



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월29일  
(11) 등록번호 10-1323540  
(24) 등록일자 2013년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7019378(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2008년02월07일  
심사청구일자 2013년02월04일  
(85) 번역문제출일자 2012년07월20일  
(65) 공개번호 10-2012-0098919  
(43) 공개일자 2012년09월05일  
(62) 원출원 특허 10-2009-7018578  
원출원일자(국제) 2008년02월07일  
심사청구일자 2009년09월04일  
(86) 국제출원번호 PCT/JP2008/052070  
(87) 국제공개번호 WO 2008/096831  
국제공개일자 2008년08월14일  
(30) 우선권주장  
JP-P-2007-028081 2007년02월07일 일본(JP)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20040126362 A1  
W02000033869 A2  
전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자  
사이단호진한다이비세이부쯔요우겐큐우카이  
일본국 오사카후 수이타시 야마다오카 3반 1고 오사카다이가쿠내  
(72) 발명자  
우다카, 케이코  
일본 고지켄 7838505 난코쿠시 오키초 코하스 내 셔널 유니버시티 코포레이션 고지 유니버시티 내 이시바시, 마사히데  
일본 카가와켄 7680061 카논지시 야하타초 2초메 9-41 사이단호진한다이비세이부쯔요우겐큐우카이 카논지 인스티튜트 내  
(74) 대리인  
강승욱

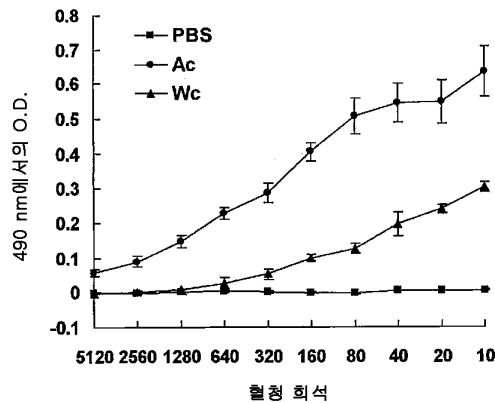
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **암의 치료제**

(57) 요약

본 발명은, 백일해 백신을 주성분으로 하는, 암항원 펩티드 백신 및 바이러스 항원 펩티드용 보조약을 제공한다. 본 발명은 또한, 암항원 펩티드 또는 바이러스 항원 펩티드 및 백일해 백신을 포함하는, 암 또는 바이러스 감염 증의 치료 및 암의 전이나 재발 또는 바이러스 유발성 종양의 예방제를 제공한다. 백일해 백신으로는, 특히 전균체 백일해 백신이 바람직하게 이용될 수 있다. 본 발명 제제는, 안전하게 복수회 투여할 수 있다.

대표도 - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

악성 종양 항원 펩티드 및 백일해 백신을 포함하고,

상기 악성 종양 항원 펩티드는 WT1 단백질 또는 그것의 아미노산 서열의 일부를 포함하는 펩티드이고, 단 상기 펩티드는 서열번호 2 또는 4로 표시되는 펩티드가 아니며,

상기 백일해 백신은 전균체 백일해 백신 보조약인,

악성 종양의 치료 또는 전이 또는 재발의 예방 제제.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 적어도 3회의 면역 접종이 가능한 제제.

**청구항 3**

악성 종양 항원 펩티드를 유효 성분으로 하는 백신용의 보조약으로서,

상기 악성 종양 항원 펩티드는 WT1 단백질 또는 그것의 아미노산 서열의 일부를 포함하는 펩티드이고, 단 상기 펩티드는 서열번호 2 또는 4로 표시되는 펩티드가 아니며,

상기 보조약은 전균체 백일해 백신을 주성분으로 하는 것을 특징으로 하는 보조약.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은, 암 및 바이러스 감염증의 치료 및 암의 전이나 재발 및 바이러스 유발성 종양의 예방에 도움이 되는 백신, 그 제조를 위한 보조약에 관한 것이다.

[0002] 본 출원은, 일본에서 출원된 일본 특허 출원 2007-028081(출원일 : 2007년 2월 7일)을 기초로 하고 있고, 거기에 개시되는 내용은 본 명세서에 모두 포함되는 것이다. 또, 본 명세서 중에서 거론된 특허 및 특허 출원 명세서를 포함하는 모든 간행물에 기재된 내용은, 본 명세서에서의 인용에 의해 그것 모두가 명시된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 삽입되는 것이다.

**배경기술**

[0003] 종양에 대한 HLA 클래스 I 결합성 펩티드를 사용하는 펩티드 면역 요법이 시험적으로 실시되고 있다. 그러나, 과거의 펩티드 면역 요법의 성적에서 볼 때, 종양 항원 펩티드의 단독 투여에서는 효과를 그다지 기대할 수 없다고 여겨지고 있다(과거의 치료 보고에서, RECIST 평가로 SD의 비율이 1할을 초과하는 케이스는 거의 없다(비특허문헌 1, 3)).

