 또한 질병의 치료에서와 의학에서, 특히 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 따른 펩티드, 본원에 따른 핵산 또는 본원에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0050] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드 또는 본원에 따른 상기 펩티드와 MHC의 복합체에 대해 특이적인 항체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본원은 또한 본원에 따른 핵산 또는 상기 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0052] 본원은 또한 항원 제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포인 본원에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0053] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본원에 따른 숙주 세포의 배양 및 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터의 펩티드 단리를 포함한다.
- [0054] 본원은 또한 본원에 따른 상기 방법에 관한 것으로서, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩된다.
- [0055] 본원은 또한 본원에 따른 방법에 관한 것으로서, 그 항원 제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24를 포함하는, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24를 포함하는 상기 펩티드 또는 변이체 아미노산 서열을 발현할 수 있고/거나 발현하는 발현 벡터를 포함한다.
- [0056] 본원은 또한 본원에 따른 방법에 의해 생산된 활성화된 T 세포에 관한 것으로서, 상기 T 세포가 본원에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인식한다.
- [0057] 본원은 또한 본원에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 표적 세포가 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본원에 따라 생산된 효과적인 수의 T 세포를 환자에

게 투여하는 것을 포함한다.

- [0058] 본원은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에서 설명된 일체의 펩티드, 본원에 따른 핵산, 본원에 따른 발현 벡터, 본원에 따른 세포, 본원에 따른 활성화된 T 림프구, T 세포 수용체 또는 기타 펩티드 및/또는 펩티드 MHC 결합 분자의 사용에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 약제가 암에 대해 활성이다.
- [0059] 바람직하게는, 상기 약제가 세포 요법, 백신 또는 가용성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질이다.
- [0060] 본원은 또한 본원에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 암 세포는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장세포암, 뇌암, 위암, 대장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암, 바람직하게는 비소세포 폐암이다.
- [0061] 본원은 또한 본원에 따른 펩티드에 근거한 바이오마커에 관한 것으로서, 여기서는 암, 바람직하게는 비소세포 폐암의 진단에 사용할 수 있는 "표적"이라고 부른다. 이 마커는 펩티드(들) 자체의 과다제시 또는 상응하는 유전자(들)의 과발현일 수 있다. 이 마커는 또한 치료, 바람직하게는 면역요법, 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 확인된 동일한 표적을 표적화하는 면역요법의 성공의 확률을 예측하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 가용성 TCR은 관심 대상의 MHC와 복합체인 펩티드의 존재 검출을 위해 종양의 일부를 염색하는데 사용할 수 있다. 선택적으로, 항체는 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 효과기 기능을 보유한다.
- [0062] 본원은 또한 하나 이상의 상기 표적을 인식하는 TCR의 확인, 바람직하게는 T 세포를 활성화하는 상기 TCR의 확인에 대한 이러한 새로운 표적의 사용에 관한 것이다.
- [0063] 본원은 또한 암 치료의 문맥상 이러한 새로운 표적들의 사용에 관한 것이다.
- [0064] 본원은 또한 TCR, 개별 TCR 하위단위(단일 또는 조합) 및 그 하위 도메인, 특히 가용성 TCR(sTCF) 및 클론된 TCR, 자가조직 또는 동종이형의 T 세포로 유전자조작된 TCR들의 생산을 위한 본 발명에 따른 펩티드의 사용, 및 상기한 내용도 물론 상기 TCR을 만드는 방법 및 상기 TCR을 갖거나 상기 TCR과 교차반응하는 기타 세포를 만드는 방법에 관한 것이다.
- [0065] 본원은 또한 TCR 단백질, 개별 TCR 하위단위(단일 또는 조합) 및 그 하위 도메인, 특히 TCR 알파쇄 가변 도메인 및 TCR 베타쇄 가변 도메인을 포함하는 KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1)-HLA-A*02 복합체에 결합하는 가용성 TCR(sTCR) 및 클로닝된 TCR에 관한 것이다.
- [0066] 본원은 또한 본원의 TCR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 본원은 또한 본원에 따라 생산된, TCR 알파쇄, 베타쇄 또는 모두를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0067] 본원은 또한 본원에 따라 생산된, TCR 알파쇄, 베타쇄 또는 모두를 인코딩하는 핵산을 발현하는 재조합 발현 벡터를 포함하는 단리된 숙주에 관한 것이다.
- [0068] 본원은 또한 본원의 재조합 발현 벡터, 바람직하게는 그 세포가 말초 혈액 림프구(PBL)인 단리된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0069] 본원은 또한 본원의 재조합 발현 벡터를 포함하는 단리된 PBL에 관한 것으로서, PBL 및 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포이다.
- [0070] 본원은 또한 본원의 하나 이상의 숙주 세포를 포함하는 세포의 모집단에 관한 것이다.
- [0071] 본원은 또한 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장세포암, 뇌암, 위암, 대장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암과 같은 증식성 질병의 치료에 사용하기 위한 본원에 따른 TCR 단백질들에 관한 것이다.
- [0072] 면역 반응 자극은 숙주 면역계가 외부 물질로 인식하는 항원의 존재에 의존한다. 종양 연관 항원의 발견은 숙주의 면역계를 종양 성장에 개입하는데 사용할 가능성을 제기했다. 면역계의 체액성 및 세포성 지류를 이용하는 다양한 기전이 현재 암 면역 치료에서 탐색되고 있다.
- [0073] 세포 면역 반응의 특정 요소들은 종양 세포를 특이적으로 인식하고 파괴할 수 있다. T 세포의 종양 침투 세포 군락 또는 말초 혈액에서의 단리는 이러한 T 세포가 암에 대해 자연 면역 방어으로써 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. 세포질에 자리잡은 단백질 또는 불완전 리보솜 생성물(DRIPS)에서 파생된 보통 8 내지 10개의 아미노산 잔기로 이루어진 주조직적합 복합체(MHC)를 가진 펩티드의 클래스 I 분자를 인식하는 CD8 양성 T 세포

는 특히 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC 분자도 인간 백혈구-항원(HLA)으로 지정된다.

- [0074] "T 세포 반응"이란 특이적 증식과 시험관내 또는 생체 내에서 유도되는 효과기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 독성 T 세포의 경우, 효과기 기능이 펩티드 펄스, 펩티드 전조 펄스 또는 자연적 펩티드 제시 표적 세포들의 용해, 시토카인의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 인터페론-감마, TNF-알파, 또는 IL-2, 효과기 분자의 분비, 바람직하게는 펩티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.
- [0075] "펩티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 알파 아미노와 카보닐기 사이에 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 펩티드는 아미노산 9개의 길이가 바람직하지만 짧게는 아미노산 8개일 수도 있고 길게는 10, 11 또는 12개일 수도 있고, MHC 클래스 II 펩티드의 경우(본원의 펩티드의 연장된 변이) 그 길이가 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산일 수 있다.
- [0076] 더욱이 "펩티드"라는 용어는 알파 아미노기와 이웃 아미노산의 카보닐기 사이의 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 이 염은, 예를 들어 염화물 또는 아세트산염(트리플루오로아세테이트)과 같은 약학적으로 허용되는 펩티드의 염이다. 본원에 따른 펩티드의 염은 펩티드가 생체 내에서 염이 아니므로 생체내 상태의 펩티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.
- [0077] "펩티드"라는 용어는 "올리고펩티드"를 포함한다. 여기에서 "올리고펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기 및 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는데 사용된다. 본 발명에서 올리고펩티드의 길이는 정확한 에피톱이 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고펩티드는 일반적으로 30개 아미노산보다 길이가 짧고, 15개 아미노산보다 길다.
- [0078] "폴리펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기와 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는데 사용된다. 본 발명에서 폴리펩티드의 길이는 정확한 에피톱들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고 펩티드와 다르게, 폴리펩티드는 약 30개 아미노산 잔기 이상의 분자를 가지고 있는 것을 가리킨다.
- [0079] 이런 분자에 대한 펩티드, 올리고펩티드, 단백질 또는 폴리뉴클레오티드 코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역원성"(따라서, 본 발명에서의 "면역원")이다. 본원의 경우, 면역성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정적으로 정의된다. 그러므로, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자이고, 본원의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 분자이다. 다른 양태에서, 면역원은 펩티드, 펩티드와 MHC의 복합체, 올리고펩티드 및/또는 특정 항체, 또는 항체에 대한 TCR을 높이는데 사용되는 단백질일 수 있다.
- [0080] 클래스 I T 세포 "에피톱"은 적당한 친화도를 가진 MHC/펩티드 복합체에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼성분(ternary) 복합체(MHC 클래스 I 알파쇄, 베타-2-마이크로글로불린 및 펩티드)를 생성하는 클래스 I 또는 II MHC 수용체에 결합하는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드는 일반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 가장 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.
- [0081] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 인코딩하는 세 개의 유전자 좌가 있다(인간의 MHC 분자도 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다): HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 및 HLA-A*07은 유전자 좌에서 발현할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.
- [0082] 표 2는 HLA-A*02 및 HLA-A*24 및 가장 빈번한 HLA-DR 혈청형의 발현 빈도 F이다. 빈도는 모리(Mori) 등(Mori et al., 1997)으로부터 조정된 미국 인구 내에서의 일배체형 빈도 Gf로부터 도출되며, 하디-와인버그 공식 $F = 1 - (1-Gf)^2$ 를 사용한다. A*02 또는 A*24와 일부 HLA-DR 대립형질의 조합은 강화되거나 연관 불평형으로 인해 단일 빈도보다 덜 빈번할 수 있다. 자세한 내용은 카녹(Chanock) 등을 참조한다(Chanock et al., 2004).

[0083] [표 2]

대립형질	모집단	대립형질로부터 계산된 표현형
A*02	백인(북미)	49.1%
A*02	미국 흑인(북미)	34.1%
A*02	아시아계 미국인(북미)	43.2%
A*02	중남미계 미국인(북미)	48.3%
DR1	백인(북미)	19.4%
DR2	백인(북미)	28.2%
DR3	백인(북미)	20.6%
DR4	백인(북미)	30.7%
DR5	백인(북미)	23.3%
DR6	백인(북미)	26.7%
DR7	백인(북미)	24.8%
DR8	백인(북미)	5.7%
DR9	백인(북미)	2.1%
DR1	미국 흑인(북미)	13.20%
DR2	미국 흑인(북미)	29.80%
DR3	미국 흑인(북미)	24.80%
DR4	미국 흑인(북미)	11.10%
DR5	미국 흑인(북미)	31.10%
DR6	미국 흑인(북미)	33.70%
DR7	미국 흑인(북미)	19.20%
DR8	미국 흑인(북미)	12.10%
DR9	미국 흑인(북미)	5.80%
DR1	아시아계 미국인(북미)	6.80%
DR2	아시아계 미국인(북미)	33.80%
DR3	아시아계 미국인(북미)	9.20%
DR4	아시아계 미국인(북미)	28.60%
DR5	아시아계 미국인(북미)	30.00%
DR6	아시아계 미국인(북미)	25.10%
DR7	아시아계 미국인(북미)	13.40%
DR8	아시아계 미국인(북미)	12.70%
DR9	아시아계 미국인(북미)	18.60%
DR1	중남미계 미국인(북미)	15.30%
DR2	중남미계 미국인(북미)	21.20%
DR3	중남미계 미국인(북미)	15.20%
DR4	중남미계 미국인(북미)	36.80%
DR5	중남미계 미국인(북미)	20.00%
DR6	중남미계 미국인(북미)	31.10%
DR7	중남미계 미국인(북미)	20.20%
DR8	중남미계 미국인(북미)	18.60%
DR9	중남미계 미국인(북미)	2.10%
A*24	필리핀	65%
A*24	러시아 네네츠	61%

[0084]

대립형질	모집단	대립형질로부터 계산된 표현형
A*24:02	일본	59%
A*24	말레이시아	58%
A*24:02	필리핀	54%
A*24	인도	47%
A*24	한국	40%
A*24	스리랑카	37%
A*24	중국	32%
A*24:02	인도	29%
A*24	호주 서부	22%
A*24	미국	22%
A*24	러시아 사마라	20%
A*24	남미	20%
A*24	유럽	18%

[0085]

[0086]

MAGEA4 유전자는 MAGEA 유전자 계열의 구성원이다. 이 계열의 구성원들은 서로 50 내지 80%의 서열 동일성을 가진 단백질을 인코딩한다. MAGEA 유전자의 프로모터 및 첫 번째 엑손은 상당한 변동성을 보이는데, 이는 이 유전자 계열의 존재가 동일한 기능을 여러 다른 전사 조절하에서 발현 가능케함을 시사한다. MAGEA 유전자들은 염색체 위치 Xq28에 군집한다. 이 유전자들은 선천성 각화 부전증과 같은 일부 유전 질환에 연루되었다. 동일한 단백질을 인코딩하는 적어도 4개 변이체가 이 유전자에서 발견되었다[출처: RefSeq, 2008년 7월].

[0087]

MAGEA4 국소화는 세포질로서 설명되었다(Kim *et al.*, 2015). 하지만, MAGEA4 염색은 핵에서도 검출되었으며, 덜 분화된 암 대비 잘 분화된 암에서 핵과 세포질 사이의 차등 분배가 있었다(Sarcevic *et al.*, 2003).

[0088]

MAGEA4는 남성 생식 세포 표지자로서 사용된다. 이것은 생식모세포에서는 발현되지 않지만 전정원세포(pre-spermatogonia)와 성숙한 생식 세포에서는 발현된다(Mitchell *et al.*, 2014).

[0089]

MAGEA4는 종양 태아 단백질 또는 암 고환 항원이다. MAGEA4의 직접적 종양 촉진 영향에 대한 분명한 증거는 없다. 한 연구는 MAGEA4의 과발현의 세포 주기 억제와 세포자멸사에 의해 자발적으로 형질 변환 및 정상적 구강 각질세포의 성장이 촉진됨을 시사한다(Bhan *et al.*, 2012). 하지만, 다른 보고서에서는, MAGEA4 침묵의 카스파아제-3 활성도의 감소를 초래한 반면 과발현이 세포자멸사와 카스파아제-3 활성도를 증가시켰으므로 MAGEA4의 시험관내 종양 억제 영향을 시사했다(Peikert *et al.*, 2006). 다른 이들은 MAGEA4의 C-말단 단편이 시험관내 전 세포자멸사 활성도를 갖고 있으며(Sakurai *et al.*, 2004), 또한 종양단백질 간키린과의 상호작용을 통해 부착 비의존성 성장을 억제한다고 보고했다(Nagao *et al.*, 2003).

[0090]

종양 전이와의 연관에 대한 산발적 증거가 있다. MAGEA4 발현은 식도 편평 세포 암종에서 림프절 전이(Forghanifard *et al.*, 2011), 방광암에서 근육 침윤성 암으로의 진행(Bergeron *et al.*, 2009), 및 외음부 암에서 림프절 전이(Bellati *et al.*, 2007)와 각각 연관되었다.

[0091]

MAGEA4와 암 줄기 유사 세포와의 연관에 대한 분명한 증거는 없다. 하지만, MAGEA4 발현은 폐, 결장, 유방 등 다른 암 세포주로부터 유래한 측모집단 세포에서(Yamada *et al.*, 2013), 그리고 호지킨 림프종 종양 샘플에서(Shafer *et al.*, 2010) 검출되었다. 더욱이, MAGEA4는 분화되지 않은 인간 배아 줄기 세포 및 이의 분화된 유도 체인 기형암종에서 설명되었다(Lifantseva *et al.*, 2011).

[0092]

암에서 MAGEA4의 과발현, 즉, MAGEA4 발현은 다수의 다른 암 유형에서 설명되었다. 특정 암 개체에 대한 세부사항은 다음의 하위절을 참고한다. 여기에는 다수 특정 절에서 다루지지 않은 암 유형에 대한 일부의 추가 정보만이 나열된다.

[0093]

원발성 흑색종에서, MAGEA4의 발현은 10 내지 30%의 종양, 및 원격 전이에서 44%까지 면역 조직화학에 의해 검출되었다(Barrow *et al.*, 2006; Luftl *et al.*, 2004). 두경부의 원발성 점막 흑색종에서는 MAGEA4 염색에 대해 60%의 양성을 나타냈다(Prasad *et al.*, 2004).

[0094]

방광암에서, MAGEA4는 비근육 침윤성 종양의 38%, 근육 침윤성 암의 48%, 제자리 암종의 65%, 림프절 전이의 73%에서 관찰되었다(Bergeron *et al.*, 2009). 또 다른 연구에서는, MAGEA4 발현은 선암종(4/15, 27%), 육종양(4/14, 29%), 소세포(5/20, 25%) 또는 이행 세포(281/1,522, 19%) 암종에 비해 방광암에서는 약간 더 낮은 빈도로, 그리고 편평(25/55, 46%) 암종에서는 가장 높은 빈도로 기술되었다(Kocher *et al.*, 2002). 요로상피 암종

에서, MAGEA4 발현은 면역조직화학에 의해서는 64%, RT-PCR에 의해서는 58%의 사례에서 검출되었다(Sharma *et al.*, 2006). MAGEA4는 두경부 편평 세포 암종 샘플의 40 내지 60%에서 RT-PCR에 의해 검출되었다(Cuffel *et al.*, 2011; Soga *et al.*, 2013). MAGEA4 발현은 구강 편평 세포 암종 샘플의 57%에서 검출되었다(Montoro *et al.*, 2012; Ries *et al.*, 2005). MAGEA4 발현은 분석한 70개 양성 및 음성 갑상선 종양 샘플 모두에서 면역조직화학에 의해 검출되지 않았다(Melo *et al.*, 2011). MAGEA4 발현은 비정상피중성 고환 생식 세포 종양은 아니며 전형적 고환종에서만 발견되었다(Aubry *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2014). MAGEA4 발현은 위장관 변연 종양의 14%(5/35)에서 검출되었다(Perez *et al.*, 2008).

[0095] 아동 수포세포종에서, MAGEA4 mRNA는 28%(7/25) 빈도로 검출되었지만, 면역반응성은 샘플의 4%(1/25)에서만 관찰되었다(Oba-Shinjo *et al.*, 2008). 다른 연구에서는 수포세포종의 18%(2/11)에서 약한 MAGEA4 mRNA가 발견되었다(Jacobs *et al.*, 2008).

[0096] 한 연구에서는 MAGEA4가 성인 T 세포 백혈병/림프종 샘플의 60%에서 발현되는 것으로 나타났다(Nishikawa *et al.*, 2012). 다른 보고에서는 비호지킨 림프종 샘플의 5%(2/38) 및 호지킨병 샘플의 20 내지 30%로서 훨씬 낮은 발현 빈도가 설명되었다. 호지킨 림프종에서는, 리드-스텐베르크 세포가 가장 강하게 염색되는 세포인 반면, 주위 세포는 염색되지 않았다(Chambost *et al.*, 2000). MAGEA4 발현은 39개의 다발골수종 샘플에서는 검출되지 않았다(Andrade *et al.*, 2008).

[0097] MAGEA4 면역반응성은 자궁경부 편평 세포 암종의 33%(20/60)에서 검출가능했다(Sarcevic *et al.*, 2003).

[0098] MAGEA4 발현은 면역 조직 화학에 의해 자궁내막 선암종의 12%, 자궁 유두상 장액 암종의 63%, 자궁 암육종의 91%에서 존재하는 것으로 발견되었다. 종양 모집단 내에서, MAGEA4 발현의 정도는 암육종에서 가장 높았다(Resnick *et al.*, 2002).

[0099] 면역조직화학에 의해 검출되는 MAGEA4 염색은 이질성이며, 양성 종양의 일부만이 50%가 넘는 종양 세포에서 MAGEA4를 발현한다(Resnick *et al.*, 2002; Sarcevic *et al.*, 2003).

[0100] 여러 암 유형에서 MAGEA4 발현을 보고한 연구 수와는 대조적으로, MAGEA4의 결과 및 예후 사이의 연관에 대한 증거는 보다 제한적이다. 하지만, 일부 보고에서는 MAGEA4 발현과 임상적 매개변수의 상관관계가 나타난다. 두경부 편평 세포 암종에서, MAGEA4 발현은 불량한 전체 생존 기간과 상관관계가 있었으며, 불량한 결과의 독립적인 예후 지표였다(Cuffel *et al.*, 2011). 방광암에서, MAGEA4 발현은 재발 및 근육 침윤성 암으로의 진행과 상관관계가 있었으며(Bergeron *et al.*, 2009), 또한 강한 MAGEA4 염색이 생존기간의 감소와 연관이 있었다(Kocher *et al.*, 2002). 위장관 기질 종양에서, MAGEA4와 기타 암 고환 항원의 발현은 재발과 상관관계가 있었으며(Perez *et al.*, 2008), 또한 외음부암에서는 MAGEA4가 재발성 종양에서 더 빈번히 검출되었다(Bellati *et al.*, 2007).

[0101] MAGEA4 발현과 진행성 종양 병기의 연관에 대한 증거가 여러 암 유형을 다루는 일부 보고서에서 제공된다. 악성 흑색종에서, MAGEA4 발현은 질병 진행에 따라 증가했으며, 원발성 종양에서 9%가 원격 전이에서 44%로 증가했다(Barrow *et al.*, 2006). 또한 외음부암에서는, MAGEA4 발현이 림프절 전이가 있는 종양에서 더 빈번했다(Bellati *et al.*, 2007). 더욱이, MAGEA4 발현은 자궁내막 암종(Chitale *et al.*, 2005), 자궁경부 편평 세포 암종(Sarcevic *et al.*, 2003), 및 방광암(Bergeron *et al.*, 2009; Kocher *et al.*, 2002)에서 고등급 종양 또는 진행성 병기와 연관이 있었다.

[0102] MAGEA4는 종양 세포에 의해 발현되는 것으로 보이며, 기질, 혈관, 면역 또는 기타 종양 연관 세포에서의 발현에 대한 증거는 없다. 더욱이, MAGEA4 발현은 배양한 종양 세포주에서도 검출되었으며, 위암 세포주(Li *et al.*, 1997), 식도 암종 세포주(Tanaka *et al.*, 1997), 췌장 암종 세포주(Kubuschok *et al.*, 2004) 및 두경부 편평 세포 암종 세포주(Hartmann *et al.*, 2015) 등이 포함된다.

[0103] [표 3]

[0104] 일반적 암 표적으로서 MAGEA4

항원 성질	평가
문헌에서 보고된 [관심 대상 암]에서 과발현	
문헌에서 보고된 다른 암에서 과발현	+
기술된 출처 단백질 유래 표적에 대한 T 세포 반응	+
종양태아 발현 패턴	+
암 줄기 세포에 의한 발현	(-)
세포 주기 진행 및 종양 세포 증식에서의 역할	(-)
종양 침윤, 이동 및 전이에 대한 관여	
암 연관 신호전달 경로에 대한 연계 ¹	
항세포자멸사 효과	(-)
전혈관신생 효과 / 신혈관 형성	
암에서 불량한 예후와 연결된 과발현	+
진행성 암 병기와 연관된 과발현	+
일반적 암 표적	
하위세포 국소화 ²	CY
문헌에서 출처 단백질의 특성화(-, +, ++, +++)	+
세포 유형 연관 ³	TU

[0105]

[0106] ¹ TGF = 형질전환 성장 인자, PI3K = 포스포티달이노시티드 3-키나제, p53 = 세포 종양 항원 p53, EGFR = 상피 성장 인자 수용체, FGF2 = 섬유모세포 성장 인자 2, Wnt = Wnt / 베타-카테닌 경로(배아 생성), Ras = Rat 육종 원암-유전자, NF-κB = 핵 인자 카파 B(진핵 전사 인자)² CY = 세포질, ³ TU = 종양 세포.

[0107] 치료 표적으로서 MAGEA4 - 면역요법 표적(백신, 보조제, CAR)

[0108] 진행성 식도암, 위암 또는 폐암 환자 20명에게 300 μg 단백질을 함유하는 MAGEA4 백신을 2주마다 1회 총 6회의 용량을 피하 투여했다. 1회의 면역 접종 주기를 완료한 15명의 환자 가운데, 4명의 환자가 MAGEA4 특이적 체액성 반응을 보였으며, 이 환자들은 항체 반응이 없는 환자보다 전체 생존기간이 더 길었다. CD4 및 CD8T 세포 반응이 3명과 6명의 환자에서 각각 관찰되었으며, MAGEA4 특이적 IFNγ 생산 CD8T 세포의 유도를 가진(CD4T 세포의 유도는 아닌) 환자가 그러한 유도가 없는 환자보다 더 오래 생존했다(Saito *et al.*, 2014).

[0109] 폐 전이가 있는 결장암 환자로서 OK432 및 몬타나이드와 함께 융합 펩티드 MAGE-A4-H/K-HELP(글리신 링커에 의한 MAGE-A4(143-154) 살해 에피토프에 융합된 MAGE-A4(278-299) 조력 에피토프로 구성)로 치료받은 환자에 대한 사례 보고가 있다. 이 치료는 MAGEA4 특이적 Th1 및 CTL 면역 반응 및 MAGEA4 특이적 IgG를 유도했다. 최종 진단에서는 종양 성장 및 암배아 항원 종양 표지자가 감소했다(Takahashi *et al.*, 2012).

[0110] 식도암 환자의 제I상 임상 시험에서는 HLA-A*24:02에 결합된 MAGEA4(143-151)를 향하여 반응성인 TCR 유전자조각 자가조직 CTL의 입양 전이를 조사했다. 환자들에게 전처치 치료 없이 TCR 형질도입된 림프구를 1회 투여, 및 2주 및 4주 이후에 MAGEA4 펩티드로 피하 면역접종을 했다. 어떠한 객관적 종양 회귀도 관찰되지 않았으며, 이는 림프구고갈 요법의 결여 및 IL2의 투여에 기인한 것일 수 있다(Kageyama *et al.*, 2015). 마우스의 전임상 연구에서, 이전된 T 세포가 마우스에 접종된 MAGEA4 발현 종양 세포주의 성장을 억제하며, 또한 추가적인 펩티드 백신 접종은 이 항종양 활성을 강화시키는 것을 나타냈다(Shirakura *et al.*, 2012).

[0111] 입양 CTL 전이에 의한 MAGEA4의 표적화가 EBV 음성 호지킨 및 비호지킨 림프종의 치료 옵션으로 제안된다. EBV 유래 펩티드를 표적으로 하는 주입된 CTL은 EBV(+) 림프종 환자에서 완전 관해를 유도하는 것으로 기술되었다. 그러므로, MAGEA4 등 림프구에 의해 발현되는 다른 항원의 표적화가 가능한 치료 옵션으로 탐색되고 있다(Cruz *et al.*, 2011; Gerdemann *et al.*, 2011).

[0112] 여러 연구에서 증복된 펩티드 풀을 사용하여 펄스화된 자가조직 항원 제시 세포와 함께 배양한 후 건강한 공여자 및 암환자의 MAGEA4 특이적 CD4(+) T 세포의 생성을 나타내었다(Cesson *et al.*, 2011; Gerdemann *et al.*, 2011; Ohkuri *et al.*, 2009).

[0113] MAG-003, 즉, KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1)는 MAGEA4(아미노산 286-294)의 HLA-A*0201 제한적인 세포독성 T 림프구(CTL) 에피토프이다(Jia *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011, 이 내용의 전문이 참조문헌으로 본원에 포함된다. 한

양태에서, MAG-003은 HLA-A*0201 양성 PBMC 및 HLA-A*0201/Kb 유전자 삽입 마우스로부터 시험관내에서 펩티드 특이적 CTL을 끌어낸다. 다른 양태에서, 유도된 CTL은 HLA-A*0201 제한 방식으로 세포를 용해시키며, 이는 MAG-003이 HLA-A*0201 제한 CTL 에피토프이며 치료 항종양 백신 접종의 역할을 한다는 것을 나타낸다(Jia *et al.* 2010, 이 내용의 전문이 참조문헌으로 본원에 포함된다).

[0114] 그 밖에 SYFPEITHI 루틴(Rammensee *et al.*, 1997; Rammensee *et al.*, 1999)은 절대 점수 25 및 상대 점수 0.69 로써 MAG-003의 A*02:01 결합을 예측한다. 본 발명자들은 A*02 양성 샘플에 대한 MAG-003 결합으로부터 100 %의 식별을 확인했다.

[0115] [표 4]

[0116] 정상 조직 및 암에서 MAG-003 제시

A*02	샘플	평균 강도	jScore
정상	0 / 245	---	---
암	14 / 397	1.1e+ 07	0.000
HCC	1 / 16	2.9e+ 06	0.000
MEL	0 / 3	0.0e+ 00	
OC	2 / 20	4.0e+ 07	0.000
pNSCLC	11 / 91	1.0e+ 07	0.000

[0117]

[0118] 정상 세포와 비교한 종양 세포 상의 펩티드의 과다 제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 대해 충분하며 일부 펩티드는 정상 조직에서도 발생하는 그 근원 단백질에도 불구하고 종양 특이적이다. 여전히 mRNA 발현 양상 분석은 면역요법을 위한 펩티드 표적의 선택에서 추가적 안정성 수준을 추가한다. 특히 친화도 성숙 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 펩티드는 종양에 고유하며 정상 조직에는 없는 단백질로부터 유래될 것이다.

[0119] 수술로 제거된 조직 샘플은 위에서 지정한 바와 같이 각 환자로부터 서면 동의를 받은 후 제공되었다. 종양 조직 검체는 수술 직후 급속 동결하였고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화하였다. 총 RNA 는 TRIzol(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 샘플로부터 제조되었고 이는 RNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)에 의해 청소되었고; 이 두 개의 모든 방법은 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0120] 종양 및 정상 조직 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 CeGaT(Tuebingen, Germany)사의 차세대 시퀀싱(RNAseq)으로 수행하였다. 간단히 말하면, 시퀀싱 라이브러리는 제공사의 프로토콜(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)에 따라 Illumina HiSeq v4 시약 키트를 사용하여 준비하며, 여기에는 RNA 분절, cDNA 변환 및 시퀀싱 어댑터 추가가 포함된다. 복수의 샘플에서 유래한 라이브러리들은 동일한 몰로 혼합한 다음, Illumina HiSeq 2500 시퀀서에서 그 제조사의 설명에 따라 서열을 결정함으로써 50 bp의 싱글 엔드 리드(single end read)를 생성한다. 처리된 리드는 STAR 소프트웨어를 사용하여 인간 게놈(GRCh38)에 대해 매핑한다. 발현 데이터는 RPKM(백만개 매핑된 리드당 킬로베이스당 리드, Cufflinks 소프트웨어가 생성)으로 전사물 수준 상 및 엑손 수준 상(총 리드, Bedtools 소프트웨어로 생성)에서 제공되며, 앙상블 서열 데이터베이스(Ensembl77)의 주석에 기반한다. 엑손 리드는 엑손 길이 및 정렬 크기에 대해 정규화하여 RPKM 수치를 얻는다.

[0121] 표 5 내지 표 7은 다양한 암에서 MAG-003의 RNASeq 데이터(발현 점수)를 보여준다.

[0122] [표 5]

[0123] RNASeq 점수 1

종양 유형	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
BRCA	1.57	1.23	1.23	1.51
CRC	1.65	1.00	1.00	1.76
HCC	12.10	11.98	11.97	6.15
OC	56.60	18.45	18.44	57.74
OSCAR	58.42	3.49	3.49	60.40
PC	12.10	10.78	10.77	4.74
pGB	0.88	0.95	0.95	0.74
pNSCLC	100.83	1.52	1.52	98.57
RCC	0.93	0.95	0.95	0.77
SCLC	56.41	28.32	28.30	152.27

[0124]

[0125] [표 6]

[0126] RNASeq 점수 3

종양 유형	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
BRCA	7.48	5.11	5.11	6.01
CRC	8.35	1.05	1.05	7.90
HCC	123.03	210.33	210.30	42.22
OC	612.59	333.74	333.69	447.29
OSCAR	632.95	47.41	47.40	468.45
PC	122.95	187.07	187.05	31.15
pGB	0.31	0.18	0.18	0.25
pNSCLC	1100.05	10.26	10.25	768.23
RCC	0.78	0.18	0.18	0.43
SCLC	611.00	524.23	524.17	1190.36

[0127]

[0128] [표 7]

[0129] 종양 발현

종양 유형	tgtumor40	Exontumor40 (27242)	Exontumor40 (317034)	Exontumor40 (593984)
BRCA	0.12	0.04	0.04	0.17
CRC	0.14	0.01	0.01	0.22
HCC	2.05	1.82	1.82	1.18
OC	11.19	3.16	3.16	13.72
OSCAR	10.89	0.42	0.42	13.11
PC	2.09	1.65	1.65	0.89
pGB	0.00	0.00	0.00	0.01
pNSCLC	19.25	0.09	0.09	22.58
RCC	0.01	0.00	0.00	0.01
SCLC	10.18	4.53	4.53	33.35

[0130]

[0131] 여러 암 유형에서 MAGEA4 발현을 보고한 연구 수와는 대조적으로, MAGEA4의 결과 및 예후 사이의 연관성에 대한 증거는 보다 제한적이다. 하지만, 일부 보고에서는 MAGEA4 발현과 임상적 매개변수의 상관관계가 나타난다. 두 경부 편평 세포 암종에서, MAGEA4 발현은 불량한 전체 생존 기간과 상관관계가 있었으며 불량한 결과의 독립적인 예후 지표였다(Cuffel et al., 2011). 진행성 병기의 NSCLC 암(Yoshida et al., 2006; Shigematsu et al., 2010) 및 난소암(Yakirevich et al., 2003)에서 MAGE-A4 발현과 환자 생존 기간 사이에는 역의 상관관계가 있

다. 방광암에서, MAGEA4 발현은 재발 및 근육 침윤성 암으로의 진행과 상관관계가 있었으며(Bergeron et al., 2009), 또한 강한 MAGEA4 염색은 생존 기간의 감소와 연관이 있었다(Kocher et al., 2002). 위장관 기질 종양에서, MAGEA4의 발현은 다른 암 고환 항원과 함께 재발과 상관관계가 있었으며(Perez et al., 2008), 또한 외음부암에서는 MAGEA4가 재발성 종양에서 더 빈번히 검출되었다(Bellati et al., 2007).

- [0132] 고등급 장색성 난소암의 Cancer Genome Atlas(TCGA) 연구에서, 중간값 미만의 MAGEA8 발현은 PFS의 11.4개월 증가와 연관이 있었으며, 따라서 이것이 가장 강한 확인가능한 영향이었다. CD3 수치가 높은 종양 환자에서 MAGEA8의 높은 발현은 더 불량한 PFS와 연관이 있었으며, 이는 면역억제성 Tregs의 활성화를 거치는 것과 같은 MAGEA8과 면역억제성 역할의 가능성을 나타낸다(Eng et al., 2015).
- [0133] 결장암 환자의 고위험군과 저위험군은 8가지 바이오마커(ZBTB32, OR51B4, CCL8, TMEFF2, SALL3, GP5M1, MAGEA8 및 SALL1)에 의해 구별되었으며, 각각 개별 치료의 기준이 제공되었다(Zhang et al., 2015).
- [0134] 인간 편평 세포 암종 세포주 실험에서 MAGEA5 및 MAGEA8이 파니투무맙을 사용한 항-EGFR 요법의 부정적 예측자로 보고되었다(Hartmann et al., 2014).
- [0135] MAGEA4 발현과 진행성 종양 병기의 연관에 대한 증거가 여러 암 유형을 다루는 일부 보고서에서 제공된다. 악성 흑색종에서, MAGEA4 발현은 질병 진행에 따라 증가했으며, 원발성 종양에서 9%가 원격 전이에서 44%로 증가했다(Barrow et al., 2006). 또한, 외음부암에서는, MAGEA4 발현이 림프절 전이가 있는 종양에서 더 빈번했다(Bellati et al., 2007). 더욱이, MAGEA4 발현은 자궁내막 암종(Chitale et al., 2005), 자궁경부 편평 세포암종(Sarcevic et al., 2003) 및 방광암(Bergeron et al., 2009; Kocher et al., 2002)에서 고등급 종양 또는 진행성 병기와 연관이 있었다.
- [0136] 한 구현에서, "뉴클레오티드 서열"은 데옥시리보뉴클레오티드의 이중중합체를 말한다.
- [0137] 특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본원의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 인코딩하는 DNA 절편은 cDNA 단편들과 짧은 올리고뉴클레오티드 링커, 또는 일련의 올리고뉴클레오티드에서 미생물이나 바이러스 오픈론에서 유도된 조절 요소를 구성하는 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공하기 위해서 조립된다.
- [0138] 본원에 사용되는 용어 "펩티드를 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 예를 들어, 수지상 세포 또는 TCR 생산에 유용한 다른 세포계에 의해 서열이 발현되는 생물학적 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.
- [0139] 본원에 사용되는 용어 "TCR 단백질을 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 서열을 발현시키는 생물학적 체계, 예를 들어, TCR의 생산에 유용한 T 세포 또는 다른 세포 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 TCR 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.
- [0140] 본원에 사용되는 핵산 서열에 대한 언급에는 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산 모두가 포함된다. 그러므로, 예를 들어 DNA의 경우 특정 서열이란 문맥에서 달리 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 단일 가닥 DNA, 이 서열의 보체와의 두 가닥(이중 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보체를 가리킨다.
- [0141] 용어 "코딩 영역"은 자연적인 계층 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분을 가리킨다(즉, 유전자의 자연(native) 발현 생성물에 대한 생체내 영역 코딩).
- [0142] 코딩 영역은 비변이("정상")이거나 변이 또는 개조된 유전자로부터 유래할 수 있거나, 심지어 DNA 서열, 또는 실험실에서 DNA 합성의 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자로부터 유래할 수 있다.
- [0143] 용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 생성물인 폴리펩티드 또는 단백질, 및 유전적 코딩 퇴화 및 이에 따른 동일 아미노산 코딩으로 인해 초래된 어떤 핵산 서열 코딩 생성물을 의미한다.
- [0144] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 제품이 완전한 코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나 활동을 유지하는 완전한 코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 가리킨다.
- [0145] 용어 "DNA 분절"을 최소한 한번 이상의 상당히 순수한 형태로 분리된 DNA에서 유도된 단편의 형태, 또는 큰 DNA 구조의 구성 요소로서 DNA 중합체를 가리킨다. 여기서, 순수한 형태는 내인성 오염 물질이 없고 분절 및 표준 생화학 방법, 예를 들어, 복제 벡터에 따른 그 구성 요소 뉴클레오티드 서열의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도를 가리킨다. 이러한 분절은 일반적으로 진행 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또

는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 코딩 영역의 조작 또는 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.

- [0146] 용어 "프라이머"는 한 가닥의 표준 DNA와 짝을 이룰 수 있는 짧은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라아제가 테옥시리보 뉴클레오티드 쇠 합성을 시작하는 자유 3'-OH 말단을 제공한다.
- [0147] 용어 "프로모터"는 모사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라아제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.
- [0148] 용어 "단리"는 그 물질이 원래의 환경(예를 들어, 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들어, 자연 발생하는 살아 있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 단리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제거된다. 한 양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 담체 및/또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 부분이거나 폴리펩티드는 구성의 일부일 수 있고, 이러한 벡터 또는 구성이 자연 환경의 일부가 아닐 때 여전히 단리될 수 있다.
- [0149] 본원에 의거해 밝혀지는 폴리뉴클레오티드 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정제" 형태일 수도 있다. 용어 "정제"는 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 오히려, 그것은 상대적인 정의를 의도하며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로서 상당히 정제된 제조 또는 부분적으로 정제된 제조를 포함할 수 있다. 예를 들어, cDNA 라이브러리에서 단리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 시작 물질 또는 자연 물질의 최소한 하나 이상의 순서, 바람직하게 2 또는 3개 순서, 더 바람직하게는 4 또는 5개 순서의 크기로 정제가 명시적으로 심사숙고된다. 또한, 바람직하게는, 중량으로 99.999%, 또는 최소한 99.99% 또는 99.9%, 심지어는 바람직하게 99%보다 큰 순도를 가진 특허청구범위에 기재된 폴리펩티드가 명시적으로 포함된다.
- [0150] 본원에서 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물은, 이러한 핵산 및/또는 이러한 폴리펩티드를 가진 발현 벡터 뿐만 아니라, "강화된 형태"일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도(예를 들어)의 최소한 2, 5, 10, 100 또는 1000배 정도이고, 유리하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 약 0.1 중량% 이상 정도임을 의미한다. 중량으로 약 0.5%, 1%, 5%, 10% 및 20% 강화된 제조도 고찰된다. 서열, 구성, 벡터, 클론 및 본원의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 단리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은, 예를 들어 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함한 포유류와 같은 동물에게 따로 또는 선택적으로 적당한 보조제와 함께 또는 매개체로서 투여했을 때 면역 반응(즉, 면역성 활동이 있는)을 생성하고 인간과 같은 수용 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 펩티드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관 내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.
- [0151] 본원에 사용된 "부분", "분절" 및 "단편"이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 가리킨다. 예를 들어, 만약에 폴리펩티드가 트립신 또는 키모트립신과 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해 생성된 생성물을 가리킨다.
- [0152] 본원에 따라, 서열을 언급할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동일"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 가리킨다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:
- [0153] 백분율 동일성 = $100 [1 - (C/R)]$
- [0154] 상기 식에서,
- [0155] C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이되,
- [0156] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산,
- [0157] (ii) 기준 서열의 각 차이, 및
- [0158] (iii) 비교 서열의 정렬된 염기 또는 아미노산과 다른 기준 서열의 각 정렬된 염기 또는 아미노산이 차이를 구성하며,
- [0159] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 하고;
- [0160] R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 공백도 염기

또는 아미노산 개수로 계산된다.

- [0161] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있을 수 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.
- [0162] 위에서 언급된 바와 같이, 본원은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 펩티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 대해 85% 상동성인 그 변이체 또는 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 본원의 펩티드는 인간 구조적 적합 복합체(MHC) 클래스 I의 분자에 결합하는 능력 또는 연장된 버전의 상기 펩티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0163] 본원에서, "상동"이라는 용어는 두 개의 아미노산 서열, 즉, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 일치 정도(위의 백분율 동일성 참조)를 일컫는다. 전술한 "상동"은 비교될 두 개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하여 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는, 예를 들어 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.
- [0164] 이 분야의 당업자는 특정 펩티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 펩티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).
- [0165] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"에 의해, 발명자들은, 예를 들어, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 측쇄가 변경되어 그 펩티드가 여전히 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24의 아미노산 서열로 구성된 펩티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다(예를 들어, 그들을 자연적으로 발생하는 다른 아미노산 잔기 또는 다른 측쇄로 펩티드로 구성된다). 예를 들어, 펩티드 변형에 의해 HLA-A*02 또는 -DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 홈과 상호 작용하여 결합하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있고, 이에 따라 활성화된 T 세포의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 향상시키지 않더라도 적어도 유지한다. 마찬가지로, TCR 단백질의 변형에 의해 HLA-A*02 또는 -DR과 같은 적당한 MHC 분자/KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1) 복합체와 상호 작용하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있고, 이에 따라 이는 T 세포의 활성화 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지한다.
- [0166] 이 T 세포는 그 결과로 본원의 한 양태에서 정의된 바 있는 KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1)와 같은 동족의 펩티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응하고 이러한 세포를 죽일 수 있다. 과학 문헌 및 데이터 베이스(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 펩티드의 특정 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며 이는 결합 홈을 이루고 있는 폴리펩티드의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 따라서, 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 정해진 아미노산을 변형할 수 있을 것이며 이러한 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자/KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1) 복합체와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 결정할 수 있어야 한다. 본원의 변이체는 MHC 클래스 I 또는 II 분자/KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1) 복합체를 결합시키는 능력을 유지한다. 본원의 변이체를 발현하는 T 세포는 그 결과 KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1) 등 동족의 펩티드라고 정의된 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포와 교차 반응하고 이 세포를 죽일 수 있다.
- [0167] 여기에서 밝혀진 본래 (변형되지 않은) 펩티드는 달리 언급되지 않는 이상 아마도 선택적인 다른 부위에서 펩티드 쇄의 부위의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게, 이러한 치환은 상기 펩티드의 아미노산 쇄의 말단에 위치한다. TCR 단백질에서는, 바람직하게는 그러한 치환이 TCR 알파 쇄 및 TCR 베타 쇄의 가변 도메인에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들어, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 한 아미노산이 구조 및 특성이 유사한 아미노산에 의해 치환됨으로써 그 성격이 보수적일 수 있다. 심지어 더 보수적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종속에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 용인되고 있고, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는데 기본이 된다.
- [0168] 여기서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 그룹 중 하나의 교환으로 정의된다: 그룹 1 - 작은 지방족, 무극성 또는

약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2 - 극성, 음전하를 가진 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3 - 극성, 양전하를 가진 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4 - 큰 지방족, 무극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5 - 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).

[0169] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보수적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나, 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.

[0170] 물론, 이런 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구조를 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산을 본원의 항원 펩티드에서 흔히 발견되는 L-아미노산으로 교체할 수 있고 본원에서 계속 포함될 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질 생성 아미노산이 아닌) 역시 본원에 따라 면역성과 면역성 폴리펩티드를 생산하기 위해서 치환될 수 있다.

[0171] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 펩티드의 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 펩티드의 항원성에 추가적 효과 또는 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 시험된다. 최대한으로, 펩티드에서 네 곳 이하의 위치에서 동시에 치환될 것이다.

[0172] 본원에 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 펩티드는, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받지 않고, 하나 또는 두 개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환될 수 있다. 또 다른 구현에서는, 본 문서에서 명시된 바와 같이 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 펩티드에 있어서, 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 비변형 펩티드에 비하여 상당히 변경되거나 부정적으로 영향받지 않고 하나 또는 두 개의 아미노산이 그에 대한 보존적 교환 파트너(다음을 참조)와 교환될 수 있다.

[0173] TCR과 상호작용하는 데에 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은 이와 결합됨으로써 T 세포의 반응성에 상당한 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본원의 펩티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는 (발명자들이 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다고 일컫는) 어떠한 펩티드가 될 수도 있다.

[0174] [표 8]

[0175] 본 발명의 펩티드의 변이체들

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
서열 식별 번호:1-13	K	V	L	E	H	V	V	R	V
변이체	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

[0176] 더 긴(연장된) 펩티드도 적합할 수 있다. MHC 클래스 I 에피토프는 대개 실제 에피토프임에도 불구하고 처리 동안 실제 에피토프를 노출하는데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기일 가능성이 있다.

[0178] 본원의 펩티드는 최대 4개 아미노산으로 연장될 수 있는데, 즉, 1, 2, 3 및 4개의 아미노산이 8과 11사이에서 일체의 조합으로 양쪽 어디로든 추가될, 더 긴 펩티드나 실제 에피토프를 포함하는 단백질의 펩티드 처리에 의해 생성된다. 잔기들이 4:0에서 0:4 사이로 인접하는 것이 바람직하다. 본원에 따른 연장의 조합은 표 3에서 찾아

볼 수 있다.

[0179] [표 9]

[0180] 본 발명의 펩티드 연장의 조합

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

[0181]

[0182] 연장/신장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드 또는 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은 펩티드의 안정성 또는 용해도 강화를 위해 사용될 수 있다.

[0183] 따라서, 본원의 에피토프는 자연적으로 발생하는 종양 관련 또는 종양 특이 에피토프와 동일할 수 있거나 실질상 동등한 항원 활성을 가지고 있는 한, 참조 펩티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피토프를 포함할 수 있다.

[0184] 대체의 구현에서, 펩티드는 한쪽 또는 양쪽으로 4개 이상의 아미노산, 바람직하게는 총 30개의 아미노산 길이만큼 연장된다. 이는 MHC 클래스 II 결합 펩티드로 이어질 수 있다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법으로 시험할 수 있다.

[0185] 따라서, 본원은 MHC 클래스 I 에피토프의 펩티드와 변이체를 제공하며, 여기서 펩티드 또는 변이체는 전체 길이가 8 내지 100이며, 바람직하게는 8 내지 30이며, 가장 바람직하게는 8 내지 14이며, 이는 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이다. 연장된 클래스 II 결합 펩티드의 경우 그 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 아미노산일 수도 있다.

[0186] 물론, 본원에 따른 펩티드 또는 변이체는 인간 구조적 적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 갖게 된다. 펩티드 또는 변이체의 MHC 복합체에 대한 결합은 당업계의 방법에 의해 시험할 수 있다.

[0187] 바람직하게는, 본원에 따른 특이적 펩티드의 T 세포가 치환 펩티드에 대해 시험될 때, 치환 펩티드가 배경에 상대적으로 세포 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 펩티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μM 이하, 더 바람직하게 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게 약 100 pM 이하, 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 펩티드가 하나 이상, 최소 2개, 보다 바람직하게 3개의 개별 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.

[0188] 종양 특이적 TCR의 친화도 강화 및 그 이용은 최적의 TCR 친화도에 대한 범위의 존재에 의존한다. 그러한 범위의 존재는, HLA-A2 제한 병원체에 특이적인 TCR의 KD 값이 HLA-A2 제한 종양 관련 자가 항원에 특이적인 TCR에 대해 일반적으로 약 10배 낮다는 관찰에 근거한다(Aleksic et al. 2012; Kunert et al. 2013). 현재 종양은 개인 자체의 세포로부터 발생하기 때문에 종양 항원이 면역성일 수 있음에도 불구하고, 돌연변이된 단백질, 또는 변형된 번역 처리를 가진 단백질만이 면역계에 의해 이물질로 보이게 된다. 상향조절되거나 과발현되는 항원(소위 자가 항원)이 반드시 종양에 대한 기능적 면역 반응을 유도하지는 않을 것이다: 이러한 항원에 고도로 반응성인 TCR을 발현하는 T 세포는 중추 관용이라고 알려진 과정에서 흉선 내부로부터 음적으로 선택되었을 것이며(Xing et al. 2012; Ruella et al. 2014; Sharpe et al. 2015), 이것은 자가 항원에 대해 낮은 친화도 TCR을 가진 T 세포만 남는다는 것을 의미한다. 따라서, 본원의 TCR 또는 TCF의 MAG-003에 대한 친화도는 다음에 설명된 바와 같이 당업계에서 잘 알려진 방법들로 강화되어 왔다.

[0189] "약학 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에서 투여하기에 적합한 조성물이다. 바람직하게, 약학 조성물은 무균 상태이며 GMP 지침에 따라 생산된다.

[0190] 약학 조성물은 유리 형태 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 된 펩티드 또는 TCR 단백질을 포함한다(위의 내용 참조). 본원에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 염"은 펩티드가 산 또는 제제의 염기 염을 만들며 변형되는 공개된 펩티드의 유도체를 말한다. 예를 들어, 산성 염은 적당한 산과의 반응을 가진 자유 염기(일반적으로 중성 NH_2 기가 있는 약물의 중성 형태)로부터 제조된다. 산성 염을 제조할 때 적당한 산은, 예를 들어, 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산과 같은 같은 무기산뿐만 아니라 초산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 수산, 말산, 말론산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 계피산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산과 같은 유기산을 포함한다. 반대로, 펩티드에서 나타날 수 있는 산성 모이어티의 염기 염의 제조는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 트리메틸아민과 같은 약학적으로 허용가능한 염기를 사용한다.

[0191] 본 발명의 또 다른 구현은 비자연적으로 발생하는 펩티드에 관한 것으로서, 상기 펩티드는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 따른 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되며 약학적으로 허용가능한 염으로 합성적으로 생산되었다(예컨대, 합성되었다). 펩티드를 합성적으로 생성하는 방법들은 당업계에서 잘 알려져 있다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 생체내 상태(들)에서의 펩티드와 실질적으로 다르며, 이는 생체 내에서 생성된 펩티드가 염이 아니기 때문이다. 펩티드의 비자연적 염 형태는 특히, 예를 들어 여기서 공개된 펩티드 백신과 같이 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 맥락에서 상기 펩티드의 용해도를 매개한다. 치료할 대상에게 펩티드를 효율적으로 제공하기 위해서는 충분하며 적어도 실질적인 펩티드(들)의 용해도가 요구된다. 바람직하게, 상기 염은 펩티드의 약학적으로 허용가능한 염이다. 본 발명에 따른 이러한 염에는 음이온으로 PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- , 및 양이온으로 NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 및 Ba^{2+} 를 포함하는 계열의 염과 같은 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 염이 포함된다. 특히, 염은 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 및 $\text{Ba}(\text{SCN})_2$ 로부터 선택된다. 특히, 바람직하게는, 예를 들어 염화물 또는 아세트산(트리플루오로아세트산) 염과 같은 NH 아세테이트, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl 및 CaCl_2 이다.

[0192] 특별히 바람직한 구현에서, 약학 조성물의 구현은 아세트산(아세테이트), 트리플루오로아세테이트 또는 염산(염화물)의 염으로 펩티드 또는 TCR 단백질을 포함한다.

[0193] 본원의 다른 양태는 본원의 펩티드 또는 펩티드 변이체, 및 TCR 단백질 및 TCR 변이체를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 폴리뉴클레오티드)을 제공한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있고, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥으로 되어 있을 수 있고, 또는 폴리뉴클레오티드의 자연(native) 또는 안정화 형태(예를 들어, 포스포로티오에이트 주골격을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드)일 수 있고, 펩티드를 코딩하는 한, 인트론을 포함할 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 자연적으로 발생하는 펩티드 결합에 의해 결합이 된 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본원의 또 다른 양태는 본원에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다.

[0194] 특히, DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를, 예를 들어 보완 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들어, 보완 동중중합체 트랙트가 벡터 DNA에 삽입될 DNA 분절에 추가될 수 있다. 벡터와 DNA 분절은 이후 보완 동중중합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 재조합 DNA 분자를 형성할 수 있다.

[0195] 하나 이상의 제한 부위를 포함하는 합성된 링커는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 링커는 상업적으로 인터내셔널 바이오테크놀로지스 인코포레이

티드(International Biotechnologies Inc, 미국 코네티컷주 뉴 하벤 소재)를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.

- [0196] 본 발명에서 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 변형시키는 바람직한 방법은 사이키(Saiki) 등에 의해 공개된 바 있는 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용한다 (Saiki et al., 1988). 이 방법은, 예를 들어 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터의 DNA 도입 또는 이 분야에서 알려져 있는 DNA를 다른 용도를 위해 변환하는데 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두- 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0197] DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우 RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되어 본원의 펩티드 또는 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 따라서, 본원의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 여기에 포함된 배울 수 있는 내용에 따라 적절히 수정된 알려진 기법에 의거하여 사용할 수 있고, 이는 본원의 폴리펩티드의 발현과 생성을 위해 적절한 숙주 세포의 형질전환을 시키는데 사용된다. 이러한 기법은, 예를 들어 다음에 공개되어 있다: 미국 특허 US 4,440,859, US 4,530,901, US 4,582,800, US 4,677,063, US 4,678,751, US 4,704,362, US 4,710,463, US 4,757,006, US 4,766,075 및 US 4,810,648.
- [0198] 본원의 화합물을 구성하는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터일 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적당한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법, 및 에피소말 유지 또는 통합이 필요한 지에 따라 결정될 것이다.
- [0199] 보통, DNA는 발현을 위한 올바른 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 플라스미드와 같은 발현 벡터로 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이 제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)에 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 형질전환된 세포에서 선택가능한 특성(예컨대, 항생제 내성)을 코딩하는 DNA 서열을 필요한 제어 요소와 함께 발현 벡터에 통합시키는 것이다.
- [0200] 다른 방법으로는, 이러한 선택가능한 특성이 다른 벡터에 있을 수도 있고, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시-형질전환하는데 사용된다.
- [0201] 설명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 문서에서 기술된 내용을 고려하여 당업자가 이미 알고 있는 적절한 상태에서 충분한 시간 동안 배양되어 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복된다.
- [0202] 박테리아(예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*)과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들어, 아스페르길스 스피시스(*Aspergillus species*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC 셀 바이올로지 콜렉션(Cell Biology Collection)에서 구할 수 있는 CHO 세포 등의 포유류 세포로 구성될 수 있다.
- [0203] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 벡터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항 마커를 포함한다. 하나의 예는, 파마시아(Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 벡터의 예는 pMSG이며 이 또한 파마시아에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 벡터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 스트라타젠 클로닝 시스템즈(Stratagene Cloning Systems, 미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 소재)에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(YIps)이며 이는 효소 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416은 효소 동원체 플라스미드(Ycps)이다. (예를 들어, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 입수한) CMV 프로모터 기반 벡터는 일시적인 또는 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 조합으로 N-말단 또는 C-말단 라벨 등을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 감지, 정제와 분석을 가능하게 한다. 이중 라벨 융합은 감지 시 유연성을 제공한다.
- [0204] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 규제 지역은 구성 단백질 발현 수준을 높이는 COS 세포에서 1mg/L까지 작동한다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1mg/L 정도이다. SV40 복제 원점이 있음으로써 SV40, 복제를 가능하게 하는 COS 세포 DNA 복제의 수준이 높은 결과를 낳는다. CMV 벡터는, 예를 들어 박테리아 세포에서의 복제를 위한 pMB1 원점, 박테리아에서 암피실린 저항 선택을 위한 b-락타마아제 유전자, hGH poly A, 및 f1 원점을 포함할 수 있다. 프리-프로-트립신 리더(PPT) 서열을 포함하는 벡터는 FLAG 융합 단백질을 ANTI-FLAG 항체, 수지 및 플레이트를 사용하여 정제하기 위한 배양 배지로 분비하도록 방향을 정할 수가 있다. 다른 벡터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.
- [0205] 다른 구현에서는 본원의 2개 이상 펩티드 또는 펩티드 변이체가 인코딩됨으로써 연속적인 순서로 발현된다("염

주 모양" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드 또는 펩티드 변이체는, 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 퍼짐에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있고, 또한 그 사이에 추가의 펩티드 없이 연결될 수 있다. 이러한 구조들은 암 요법에서도 사용할 수 있고 MHC I 및 MHC II 모두가 연관되는 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0206] 본원은 또한 본원의 폴리뉴클레오티드 벡터 구성에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 박테리아 세포가 일부 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있고, 보통 예를 들어 베데스다 리서치 래보러토리스 인코포레이티드(Bethesda Research Laboratories Inc., 미국 메릴랜드주 베데스다 소재)에서 구할 수 있는 대장균 균주 DH5, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC)(미국 메릴랜드주 록빌 소재, No ATCC 31343)에서 구할 수 있는 RR1과 같은 대장균이다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효소, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추 동물이 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501를 포함하며, 이는 대부분 스트라타젠 클로닝 시스템즈(미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 소재)에서 구입가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소 세포, CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장 유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배칼로바이러스 발현 벡터에 의해 세포로 감염될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들어 문헌[Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9] 및 당업자에게 알려진 다른 문헌에서 찾을 수 있다.

[0207] 적당한 세포 숙주를 본 발명의 DNA 구성으로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 벡터의 유형이 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 완성된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는, 예를 들어 코헨(Cohen) 등(Cohen et al., 1972) 및 문헌[Green and Sambrook, 2012]을 참고한다. 효모 세포의 형질 전환은 셔만(Sherman) 등에 기술되어 있다(Sherman et al., 1986). 벅스(Beggs)의 방법 또한 유용하다(Beggs, 1978). 척추 동물 세포와 관련하여 이러한 세포를 감염시키는 시약, 예를 들어 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포솜 제제는 스트라타젠 클로닝 시스템즈 또는 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(Life Technologies Inc., 미국 메릴랜드주 20877 게이터스버그 소재)에서 입수할 수 있다. 전기 천공법 역시 형질전환 및/또는 세포를 감염시키는데 유용하며 이는 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 및 척추동물 세포의 형질전환에 잘 알려져 있다.

[0208] 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본원의 DNA 구조를 가지고 있는 세포는 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별된다. 다른 방법으로는, 상층액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 감지될 수 있다.

[0209] 본원의 특정한 숙주 세포, 예를 들어 박테리아, 효모 및 곤충 세포와 같은 세포는 본원의 펩티드의 제조에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들어, 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포는 적당한 MHC 분자에 로딩되도록 하는 본원의 펩티드를 발현하는데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본원은 본원에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0210] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 전립선산 인산효소(PAP)를 함유하는 재조합 융합 단백질로 로딩된 APC는 무증상 또는 최소한의 증상성인 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료에 대해 미국 식품안전청(FDA)에서 2010년 4월 29일에 승인되었다(Small EJ, et al.(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

[0211] 본원의 다른 양태는 펩티드 또는 이의 변이체를 생산하는 방법, 숙주 세포를 배양하고 펩티드를 숙주 세포 또는 배지에서 단리하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0212] TCR 단백질의 다른 구현에 있어서, 본원의 핵산 또는 발현 벡터는 의학에서 사용된다. 예를 들어, 펩티드 또는 이의 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사용으로 제조될 수 있다. 펩티드 투여의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m. 및 i.v. 투여를 포함한다. DNA 투여의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 투여를 포함한다. 예를 들어, 50 µg 내지 1.5 mg, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg의 용량의 펩티드 또는 DNA는 각각의 펩티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상시험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter et al., 2012).

[0213] 면역 접종에 사용된 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높거나 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법은 이 업계에 잘 알려져 있다. 개요는, 예를 들어 튜펠(Teufel) 등에 제공되어 있다(Teufel et al., 2005). 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았

다. 적당한 백터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 하나 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 있고 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자 총(gene-gun)"을 통한 것과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 펩티드 또는 핵산에 의해 인코딩된 펩티드는 융합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 유도하는 에피톱을 들 수 있다.

[0214] 본원의 약제는 하나 이상의 보조제를 포함할 수도 있다. 보조제는 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질이다(예컨대, 항원에 대한 CD8 양성 T 세포 및 조력 T(TH) 세포에 의해서 증대된 면역 반응). 따라서, 본원에서 보조제는 유용한 약제 구성이라고 간주할 수 있다. 적당한 보조제는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스(등록상표), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 플라젤린 또는 플라젤린에서 유도된 TLR5 리간드, FLT3 리간드, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(ALDARA, 등록상표), 레스퀴미드, ImuFact IMP321, IL-2, IL-13, IL-21과 같은 인터루킨, 인터페론 알파 또는 베타, 또는 이들의 폐결합된 유도체, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, 주브이툼(JuvImmune), LipoVac, MALP2, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, 유증수형과 수증유형 에멀전, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, PepTel(등록상표) 백터 시스템, PLG와 텍스트란 극미립자, 탈락토펜, SRL172, 비로솜(Virosomes) 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타글루칸, Pam3Cys, 사포닌에서 유도된 아퀼라스 QS21 스틸볼론, 마이코박테리아 추출물과 합성 세균의 세포 벽 모방제, 및 다른 리비의 데톡스(Ribi's Detox), 쿼일(Quil), 또는 수퍼포스(Superfos)와 같은 독점 보조제 등이 있다. 프로인트(Freund's) 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 바람직하다. 여러 면역적 보조제(예컨대, MF59)는 수지상 세포에 특이적이고, 그 제조 방법은 이전에 설명된 바 있다(Allison and Krummel, 1995). 또한, 시토키인도 사용될 수 있다. 여러 시토키인은 수지상 세포의 림프 조직으로의 이동에 영향을 주는데 직접적으로 연관된 바 있고(예컨대, TNF-), 이는 수지상 세포의 더 효율적인 T 림프구에 대한 항원 제시 세포로의 성장을 가속시키고(예컨대, GM-CSF, IL-1 및 IL-4)(US 5,849,589, 여기에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨) 면역보조제의 역할을 한다(예컨대, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-알파, IFN-베타)(Gabrilovitch et al., 1996).

[0215] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 백신 환경에서 보조제의 효율성을 높이는 것으로 나타났다. 이 이론에 국한하지 않고, CpG 올리고뉴클레오티드는 톨-유사 수용체(TLR), 특히 TLR9를 통해 친성(비-적응) 면역 체계를 활성화시킨다. CpG에 의해 유도된 TLR9의 활성화는 펩티드 또는 단백질 항원, 살아 있거나 죽은 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포 백신 및 예방적 및 치료적 백신의 다당류 접합체를 포함한 넓은 종류의 항원에 대한 항원 특이적 체액성 및 세포성 반응을 향상시킨다. 더 중요하게, 이는 수지상 세포의 성숙 및 차별화를 향상시키고 이는 TH1 세포의 활성화를 향상시키며 강한 세포독성 T 림프구(CTL) 생성을 CD4 T 세포의 도움이 없을 때에도 향상시킨다. TLR9 자극에 의해 일어난 TH1 바이러스는 보통 TH2 바이러스를 촉진시키는 alum 또는 비완성된 프로인트 보조제(IFA)와 같은 백신 보조제가 존재할 때도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보조제와 함께 제조되거나 함께 투여될 시 또는 특히 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 얻어 내기 위해 필요한 미세 입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 비슷한 제약으로 되어 있을 경우 더 큰 보조제 활동을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시키고, 몇몇의 연구에서 보여진 바 있듯이 CpG가 없을 때 백신 전체 용량이 일으키는 항체 반응 수준으로 항원의 용량을 약 두 배 정도 줄일 수 있도록 한다(Krieg, 2006). US 6,406,705 B1은 CpG 올리고뉴클레오티드, 비핵산 보조제 및 항원 특정 면역 반응을 일으키는 항원의 병용에 대해 설명한다. CpG TLR9 길항제는 몰로젠(Mologon, 독일 베를린 소재)에 의해 만들어진 dSLIM(이중 줄기 루프 면역조절제)이며 이는 본원의 제약 조성의 바람직한 성분이다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9 등의 다른 TLR 결합 분자 또한 사용이 가능하다.

[0216] 다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 화학적으로 변형된 CpGs(예컨대, CpR, Idera), Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 그 유도체(예컨대, 앰프리젠(Amp다른 유용한 보조제의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 화학적으로 변형된 CpGs(예컨대, CpR, Idera), Poly(I:C)와 같은 dsRNA 유사체 및 그 유도체(예컨대, 앰프리젠(AmpliGen, 등록상표), 힐토놀(Hiltonol, 등록상표), poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 및 사이클로포스아미드, 수니티닙, 베바시주맙(Bevacizumab, 등록상표), 셀레브렉스, NCX-4016, 실데나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, 테모졸로마이드, 템시롤리무스, XL-999, CP-547632, 파조파닙, VEGF 트랩, ZD2171, AZD2171, 안티-CTLA4와 같은 면역활성인 소분자 및 항체, 면역계의 주요 구조를 표적화하는 다른 항체(예컨대, 항-CD-40, 항-TGF베타, 항-TNF알파 수용체) 및 SC58175가 있고 이는 치료적으로 및/또는 보조제의 역할을 할 수 있다. 본원에서 사용되는 보조제와 첨가제의 양과 농도는

특별히 다른 실험할 필요 없이 숙련된 기술자에 의해서 쉽게 결정될 수 있다.

- [0217] 바람직한 보조제들은 항-CD40, 이미퀴모드, 레시퀴모드, GM-CSF, 사이클로포스파미드, 수리티닙, 베바시주맙, 인터페론-알파, CpG, 올리고뉴클레오티드 및 유도제, poly-(I:C) 및 유도제, RNA, 실데나필, 및 PLG 또는 비로솜 미립자 제제이다.
- [0218] 본원에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GMCSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드, 레시퀴모드 및 인터페론 알파와 같은 집락 자극 인자로 구성되는 군에서 선택된다.
- [0219] 본원에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GMCSF, 사르가라모스팀), 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 및 레시퀴모드와 같은 집락-자극 인자로 구성되는 군에서 선택된다. 본원에 따른 약학 조성물의 바람직한 구현에서, 보조제는 사이클로포스파미드, 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 훨씬 더 바람직한 보조제는 몬타나이드(Montanide) IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, poly-ICLC(헨토놀(등록상표)) 및 anti-CD40 mAB 또는 이들의 조합들이다.
- [0220] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내와 같은 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해, 펩티드 및 임의적으로 다른 분자들을 약학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수용성 담체에 용해 또는 현탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충액, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 함유할 수 있다. 또한 펩티드는 시토키인과 같은 면역 자극 물질과 함께 투여될 수 있다. 이러한 성분에 사용될 수 있는 방대한 부형제 목록은, 예를 들어 문헌[A. Kibbe, 약학적 부형제 핸드북](Kibbe, 2000)에서 확인할 수 있다. 이러한 조성물은 선종성 또는 암성 질병의 방지, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제제는, 예를 들어 EP 2112253에서 찾아볼 수 있다.
- [0221] 본원에 따른 백신에 의해 일어나는 면역 반응이 다른 세포 단계 및 다른 개발 단계에서는 암을 공격한다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 더욱이, 암과 연관된 다른 신호전달 경로가 공격을 받는다. 이것은 단 하나 또는 몇몇 표적만을 다루는 백신에 비해 이점이며, 이로 인해 종양이 공격에 쉽게 적응(종양 탈출)하도록 유발할 수 있다. 더욱이, 모든 개별 종양들이 같은 패턴의 항원을 발현하는 것은 아니다. 따라서, 종양 연관된 여러 펩티드들의 조합은 모든 개별 종양이 적어도 표적의 일부를 갖도록 보장한다. 이 조성물은 각 종양이 여러 항원을 발현하도록 예상되며, 또한 종양 성장 및 유지에 필요한 여러 독립적 경로를 다루도록 설계되었다. 이에 따라, 백신은 보다 큰 환자 모집단을 위해 "기성품으로" 쉽게 사용이 가능하다. 이는 백신으로 치료할 환자의 사전 선택을 HLA 형질적으로 제한할 수 있고, 항원 발현을 위해 어떠한 추가의 바이오마커 평가를 요구하지 않음을 의미하지만, 효능에 중요한 여러 표적들이 유도된 면역 반응에 의해 동시에 공격됨을 여전히 보장한다(Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).
- [0222] 본원에 사용된 "골격"이란 용어는(예컨대, 항원성) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 말한다. 한 구현에서, 골격은 그것이 부착되는 객체(예컨대, (두 번째) 항원 결합 모이어티)를 표적 부위, 예를 들어 특정 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 기질(예컨대, 현재 용도에 따른 MHC와 펩티드의 복합체)로 향하도록 지시할 수 있다. 또 다른 구현에서, 골격은 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 골격은 항체 및 그 단편, 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 도메인에 결합하는 항원, 하나 이상의 안키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 압타머, (가용성) TCR 및 동종 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 어떤 분자가 표적에 결합하는 골격인지 평가하기 위해, 결합 분석을 수행할 수 있다.
- [0223] "특이적" 결합이란 그 골격이 다른 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 복합체보다 관심 대상의 펩티드-MHC 복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특정 표적이 포함된 세포를 줄일 수 있는 활성 분자로 무장한 골격이 특정 표적이 없는 다른 세포는 죽일 수 없으며 다른 펩티드-MHC 복합체를 제시하는 것을 의미한다. 교차반응성 펩티드-MHC의 펩티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉, 인간 HLA-펩티도로부터 유래되지 않는다면, 다른 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 살해를 평가하는 검사는 당업계에서 잘 알려져 있다. 이 검사는 변경되지 않는 펩티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생하는 펩티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 펩티드가 포함된 세포를 사용하여 수행해야 한다.
- [0224] 각 골격은 표지가 제공하는 신호의 존재 또는 부재를 판단함으로써 결합된 골격이 검출가능하도록 제공하는 표지를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 골격은 형광 염료 또는 임의의 다른 해당되는 세포 마커 분자를 사용하여 표지가 가능하다. 그러한 마커 분자는 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 표지(예를 들어, 형광 염료에

의해 제공되는)는 형광 또는 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 압타머의 가시화를 제공할 수 있다.

- [0225] 각 골격은 IL-21, 항-CD3, 항-CD28과 같은 두 번째 활성 분자와 접합될 수 있다.
- [0226] 폴리펩티드 골격에 대한 추가 정보는, 예를 들어 WO 2014/071978A1의 배경기술 부분과 거기에 인용된 참조문헌을 참고한다.
- [0227] 본원은 또한 압타머에 관한 것이다. 압타머(예는 WO 2014/191359 및 본원에 인용된 문헌을 참조)는 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있고 특정 표적 구조를 인식할 수 있는 짧은 단일 핵산 분자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 압타머는 높은 친화도 및 특이성으로 다양한 복합체 표적에 선택적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.
- [0228] 세포 표면에 위치한 분자를 인식하는 압타머들이 지난 십 년 동안 식별되었으며 진단 및 치료 접근 방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 압타머가 독성 및 면역원성을 거의 보유하지 않는 것으로 나타났으므로, 생의학 적용도를 위한 유력한 후보이다. 정말로 압타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인식하는 압타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며, 또한 생체 모델에서의 이중이식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이, 특이적 종양 세포주를 인식하는 압타머가 식별된 바 있다.
- [0229] DNA 압타머는 다양한 암 세포, 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인식 성질을 밝히기 위해 선택가능한 반면에, 비종양형성 및 원발성의 건강한 세포는 인식되지 않는다. 식별된 압타머가 특이적 종양 아형을 인식할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 압타머는 소위 광범위 진단 및 치료에 적용될 수 있다.
- [0230] 더욱이, 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 압타머는 나노몰 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.
- [0231] 압타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 한 양태에서, 하나 이상 이상의 압타머는 종양 세포가 취하며, 이에 따라 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적 인도를 위한 분자 부형체로서 기능이 가능할 수 있다.
- [0232] 압타머는 세포와 조직과 같은 복합체 표적 및 MHC를 사용한 현재 본원에 따른 펩티드에 대하여, 세포-SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, 지수적 증식에 의한 리간드의 체계적 진화) 기법을 사용하여 선택가능하다.
- [0233] 본원의 펩티드는 MHC/펩티드 복합체에 대한 특정 항체를 생성하고 개발하는데 사용될 수 있다. 이들은 병변 조직에 치료, 독성 물질 표적화 또는 방사능 물질로 사용될 수 있다. 이런 항체의 또 다른 사용은 PET 같은 이미징 목적을 위해 병변 조직의 방사성 핵종을 표적화할 수도 있다. 이 사용은 작은 전이를 감지하거나 병변 조직의 크기와 정확한 위치를 결정하는데 도움이 될 수 있다.
- [0234] 따라서, 본원의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II와 특이적으로 결합하는 재조합 항체의 생산 방법을 제공하는 것으로서, 이 방법은 상기 HLA 제한 항원과 복합되는 가용성 형태의 MHC 클래스 I 또는 II 분자로써 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II를 발현하는 세포를 포함하는 유전자 조작된 비인간 포유동물의 면역화; 상기 비인간 포유동물의 세포를 생산하는 항체로부터 mRNA 분자의 단리; 상기 mRNA 분자에 의해 인코딩된 단백질 분자를 표시하는 파지 디스플레이 라이브러리의 생산; 및 상기 파지 디스플레이 라이브러리로부터 하나 이상의 파지의 단리를 포함하며, 상기 하나 이상의 파지는 상기 HLA 제한 항원과 복합되는 상기 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 특이적으로 결합하는 상기 항체를 나타낸다.
- [0235] 본원의 다른 양태는 HLA 제한 항원과 복합되는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 것으로서, 이 항체는 바람직하게는 다클론 항체, 단클론 항체, 양특이성 항체 및/또는 키메라 항체이다.
- [0236] 그러한 항체 및 단일쇄 클래스 I 주조직적합 복합체의 생산을 위한 해당 방법들 및 이러한 항체의 생산을 위한 다른 도구들은 WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 및 출판물(Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003)에 공개되어 있고, 이들은 본원의 목적을 위해 그 전문이 참조문헌에 명백히 포함되어 있다.
- [0237] 바람직하게, 항체는 20 나노몰 미만, 바람직하게는 10 나노몰 미만의 결합 친화도로 복합체와 결합하는데, 이는

본원의 문맥상 "특이적"으로 간주된다.

- [0238] 본원은 MAG-003에 특이적으로 결합하는 TCR 단백질 또는 변이체 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0239] 본원은 또한 본원에 따른 TCR 단백질에 관한 것으로서, TCR 단백질은 (화학적으로) 변형되고/거나 비펩티드 결합을 포함한다.
- [0240] 본원은 또한 본원에 따른 TCR 단백질을 인코딩하는 핵산에 관한 것으로서, 단 TCR 단백질은 완전한(전체) 인간 단백질이 아니다.
- [0241] 본원은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본원에 따른 핵산에 관한 것이다.
- [0242] 본원은 또한 본원에 따른 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0243] 본원은 또한 의학, 특히 비소세포 폐암의 치료에 사용하기 위한 본원에 따른 TCR 단백질, 본원에 따른 핵산 또는 본원에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0244] 본원은 또한 본원에 따른 핵산 또는 본원에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0245] 본원은 또한 본원에 따른 T 세포인 숙주 세포, 바람직하게는 CD8 양성 T 세포 또는 CD4 양성 T 세포에 관한 것이다.
- [0246] 본원은 또한 본원에 따른 TCR의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터 PBMC를 A2/MAG-003 단량체와 함께 배양하는 단계, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)과 함께 배양하는 단계, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의해 고결합성 T 세포를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0247] 본원은 또한 본원에 따른 TCR의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/p286-1Y2L 단량체와 함께 배양하는 단계, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)과 함께 배양하는 단계, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의해 고결합성 T 세포를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0248] 본원은 또한 본원에 따른 TCR의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/p286-1Y2L9L 단량체와 함께 배양하는 단계, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)과 함께 배양하는 단계, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의해 고결합성 T 세포를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0249] 본원은 또한 본원에 따른 TCR의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR $\alpha\beta$ 유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이식 마우스의 획득, MAG-003에 의한 마우스의 면역접종, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)과의 배양, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의한 고 결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0250] 본원은 또한 본원에 따른 TCR의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR $\alpha\beta$ 유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이식 마우스의 획득, p286-1Y2L에 의한 마우스의 면역접종, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)과의 배양, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의한 고 결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0251] 본원은 또한 본원에 따른 TCR의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 레퍼토리를 보상하는 방대한 TCR 수집물을 발현하는 전체 인간 TCR $\alpha\beta$ 유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이식 마우스의 획득, p286-1Y2L9L에 의한 마우스의 면역접종, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)과의 배양, 및 형광 유세포 분리(FACS)-캘리버 분석에 의한 고 결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0252] 본원은 또한 표적 세포가 MAG-003을 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본원에 따른 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0253] 본원은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에서, 상기된 일체의 TCR 단백질, 본원에 따른 핵산, 본원에 따른 발현 벡터, 본원에 따른 세포, 또는 본원에 따른 활성화된 세포독성 T 림프구의 용도에 관한 것이다. 본원은 또한 본원에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는다.
- [0254] 본원은 또한 본원에 따른 용도에 관한 것으로서, 상기 암 세포는 비소세포 폐암 세포, 또는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장세포암, 뇌암, 위암, 대장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 및 식도암 등의 기타 고형 또는 혈액학적 종양 세포이다.
- [0255] 본원은 또한 비소세포 폐암의 진단 및/또는 예후에 사용될 수 있는 본원에서 "표적"이라 부르는, 본 발명에 따

른 펩티드에 근거하는 특정 표지자 단백질 및 바이오마커에 관한 것이다. 본원은 또한 암 치료를 위한 이러한 새로운 표적의 용도에 관한 것이다.

- [0256] 용어 "항체" 또는 "항체들"은 본원에서 광범위한 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 둘 다 포함한다. 무손상 또는 "온전한" 면역 글로불린 항체 분자뿐만 아니라, 용어 "항체"에 포함되어 있는 것은 그런 면역글로불린 분자와 인간화된 버전의 면역글로불린 버전의 단편(예컨대, CDR, Fv, Fab 및 Fc 단편) 또는 중합체이며, 이 단편은 본 발명에 따른 바람직한 특성(예를 들어, 비소세포 폐암 마커 (폴리)펩티드의 특이적 결합, 높아진 수준의 비소세포 폐암 마커 유전자를 발현하는 암 세포에 독소 전달, 및/또는 비소세포 폐암 마커 폴리펩티드의 활성 억제)을 나타낸다.
- [0257] 가능한 한, 본원의 항체는 상용 공급원으로부터 구입할 수 있다. 본원의 항체는 잘 알려진 방법을 통해서 생성될 수도 있다. 이 분야의 기술자는 전장 폐암 마커 폴리펩티드 또는 그 단편이 본원의 항체를 만드는데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 항체를 생성하는데 사용될 폴리펩티드는 자연적인 원천에서 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있고, 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성될 수도 있다.
- [0258] 당업자는 두 개 이상의 다른 단클론 또는 다클론 항체의 조합의 생성을 의도하는 사용(예컨대, ELISA, 면역조직화학, 생체내 이미징, 면역독소 요법)에 요구되는 특이성 및 친화도를 갖는 항체의 획득가능성을 최대화함을 인식할 것이다. 이 항체들은 그 항체들이 사용되는 목적에 의거하여 알려진 방법에 의해 바람직한 활성도에 대해 시험되고(예컨대, ELISA, 면역조직화학, 면역요법 등; 항체의 생성과 시험에 관한 추가 지침은, 예를 들어 문헌 [Greenfield, 2014]을 참고한다), 예를 들어, 항체는 포르말린 고정 폐암 또는 동결된 조직 절편의 ELISA 분석법, 웨스턴 블롯, 면역조직화학 염색으로 시험할 수 있다. 치료 또는 생체내 진단용을 위한 항체는 초기의 시험 관내 특성화 이후, 알려진 임상 시험 방법에 따라 시험된다.
- [0259] "단클론 항체"라는 용어는 본원에서 치환으로 균등질 항체 개체군에서 획득된 것을 가리킨다. 즉, 이 개체군이 포함하는 각각의 항체는 자연적으로 일어날 수 있는 소수의 돌연변이체를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 본원에서, 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 종 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체의 서열과 상응하거나 일치하고, 쇠의 나머지 부분은 다른 종 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체, 및 이러한 항체의 단편의 서열과 상응하거나 일치하고, 희망하는 상반되는 활동성을 보여주는 "키메라(chimeric)" 항체를 포함한다(US 4,816,567, 여기에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨).
- [0260] 본원의 단클론 항체는 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 생쥐 또는 다른 적당한 숙주 동물이 보통 면역성을 주는 작용제에 의해 면역되어, 면역성을 주는 작용제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 이를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있는 림프구를 유도해 낸다. 다른 방법으로는, 림프구는 시험관 내에서 면역될 수도 있다.
- [0261] 단클론 항체는 또한 US 4,816,567에서 설명된 바와 같은 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 인코딩하는 DNA는 손쉽게 분리되고 전통적인 방법을 사용하여 염기 서열 분석이 가능하다(예컨대, 마우스 유래 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용).
- [0262] 시험관내 방법 또한 1가(monovalent)의 항체를 제조하는데 적당하다. 이 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 항체를 절편화시켜 항체의 단편, 특히 본원에서는 Fab 단편을 생산할 수 있다. 예를 들어, 파파인을 사용하여 소화가 이루어질 수 있다. 파파인 소화의 예는 WO 94/29348 및 US 4,342,566에 설명되어 있다. 항체의 파파인 소화는 보통 각각 하나의 항원 결합 위치 및 남은 Fe 단편을 포함한 Fab 단편이라 부르는 동등한 두 개의 항원 결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 하나의 F(ab')₂ 단편과 하나의 pFc' 단편을 제공한다.
- [0263] 항체 단편(다른 서열과 붙어 있든 그렇지 않든 간에)은, 이 단편의 활동력이 변경되지 않은 항체 또는 항체 단편에 비교할 시, 현저하게 바뀌거나 손상이 되지 않는 한, 삽입, 삭제, 치환, 또는 특정한 위치 또는 특정한 아미노산 잔기의 다른 선택된 변경을 포함할 수 있다. 이러한 변경은 이황화물 결합의 능력이 있는 아미노산의 제거/추가, 생체물 수명의 증가, 분비 특성의 변화 등의 추가적인 특성을 제공할 수 있다. 어떤 경우에도, 항체 단편은 결합 활성, 결합 도메인에서의 결합 조절 등의 생활성물 성질을 소유하고 있어야 한다. 항체의 기능 또는 활동 범위는 단백질의 특정한 지역의 돌연변이 생성, 발현 및 발현된 폴리펩티드의 실험에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법은 이 분야의 기술자가 손쉽게 알 수 있는 기술이며 이는 항체 단편을 인코딩하는 핵산의 위치 특이적 돌연변이 생성을 포함할 수 있다.
- [0264] 본원의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 인간화된 형태의 비인간(예, 쥐과

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

[0265] 이 분야에서 비인간 항체를 인간화하는 방법은 잘 알려져 있다. 보통, 인간화된 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 비인간 근원에서 이에 도입된다. 이 비인간 아미노산 잔류들은 종종 "수입" 잔기이라고 일컬어지며, 이는 대개 "수입" 가변 도메인에서 출처한다. 인간화는 본질적으로 설치류의 CDR 또는 상응하는 인간 항체 서열의 CDR 서열을 인간의 것으로 교체하는 것으로 실행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 키메라 항체(US 4,816,567)이며, 이때 상당히 온전하지 않은 인간 가변 도메인이 비인간 종의 해당 서열로 치환되었다. 실제적으로, 인간화된 항체는 보통 몇몇의 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇의 구조 잔기가 이 설치류의 유사한 영역의 잔기와 치환된 인간 항체이다.

[0266] 면역되었을 때, 내생의 면역글로불린 생성이 없는 중에 전체 인간 항체를 생산할 수 있는 유전자이식 동물(예, 생쥐)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 키메라 배선 돌연변이 생쥐의 항체의 중쇄 결합 영역 유전자 동형 식체는 내생 항체 생산의 완전한 억제 결과를 가져온다. 이러한 배선 돌연변이 생쥐로의 인간 배선 면역글로불린 유전자 정렬 이입은 항원이 존재할 때 인간 항체 생산의 결과를 낳을 것이다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리에서도 생산될 수 있다.

[0267] 본원의 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체에 의해서 대상에게 투여된다. 보통, 적당한 약학적으로 허용가능한 염이 제형을 등장 상태로 만들기 위해 제형에 사용된다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는, 링거 용액(Ringer's solution) 및 포도당 용액이 있다. 이 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8이며, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 더 많은 담체는 항체를 포함하는 세포간질, 예를 들어 막, 리포솜 또는 미세입자와 같은 형태로 되어 있는 고체 소수성 중합체 반투성의 세포간질과 같은 지속적인 방출 준비를 포함한다. 예를 들어, 투여 방법 및 투여되는 항체의 농도에 따라 어떤 담체가 더 바람직한지는 이 분야의 당업자에게는 명백할 것이다.

[0268] 항체는 대상, 환자 또는 세포에 주사(예, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내), 또는 주입과 같은 혈액으로의 전달이 효율적으로 이루어질 수 있는 다른 방법으로 투여될 수 있다. 항체는 국소뿐만이 아니라 전신의 치료 효과를 얻기 위해 종양내 또는 종양 주위 방법으로도 투여될 수도 있다. 국소 또는 정맥내 주사가 바람직하다.

[0269] 항체 투여의 효율적인 용량과 일정은 경험적으로 결정될 수 있고, 이러한 결정을 내리는 것은 이 분야의 기술 중의 하나이다. 이 분야의 당업자는 투여되는 항체의 용량이, 예를 들어 항체를 받는 대상, 투여 방법, 사용되는 특정한 항체의 종류 및 투여되는 다른 약들에 따라 달라진다는 것을 이해할 것이다. 단독으로 사용될 시 전형적인 항체의 일일 용량은 1 µg/kg 내지 100 mg/kg로 변할 수 있고, 위에 언급된 요인을 고려할 때 이보다 더 높을 수도 있다. 바람직하게는 비소세포 폐암의 치료를 위한 항체의 투여 후, 이 분야의 기술자들에게 알려진 다양한 방법으로 이 항체의 치료적 효율성을 평가할 수 있다. 예를 들어, 치료를 받고 있는 대상에서 암의 크기, 숫자, 및/또는 분포 등이 종양 영상 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 항체의 투여가 없을 경우 발생할 질병 경과와 비교하여, 종양의 성장의 정지하고, 종양 수축의 야기 및/또는 새로운 종양 발생의 예방을 야기하는 치료의 목적으로 투여된 항체는 효과있는 폐암의 치료라고 할 수 있다.

[0270] 본원의 다른 양태는 특이적 펩티드-MHC 복합체를 인식하는 가용성 T 세포 수용체(sTCR)의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 가용성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성가능하며, 그 친화도는 상보성 결정 부위를 표적으로 하는 돌연변이유발성에 의해 증가시킬 수 있다. T 세포 수용체 선택을 위하여, 파지 디스플레이 이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, 문헌[Liddy et al., 2012]). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화 및 약물로서의 실용적인 사용을 위하여, 알파 및 베타 쇠가 연결될 수 있고, 예를 들어 비자연적(non-native) 이황화 결합, 기타 공유 결합(단일 쇠 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결된다(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실

행을 목적으로 독소, 약물, 시토카인(예를 들어, US 2013/0115191 참고), 항-CD3 도메인 등과 같은 효과기 세포를 모집하는 도메인과 연결될 수 있다. 다른 양태에서, 이것은 입양 전이에 사용되는 T 세포에서 발견될 수 있다. 예를 들어, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1 및 WO 2013/057586A1을 참고하며, 그 내용은 전문이 참조 문헌에 포함되어 있다.

[0271] 그 밖에, 본원의 펩티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 생검 샘플에 근거한 병리학자의 암 진단을 확인하는 데 사용이 가능하다.

[0272] 항체 또는 TCR은 생체 내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 일반적으로, 항체는 방사성핵종으로 표지되고(예, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P 또는 ³⁵S) 면역섬광계수법(immunoscintigraphy)을 사용하여 종양의 위치가 결정될 수 있다. 하나의 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 상기 언급된 단백질로 구성되는 균으로부터 선택한 두 개 또는 그 이상의 표적의 세포의 도메인에 결합하고 친화도 값(Kd)은 1x10⁻⁶ μM 미만이다.

[0273] 진단의 용도로 사용되는 항체는 여러 가지 영상 방법으로 감지될 수 있는 적당한 프로브로 표지될 수 있다. 프로브의 감지 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광기 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영기를 포함하지만 이에 국한되지 않는 방법을 들 수 있다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신과 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄과 다른 란타넘계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 것을 들 수 있다. 또한, 프로브는 두 개 이상의 기능을 가지고 있을 수 있고, 본원에 나열된 하나 이상의 방법으로 감지될 수 있다. 이러한 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 본원에 나열된 프로브로 표지될 수 있다. 이렇게 항체와 프로브를 연결하는 것으로는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유원자 연결, 프로브의 항체로의 편입, 및 프로브의 결합을 위한 킬레이트 화합물의 공유원자 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다. 고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 절편은 표지된 1차 항체 및 2차 항체와 접촉되며, 이때 체자리 단백질 발현 감지를 위한 항체가 사용된다.

[0274] 본 발명은 다음 실시예에서 더욱 설명되지만, 이로써 제한되지는 않는다. 본 발명의 목적상 본원에 인용되는 모든 참조문헌은 그 전문이 참조문헌으로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0275] 도 1은 MAGEA4에서 MAG-003 엑손 발현을 보여준다(종양 대 건강한 조직, RNASeq 데이터). 건강한 조직에서 MAGEA4의 MAG-003 엑손 발현을 다양한 암에서의 조직(빨간색 막대)과 비교했다. 건강한 조직의 아형을 고위험(진한 녹색 막대), 중간 위험(연한 녹색 막대), 저위험(회색 막대) 조직으로 분류한다. 각 막대는 하나의 샘플을 나타낸다. 정상 조직 상에서 높은 발현은 태반과 고환(저 위험)에서만 나타난다. (RPKM = reads per kilobase per million mapped reads.)

도 2는 MAGEA8 상에서 MAG-003 엑손 발현을 보여준다(종양 대 건강한 조직, RNASeq 데이터). 건강한 조직 상에서 MAGEA8의 엑손 발현을 다양한 고형 암에서의 조직(빨간색 막대)과 비교했다. 건강한 조직의 아형을 고위험(진한 녹색 막대), 중간 위험(연한 녹색 막대), 저위험(회색 막대) 조직으로 분류한다. 각 막대는 하나의 샘플을 나타낸다. 정상 조직 상에서 높은 발현은 태반(저위험)에서만 나타난다. (RPKM = reads per kilobase per million mapped reads.)

도 3 내지 5는 MAG-003 펩티드(서열 식별 번호 1) 또는 본원에 공개된 바와 같이 서열 식별 번호 1의 1 내지 9 위치에서의 다양한 MAG-003 알라닌 치환 변이체를 로딩한 표적 세포와 공동 배양 후, MAG-003 특이적 TCR의 알파 및 베타쇄 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포로부터의 IFN γ 방출을 보여준다.

도 6은 실시예 7에 따른 MAGEA4 발현을 보여준다. MAGEA4 mRNA는 제시된 암 검체에서 검출이 가능하다. 발현의 수준에는 범위가 있으며, 두경부암 및 비소세포 폐암 검체(HNSCC062T1, HNSCC064T1 및 NSCLC004T1)의 경우 발현이 상당히 높고 비소세포 폐암 및 난소암 검체(NSCLC006T1 및 OC036T1)의 경우 발현이 꽤 낮다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0276] 실시예

[0277] 자가조직 환경, 즉 환자로부터 유래한 T 세포에 비해, 자가 내성을 피하고 결합성이 더 높은 T 세포를 산출하기 위해 동종반응성 환경을 사용할 수 있다. 그러한 환경의 예로는 동종-HLA 반응성, 펩티드 특이적 T 세포의 시험

관내 생성(Sadovnikova et al. 1998; Savage et al. 2004; Wilde et al. 2012), 및 인간-MHC 또는 인간 TCR에 대한 유전자 삽입 마우스의 면역접종(Stanislawski et al. 2001; Li et al. 2010)이 포함된다.

[0278] **실시예 1**

[0279] 동종-HLA 반응성, 펩티드 특이적 T 세포의 시험관내 생성(Savage et al. 2004)

[0280] HLA-A*02 음성의 건강한 공여자로부터 동의를 얻은 후 PBMC를 사용했다. MAG-003을 함유하는 재조합 비오틴화 HLA-A2 클래스 I 단량체 및 A2 형광 사합체는 MBLI(미국 매사추세츠주 워번 소재)로부터 얻었다. PBMC는 인산 완충 식염수(PBS)로 희석된 항-CD20SA와 함께 실온에서 1시간 동안 배양한 후 세척하고, 비오틴화 A2/MAG-003 단량체와 함께 실온에서 30분 동안 배양한 다음 다시 세척하고, 이어서 10% 인간 AB 혈청 및 RPMI에서 24-웰 플레이트에 3×10^6 세포/웰 비율로 배치했다. 인터루킨 7(IL-7; 알앤디 시스템즈(R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재))을 제1일에 10 ng/mL로 첨가했으며, IL-2(키론(Chiron, 영국 헤어필드 소재))은 제4일에 10 U/mL로 첨가했다. 5주의 기간에 걸쳐 세포를 PBMC로 매주 다시 자극하고 1:1의 비율로 반응자 세포와 포함한 다음 24 웰 플레이트에 3×10^6 /웰의 비율로 배치했다.

[0281] 결합성이 높은 T 세포를 얻기 위해, 약 10^6 개 PBMC와 HLA-A2/MAG-003 사합체-피코에리트린(PE)(MBLI로부터 취득)을 37°C에서 30분 동안 배양한 다음, 항-CD8-플루오레세인 이소티오네이트(FITC)/알로피코시아닌(APC)과 4°C에서 20분 동안 배양하고, 이어서 형광 활성화 세포 분리(FACS)-캘리버 분석을 수행했다. 분리에는 FACS-Vantage를 사용했다(Becton Dickinson, 영국 옥스포드 Cowley). 분리된 사합체 양성 세포를 24웰 플레이트에서 팽창시켰으며, 이때 2×10^5 분리된 세포, 피더로서 2×10^6 조사된 A2 음성 PBMC, 2×10^4 CD3/CD28 비드/mL(다이날(Dynal, 노르웨이 오슬로 소재)) 및 IL-2(1000 U/mL) 조건이 사용되었다. 다음에는 아미노산/DNA 서열결정 및 발현 백터로의 클로닝을 위해 당업계에 잘 알려진 방법으로 이렇게 얻어진 고결합성의 T 세포를 사용하여 TCR을 동정하고 단리했다.

[0282] **실시예 2**

[0283] 인간-MHC 또는 인간 TCR의 유전자삽입 마우스의 면역접종

[0284] MAG-003을 사용하여 전체 인간 TCR α β 유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용하여 유전자삽입 마우스의 면역접종을 했으며, 그 T 세포는 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 인간 TCR 레퍼토리를 발현한다(Li et al. 2010). 고결합성의 T 세포를 얻기 위해, 유전자삽입된 마우스로부터 얻은 PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)과 배양한 다음 위의 설명과 같이 세포 분리를 수행한다. 다음에는 이렇게 얻어진 고결합성의 T 세포를 사용하여 당업계에 잘 알려진 방법으로 아미노산/DNA 서열 결정 및 발현 백터로의 클로닝을 위해 TCR을 동정하고 단리했다.

[0285] 한 양태에서, MAG-003과 그 변이체, 즉, p286-1Y2L(2개의 아미노산 치환을 가짐, 서열 식별 번호 2) 및 p286-1Y2L9L(3개의 아미노산 치환을 가짐, 서열 식별 번호 3)은 HLA-A*0201 분자에 대해 강한 결합 친화도와 안정성을 보인다. 특히, p286-1Y2L9L은 특정 CTL을 유도하는 능력을 보였으며, 이것은 한 양태에서 건강한 공여자와 HLA-A2.1/Kb 유전자 삽입된 마우스의 두 PBMC 모두로부터의 표적 암 세포를 용해시킨다. 예를 들어, (Wu et al. 2011)을 참고하며, 그 내용은 전문이 여기에 참조문헌으로 포함된다.

[0286] MHC I에 필요한 고결합성 TCR 또는 II/p286-1Y2L이나 p286-1Y2L9L 복합체를 얻기 위해, 실시예 1 및 2에 설명된 방법에서 이러한 펩티드를 사용할 수 있다. 다음에는 이렇게 얻어진 고결합성의 T 세포를 사용하여 당업계에 잘 알려진 방법으로 아미노산/DNA 서열 결정 및 발현 백터로의 클로닝을 위해 TCR을 동정하고 단리했다.

[0287] 고결합성 TCR 변이체도 효모, 파지 또는 T 세포 디스플레이에 의한 CDR 돌연변이의 라이브러리로부터 선택할 수 있다(holler et al. 2003; Li et al. 2005; Chervin et al. 2008). 그리하여 후보 TCR 변이체는 고결합성 TCR 변이체를 얻기 위한 TCR의 CDR 돌연변이 설계의 지침을 제공한다(Robbins et al. 2008; Zoete et al. 2007).

[0288] **실시예 3**

[0289] TCR의 클로닝

[0290] TCR의 클로닝 방법은 당업계에 알려져 있고, US 8,519,100의 설명이 한 예이고, 상기 방법에 관한 내용의 전문이 본원에 참조문헌으로 포함된다. 세균에서 효율적인 발현의 개시를 위해 도입된 메티오닌인 제한 부위 NdeI를 인코딩하는 알파 쇠 가변 영역 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 A1 및 제한 부위 SalI를 인코딩하는 알파 쇠 불변 영역 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 A2를 사용하여 알파 쇠 가변 영역을 증폭시킨다. 베타 쇠의 경우, 예

를 들어 세균에서 효율적인 발현의 개시를 위해 도입된 메티오닌인 제한 부위, 예컨대 NdeI를 인코딩하는 베타 쇠 가변 영역 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 및 제한 부위, 예를 들어 AgeI를 인코딩하는 베타 쇠 불변 영역 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 B2를 사용하여 베타 쇠 가변 영역을 증폭시킨다.

[0291] 알파 및 베타 가변 영역이 문헌[Molecular Cloning a Laboratory Manual Third edition by Sambrook and Russell]에 설명된 표준 방법에 의해 C α 또는 C β 를 함유하는 pGMT7 기반 발현 플라스미드로 클로닝되었다. 플라스미드는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 3730x1 DNA 애널라이저(Analyzer)를 사용하여 서열을 판정했다.

[0292] NdeI 및 SalI로 절단된 TCR 알파 쇠를 인코딩하는 DNA 서열이 pGMT7+C α 벡터로 절찰되었으며, 그 벡터는 NdeI 및 XhoI로 절단되었다. NdeI 및 AgeI로 절단된 TCR 베타 쇠를 인코딩하는 DNA 서열이 별도의 pGMT7+C β 벡터로 절찰되었으며 그 벡터도 NdeI 및 AgeI로 절단되었다. 절찰된 플라스미드는 경쟁하는 대장균 균주 XL1-blue 세포로 형질전환되고 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 LB/한천 플레이트에 배치된다. 37°C에서 하룻밤 동안 배양 후, 단일 균락을 선택하여 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 10 ml LB에서 37°C 및 진탕의 조건하에 성장시킨다. 클로닝된 플라스미드는 미니프렙(Miniprep) 키트(퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 정제하고 인서트는 자동 DNA 시퀀서(라크 테크놀로지스(Lark Technologies))를 사용하여 서열을 판정한다.

[0293] **실시예 4**

[0294] 자가조직 T 세포 유전자조작

[0295] T 세포는 고결합성 TCR(소위 TCR 요법) 또는 MHC I/MAG-003 복합체 또는 MHC II/MAG-003 복합체에 대해 강화된 항원 특이성을 갖는 단백질 융합 유래 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전자조작이 가능하다. 한 양태에서, 이 접근 방법은 중추 및 말단 내성과 연관 있는 일부 제한을 극복하며, 환자에서 새로운(de novo) T 세포 활성의 요건 없이 종양의 표적화에 보다 효율적인 T 세포를 생성한다.

[0296] 본원의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 실시예 1 내지 실시예 3에서 설명한 바와 같이 동정되고 단리된 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 쇠를 인코딩하는 핵산을 감마-레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝했다. 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 시험했다. 다음에는 최종 생성물의 일정 부분을 사용하여 표적 T 세포 모집단(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제된)을 형질도입하며, 모집단은 환자에 주입하기 전에 팽창시킨다.

[0297] 말초 T 세포로 도입되는 TCR 쇠는 CD3 복합체와의 연관을 위해 내생 TCR 쇠와 경쟁할 수 있으며, 이는 TCR 표면 발현에 필요하다. 표적 종양 항원을 발현하는 세포에 의한 유발에 필요한 적절한 감수성의 부여에는 높은 수준의 TCR 표면 발현이 필수적이기 때문에(Cooper *et al.*, 2000; Labrecque *et al.*, 2001), TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현의 수준을 강화시키는 전략은 TCR 유전자 치료에서 중요한 고려사항이다.

[0298] 본 발명의 TCR 발현을 증가시키려면, 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포바이러스(CMV), 쥐 줄기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세레이트 키나제(PGK), β -액틴, 유비퀴틴 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)/CD43 복합 프로모터(Cooper *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2009), 연장 인자(EF)-1a(Tsuji *et al.*, 2005), 비장 포커스-형성 바이러스(SFFV) 프로모터(Joseph *et al.*, 2008)와 같은 강력한 프로모터를 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0299] 강력한 프로모터 외에도, 다수의 TCR 발현 카세트가 유전자도입 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소를 포함하며, 여기에는 렌티바이러스 구성(Follenzi *et al.*, 2000)의 핵 전위를 촉진시키는 중추 폴리퓨린 트랙트(cPPT), 및 RNT 안정성의 증가로 이식유전자 발현을 증가시키는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절요소(wPRE)(Zufferey *et al.*, 1999)가 포함된다.

[0300] 높은 수준의 TCR 표면 발현을 성취하려면 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠가 높은 수준으로 전사되는 것이 요구된다. 이를 위해서, 본 발명의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠를 단일 벡터에서 바이시스트로닉(bicistronic) 구성으로 클로닝할 수 있으며, 이는 이러한 장애를 극복할 수 있는 것으로 나타났다. TCR-알파 TCR-베타 쇠 사이의 바이러스성 내재 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용은 두 쇠의 조율된 발현을 초래하며, 이는 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠가 번역 도중 단일 전사체로부터 생성되어 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠의 동등한 몰비의 생산을 보장하기 때문이다(Schmitt *et al.* 2009).

[0301] TCR 전이유전자 발현의 증가에 혜택을 주는 것으로 입증된 다른 변형은 코돈 최적화이다. 유전자 코드의 반복성은 하나를 초과하는 코돈에 의해 일부의 아미노산 인코딩을 허용하지만, 일부 코돈은 다른 코돈에 비해 "최적"

미만이며 이것은 일치하는 tRNA 및 다른 요인들의 상대적 가용성 때문이다(Gustafsson *et al.*, 2004). 각 아미노산이 포유류 유전자 발현을 위한 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 서열의 변경 및 mRNA 불안정성이나 잠재 스플라이스 부위의 제거는 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(Scholten *et al.*, 2006).

[0302] 더욱이, 도입된 TCR과 내생 TCR 사이의 틀린 짝짓기는 자가면역성에 대해 유의한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래할 수 있다. 예를 들어, 혼합된 TCR 이량체의 형성은 적절하게 짝지어진 TCR 복합체의 형성에 이용할 수 있는 CD3 분자의 숫자를 감소시킬 수 있으므로, 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소시킬 수 있다(Kuball *et al.*, 2007).

[0303] 틀린 짝짓기를 감소하기 위해 도입된 쇠의 내생 TCR과의 짝짓기 능력은 감소시키면서 쇠간 친화도를 촉진시키기 위해 본 발명의 도입된 TCR 쇠의 C-말단 도메인을 변형시킬 수 있다. 이러한 전략에는 인간 TCR-알파 및 TCR-베타 C-말단 도메인을 이의 쥐 상대물(쥐 C-말단 도메인)로 교체, 제2 시스템 잔기를 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠로 도입하여 C-말단 도메인의 제2 쇠간 이황화 결합의 생성, TCR-쇠 및 TCR-베타 쇠의 C-말단 도메인("늑-인-홀(knob-in-hole)")에서 상호작용하는 잔기의 교환, 및 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠의 가변 도메인을 CD3 ζ 에 직접 융합(CD3 ζ 융합) 등이 포함될 수 있다(Schmitt *et al.* 2009).

[0304] 본 발명은 MAG-003을 과다 또는 배타적으로 제시하는 암/종양, 바람직하게 비소세포 폐암의 치료에 유용한 TCR 단백질을 제공한다.

[0305] **실시예 5**

[0306] 동종이형 T 세포 유전자조작

[0307] 병원체에 병원체에 대한 일차 방어에 연루된 비전통적 T 림프구 효과기인 감마 델타($\gamma\delta$) T 세포는 TCR-감마 및 TCR-베타 쇠 등 수용체의 활성화를 통해 MHC에 비의존적 방식으로 종양 세포와 상호작용하여 조절할 수 있다. 이러한 $\gamma\delta$ T 세포는 신속한 시토카인 생산을 허용하는 사전활성화된 표현형(IFN- γ , TNF- α) 및 활성화에 따른 강력한 세포독성 반응을 표시한다. 이러한 T 세포는 다수의 암에 대한 항종양 활성도를 가지며 $\gamma\delta$ T 세포 매개에 의한 면역요법이 가능하며 객관적 암 반응을 유도할 수 있음을 시사한다(Braza *et al.* 2013).

[0308] 고정 항원, 작용제 단클론 항체(mAbs), 종양 유래 인공 항원 제시 세포(aAPC) 또는 mAbs와 aAPC의 조합을 사용한 최근의 발전 내용은 올리고클론 또는 다클론 TCR 레퍼토리로 감마-델타 T 세포를 팽창시키는데 성공적이었다. 예를 들어, 고정 주조직적합 복합체 클래스-I 쇠 관련 A는 TCR δ 1 이소형을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포에 대한 자극이었으며, 플레이트 결합된 활성화 항체는 V δ 1 및 V δ 2 세포를 생체 외에서 팽창시켰다. aAPC 상에서 공동 배양 이후 임상적으로 충분한 양의 TCR δ 1, TCR δ 2 및 TCR δ 1^{neg}TCR δ 2^{neg}가 생산되었으며, 이러한 하위조합은 기억 표현형의 차이와 종양에 대한 반응성을 시험관 내 및 생체 내에서 나타냈다(Deniger *et al.* 2014).

[0309] 또한, $\gamma\delta$ T 세포는 유전적 변경을 받아들이며, 이는 TCR-알파 및 TCR-베타 쇠의 도입에 의해 입증된다(Hiasa *et al.* 2009). 본원의 다른 양태는 MAG-003에 결합하는 TCR-알파 및 TCR-베타를 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포의 생산에 관한 것이다. 이렇게 하려면, $\gamma\delta$ T 세포가 데니거(Deniger) 등(2014)에 의해 설명된 방법에 의해 팽창된 다음, MAG-003에 결합하는 TCR을 발현시키는 재조합 바이러스를 팽창된 $\gamma\delta$ T 세포 안으로 형질도입한다(실시예 3에서 설명). 이어서, 바이러스 형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포는 환자로 주입된다.

[0310] **실시예 6**

[0311] 면역원성 및 기능적 T 세포 데이터

[0312] MAG-003의 면역원성은 약학 생성물의 제조 절차를 흉내내는 프로토콜을 사용하여 시험했다. MAG-003 특이적 T 세포의 프라이밍을 건강한 공여자에 대해 관찰했다. 생성된 T 세포는 기능성을 발휘하는 펩티드 로딩된 표적 세포를 죽일 수 있었다. 이 데이터는 1) MAG-003이 면역원성 표적이며, 2) MAG-003에 대해 생성된 T 세포는 기능적임을 입증하였다.

[0313] 생성된 추가 데이터는 MAG-003이 HLA-A*02:01에 대해 매우 좋은 결합을 가진 펩티드라는 증거를 제공했다.

[0314] **실시예 7**

[0315] 조직에서 MAGEA4 mRNA의 발현

[0316] 포르말린 고정 또는 동결 조직 절편에서 mRNA 발현을 직접 검출하기 위해 제자리 부합법(ISH)이 사용되었다. 이 방법은 높은 민감도와 공간 분해능으로 인하여 세포 유형 특이적 표적 발현 및 암 조직 절편 내에서 표적 발현의 분배 또는 빈도의 판정에 적절하다.

[0317] ISH는 어드밴스드 셀 다이아그노스틱스(Advanced Cell Diagnostics, ACD)에서 개발한 BaseScope(상표) 기술을 사용하여 MAGEA4 mRNA를 검출하기 위해 ISH를 수행했다. BaseScope(상표) 기술은 표적 서열에 대해 최대 4쌍의 Z-형상 올리고뉴클레오티드 프로브의 혼성화에 근거하는 기술이다. 신호 증폭은 분지 DNA 증폭에 의해 달성되며, 이는 올리고뉴클레오티드의 복수의 혼성화 단계, 궁극적으로 분지 DNA(bDNA) 트리의 구축에 근거한다. 마지막으로 굉장히 많은 수의 라벨 프로브가 bDNA 트리의 분지에 대해 혼성화되며 강화된 신호의 검출이 가능하다. 유색소생성 BaseScope(상표) 검출 키트(RED)에는 효소(알칼리성 인산 분해효소)에 연결된 라벨 프로브가 포함된다. 신호 검출은 원래 신호를 추가로 증폭시키는 색소생성 기질 FastRed의 효소 전환에 의존한다. BaseScope(상표)는 매우 민감한 기술로서, 신호 증폭의 효율적인 과정에 기인하는데, 이것은 표적 mRNA가 부분적으로 교차결합되거나 열화되더라도 Z 프로브 상의 높은 민감도와 강력한 결합의 조합으로 가능하다. ACD에 따르면, 검출가능한 ISH 신호를 생성하는데 1개의 단일 프로브 쌍 가운데 하나와 단일 mRNA 분자의 결합이면 충분하다.

[0318] 각 ISH 실험은 2가지 방법론적인 과정으로 더욱 나뉜다: 1) 표적 복구를 위한 조직 전처리, 및 2) 표적 혼성화, 신호 증폭 및 검출. 최적의 전처리 조건은 FFPE 조직 절편에서 성공적인 표적 검출에 매우 중요하다. 고정 과정은 세포 및 조직에서 단백질, DNA 및 RNA의 교차결합을 유도하고 그로써 혼성화 부위를 가린다. 따라서, 표적 mRNA의 접근성과 프로브 세트의 적절한 결합의 보장을 위해서 이러한 교차결합은 표적 혼성화 전에 제거되어야 한다. 조직 전처리에는 3개의 분리된 단계가 포함된다: 1) 과산화수소 처리에 의한 내생 알칼리성 인산분해효소의 차단, 2) 표적 복구 시약에서의 비등에 의한 표적 복구, 및 3) 단백분해효소 소화에 의한 표적 복구. 고정 및 교차결합의 정도는 FFPE 블록 간에 다를 수 있으므로, 최적의 표적 복구 조건은 각 개별 FFPE 블록에 대해 실험적으로 결정해야 한다. 따라서, 조직 절편을 다른 비등 및 단백분해효소 효소 시간에 노출시킨 다음 양성 및 음성 대조군 프로브 세트로 혼성화하였다. 최적의 조건은 양성 대조군에서 특이적 신호 강도의 현미경 평가, 음성 대조군에서 비특이적 배경 및 조직 형태에 의해 결정되었다. 조직 전처리는 제조사의 프로토콜에 따라 수행했다. 전처리 시약은 BaseScope(상표) 시약 키트에 포함되어 있다. 여러 전처리 단계의 완료 후, 관심 대상의 mRNA와 특정 프로브 세트와의 혼성화, 그 다음의 분지 DNA 신호 증폭 및 색소생성 또는 형광 신호 검출에 의해 표적 발현을 평가했다. 모든 분석은 제조사의 프로토콜에 따라 수행했다.

[0319] [표 10]

[0320] 발현 분석

샘플	조직	MAGEA4 발현
HNSCC062T1	두경부암	++
HNSCC064T1	두경부암	++
NSCLC004T1	비소세포 폐암	++
NSCLC006T1	비소세포 폐암	+
OC036T1	난소암	+
해당 절편에서 MAGEA4의 전체 발현 수준 ± 매우 낮음, + 낮음에서 중간, ++ 강력, +++ 매우 강력		

[0321]

[0322] 참조 문헌 목록

- Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.
- Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.
- Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.
- Bar-Haim E, Paz A, Machlenkin A, Hazzan D, Tirosh B, Carmon L, Brenner B, Vadai E, Mor O, Stein A, Lemonnier FA, Tzehoval E, Eisenbach L (2004). MAGE-A8 overexpression in transitional cell carcinoma of the bladder: identification of two tumour-associated antigen peptides. *Br. J Cancer* 91, 398-407.
- Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.
- Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rughetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.
- Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* 125, 1365-1371.
- Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.
- Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.
- Cabezon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as

[0323]

potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics*. 12, 381-394.

Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.

Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.

Chen CH, Huang GT, Lee HS, Yang PM, Yan MD, Chen DS, Sheu JC (1999). High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular carcinoma. 1999. *Liver* 19, 110-114.

Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.

Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.

Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.

Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS. ONE*. 9, e104099.

Duffour MT, Chau P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* 29, 3329-3337.

De PE, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De SC, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, . (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.

Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 39, 963-974.

[0324]

- Eng KH, Weir I, Tsuji T, Odunsi K (2015). Immunostimulatory/regulatory gene expression patterns in advanced ovarian cancer. *Genes and Cancer*.
- Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther*. 12, 191-197.
- Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther*. 19, 2258-2268.
- Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.
- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.
- Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med*. 35, 1675-1682.
- Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T (1998). Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch. Pathol. Lab Med*. 122, 551-554.
- Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.
- Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol*. 88, 273-280.
- Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol*. 2010, 567594.
- Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res*.

[0325]

- Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.
- Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* 76, 336-339.
- Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.
- Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432.
- Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Rimmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705.
- Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563.
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.
- Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.
- Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.
- Lin J, Lin L, Thomas DG, Greenson JK, Giordano TJ, Robinson GS, Barve RA, Weishaar FA, Taylor JM, Orringer MB, Beer DG (2004). Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGE-A10 splice variants. *Clin Cancer Res* 10, 5708-5716.
- Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S (2008). The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res* 68, 8104-8112.

[0326]

Marcar L, Ihrig B, Hourihan J, Bray SE, Quinlan PR, Jordan LB, Thompson AM, Hupp TR, Meek DW (2015). MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4. *PLoS. ONE.* 10, e0127713.

Marcar L, Maclaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010a). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.

Marcar L, Maclaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010b). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.

Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggiaro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.

Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.

Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Takemitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.

Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggiaro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.

Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 11160-11165.

Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.

Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8+ T-cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4+ T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.

[0327]

- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.
- Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K (1997). Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 20, 95-101.
- Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.
- Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumor antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.
- Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.
- Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.
- Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.
- Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
- Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.
- Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
- Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

[0328]

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

Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.

Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* 26, 817-824.

Roch N, Kutup A, Vashist Y, Yekebas E, Kalinin V, Izbicki JR (2010). Coexpression of MAGE-A peptides and HLA class I molecules in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 30, 1617-1623.

Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-15514.

Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.

Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.

Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.

Shichijo S, Hoshino T, Koufujii K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* 88, 414-419.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of can-

[0329]

cer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.

Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammanull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.

Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev. Cancer* 5, 615-625.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.

Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M (1999b). Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma 1999. *Cancer* 85, 1234-1240.

Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.

Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Wilson EM (2010). Androgen receptor molecular biology and potential targets in prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.* 2, 105-117.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 3997-4013.

[0330]

Wong PP, Yeoh CC, Ahmad AS, Chelala C, Gillett C, Speirs V, Jones JL, Hurst HC (2014). Identification of MAGEA antigens as causal players in the development of tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncogene* 33, 4579-4588.

Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.

Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.

Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* 67, 9954-9962.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.

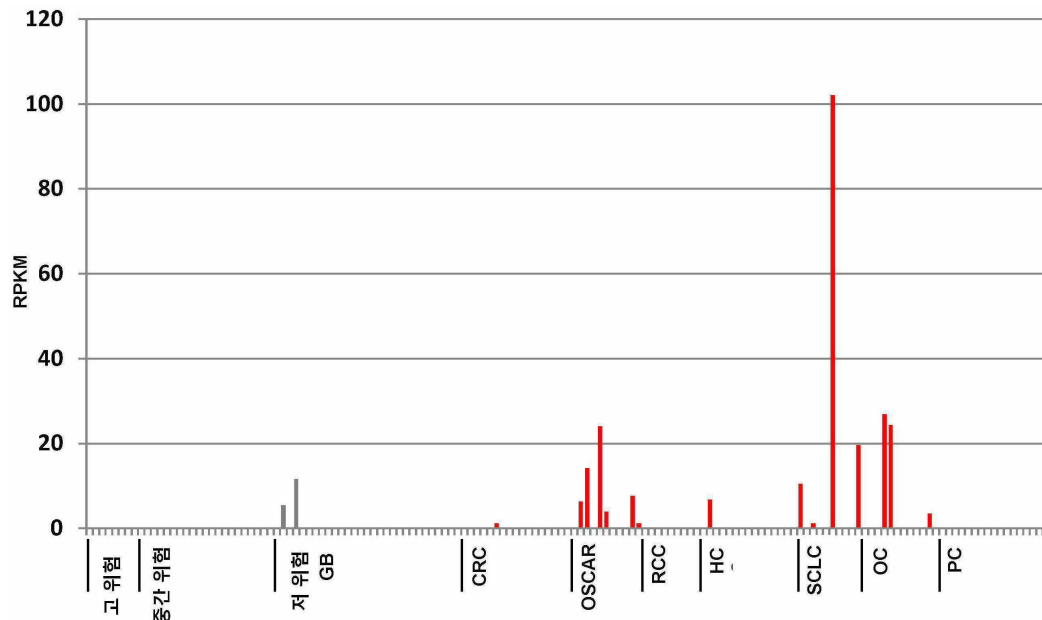
Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.

Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.

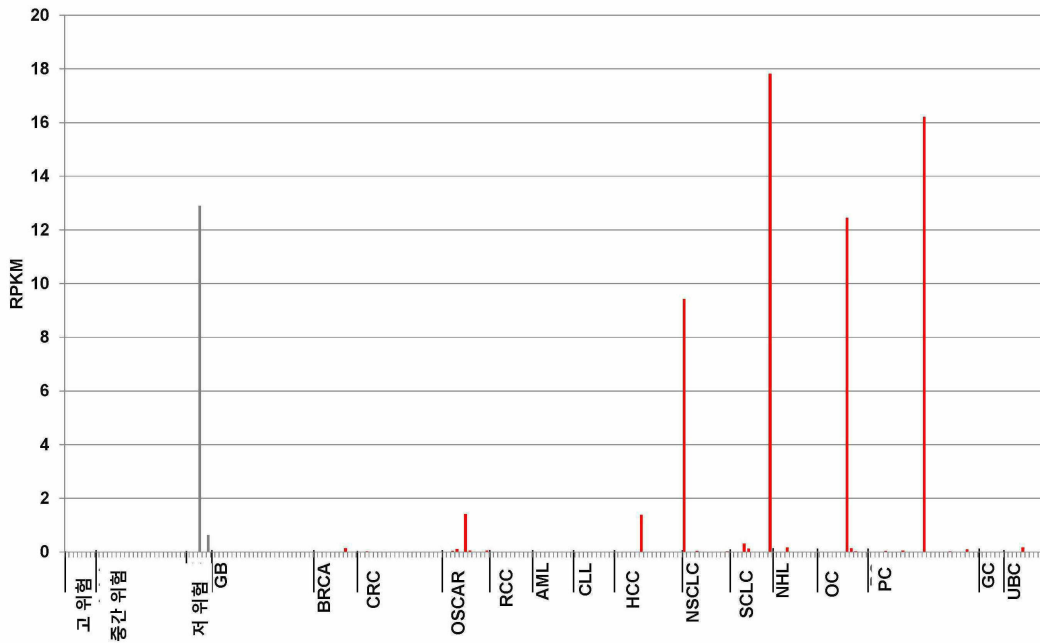
[0331]

도면

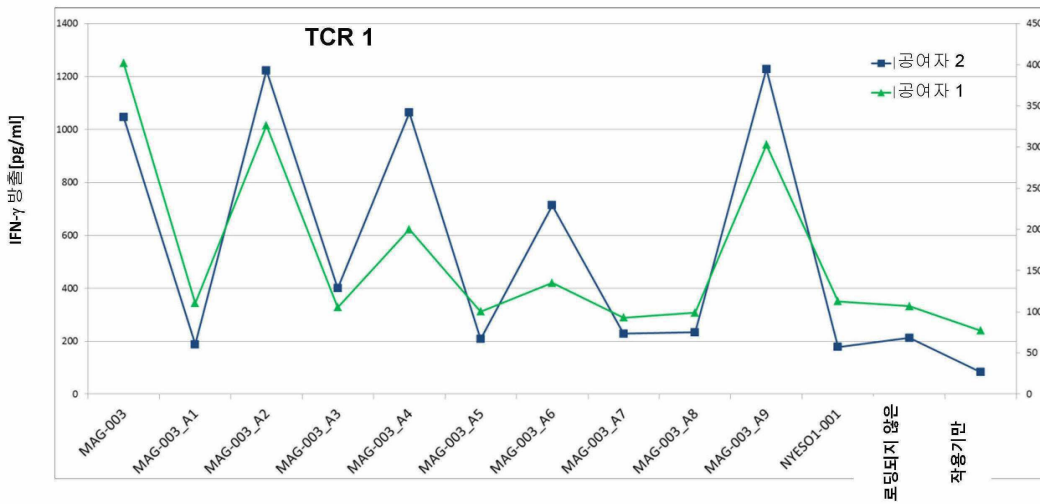
도면1



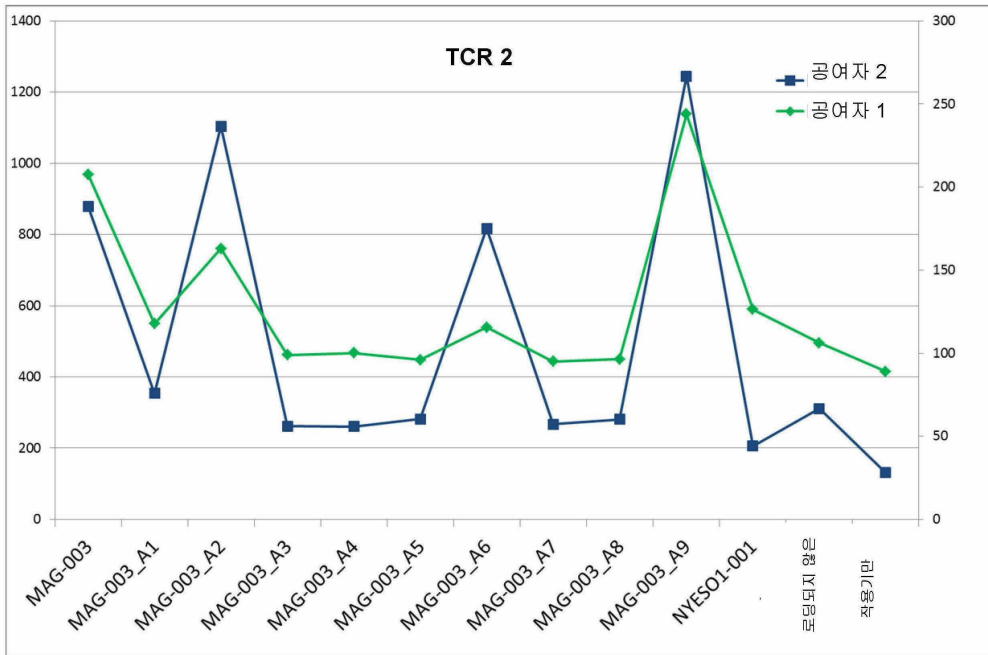
도면2



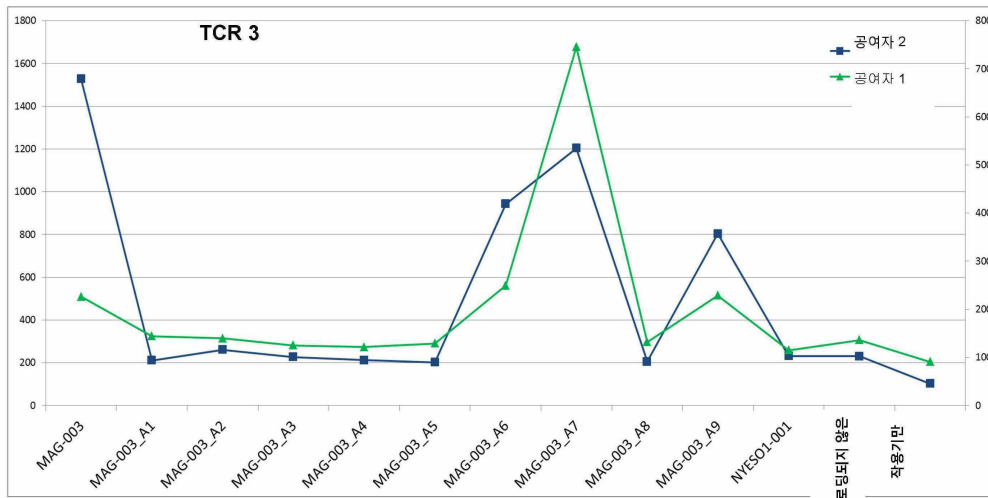
도면3



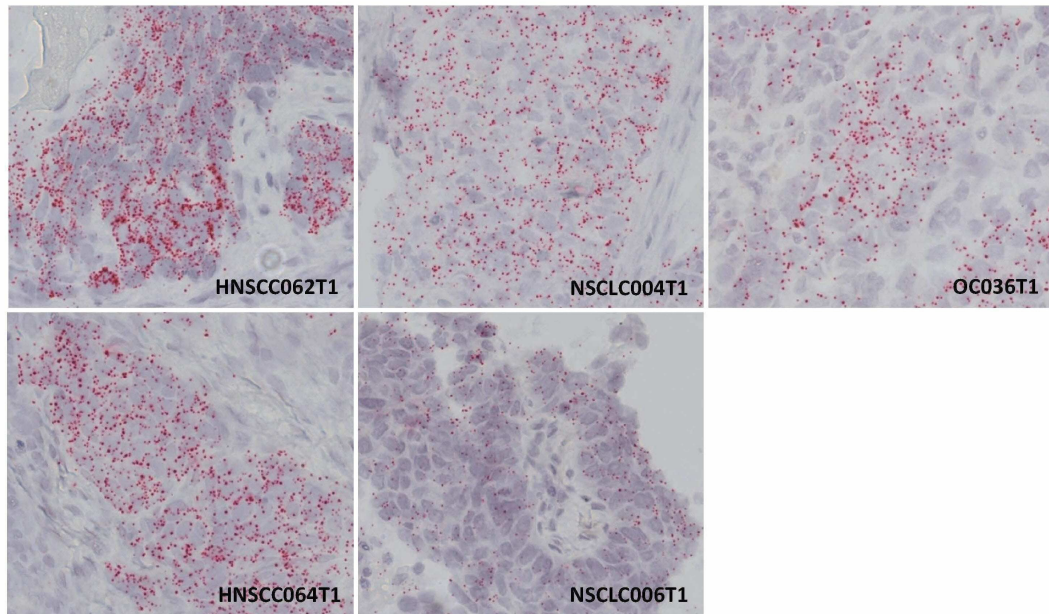
도면4



도면5



도면6



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Peptides and combination of peptides for use in immunotherapy
against non-small cell lung cancer and other cancers

<130> I32925W0

<140> PCT/EP2017/056049

<141> 2017-03-15

<150> GB 1604458.8

<151> 2016-03-16

<150> US 62/308,944

<151> 2016-03-16

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 9

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Lys or Tyr

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be Val, Leu or Ala

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be Val, Leu, Ala or Ile

<400> 25

Xaa Xaa Leu Glu His Val Val Arg Xaa

1

5