[0004] 따라서, 세포 상해성 T 림프구(CTL)를 자극하기 위해, 프린트(Freund's) 불완전 보조약(FIA) 중에 유화한 펩티드를 투여하는 방법이 널리 사용되고 있다(비특허문헌 1~3). FIA에 현탁한 펩티드는, MHC 테트라머 양성 CD8 T 세포 또는 IFN- $\gamma$  분비 세포의 증가에 의해 명확한 바와 같이, 펩티드 특이적 T 세포를 증식시킨다. 그러나, 증식한 CD8 T 세포는 이펙터로서 완전히 활성화되기는 어려워, 치료 효과가 한정되어 있다(비특허문헌 4~6). 경우에 따라서는, FIA에 현탁한 펩티드가 항원 특이적 면역 반응을 야기하는 경우도 있다(비특허문헌 7). 또, 피하에서 오랫동안 FIA가 남고, 발적은 1, 2개월이면 가라앉지만, 구진이 2년 정도 남아, 투여 횟수에 따라서는 피부의 경화가 진행되어, 환자의 QOL을 현저하게 손상하는 문제도 있다.

[0005] 펩티드의 면역원성(immunogenicity)을 증대시키기 위해, 다수의 보조약이 임상 시험에서 시험되어 왔다. 이러한 보조약의 목적은, 항원 제시 세포(APC) 및/또는 헬퍼 T 세포(Th)를 활성화함으로써, CTL에 항염증성 환경을 제공하는 것이다. 수상 세포는, 펩티드 펄스용의 항원 제시 세포로서 사용되고 있고, 보다 나은 종양 제어를 유도하고 있다(비특허문헌 3, 8). 비메틸화 데옥시 CpG, Toll 유사 수용체 리간드(비특허문헌 9) 및 Flt3(비특허문헌 10)과 같은, APC를 활성화하는 리간드가 도입되어 있다. 헬퍼 활성화에 관해, Th1형의 응답은, 최적의 세포성 면역을 유도한다(비특허문헌 11, 12). Th 세포 및 다른 면역 증강 세포가 분비하는 재조합 사이토카인이, 임상 시험에서 사용되고 있다. 이러한 사이토카인에는, IL-2(비특허문헌 13), GM-CSF(비특허문헌 8), IFN- $\alpha$ (비특허문헌 14) 및 IL-12(비특허문헌 15)가 포함된다. 이들은, GMP(품질 관리 규칙) 등급의 제품을 입수할 수 있기 때

문에, 시험 치료를 용이하게 할 수 있다. 그러나, 이들은 면역 응답의 일부를 치환하여, 주로 APC 또는 Th 세포 중 어느 하나를 단독으로 자극할 수 있는 것에 불과하다. 사이토카인의 생물학적 반감기도 한정되어 있다.

[0006] 보다 자연스러운 조건하에서 APC와 Th 세포 양쪽을 활성화할 목적으로, 결핵균 세포벽 골격(BCG-CWS)의 사용이 개발되어 왔다(비특허문헌 16). 그러나, BCG-CWS는, 세포성 면역을 강력하게 활성화하여, 개방성 폐양의 발증을 회피할 수 없다. 이 때문에, 백혈병 환자와 같은 면역능이 저하된 환자에게는 사용할 수 없다. 반복 면역하는 것도 어렵다. 펩티드는 혈청 중의 단백 분해 효소에 의해 분해되기 쉬워, 세포 표면의 MHC 분자에 결합한 것 외에는 수일 이내에 소실되기 때문에, 빈번하게 면역해야 한다. 또, 원래라면 면역 관용의 대상이 되는 자기의 종양 항원 단백질에 반응하는 T 세포는, 활성이 떨어지기 쉬워, 매주 1회 투여하지 않으면 세포 상해 활성이 약해진다. 따라서, 빈번한 투여가 어려운 BCG-CWS는, 종양 면역 요법을 위한 보조약으로서 중대한 결점을 안고 있다.

[0007] 비특허문헌 1: Rosenberg, S. A. 등, Nat. Med., vol. 10, p.909-915 (2004)

[0008] 비특허문헌 2: Oka, Y. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 101, p.13885-13890 (2004)

[0009] 비특허문헌 3: Mosolits, S. 등, Ann. Oncol., vol. 16, p.847-862 (2005)

[0010] 비특허문헌 4: Nagorsen, D. 등, Clin. Cancer Res., vol. 12, p.3064-3069 (2006)

[0011] 비특허문헌 5: Nencioni, A. 등, Ann. Oncol., vol. 15, p.153-160 (2004)

[0012] 비특허문헌 6: Romero, P. 등, Cancer Immunol. Immunother., vol. 53, p.249-255 (2004)

[0013] 비특허문헌 7: Toes, R. E. M. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p.7855-7860 (1996)

[0014] 비특허문헌 8: Slingsluff, C. L. 등, J. Clin. Oncol., vol. 21, p.4016-4026 (2006)

[0015] 비특허문헌 9: Speiser, D. E. 등, J. Clin. Invest., vol. 115, p.739-746 (2005)

[0016] 비특허문헌 10: Fong, L. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 98, p.8809-8814 (2001)

[0017] 비특허문헌 11: Fallarino, F. 등, J Immunol, vol. 165, p.5495-5501 (2000)

[0018] 비특허문헌 12: Dredge, K. 등, Cancer Immunol. Immunother., vol. 51, p.521-531 (2002)

[0019] 비특허문헌 13: Rosenberg, S. 등, Nat. Med., vol. 4, p.321-327 (1998)

[0020] 비특허문헌 14: Di Pucchio, T. 등, Cancer Res., vol. 66, p.4943-4950 (2006)

[0021] 비특허문헌 15: Peterson, A. 등, J. Clin. Oncology, vol. 21, p.2342-2348 (2006)

[0022] 비특허문헌 16: Nakajima, H. 등, Cancer Immunol. Immunother., vol. 53, p.617-624 (2004)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0023] 본 발명의 목적은, 종양 특이적 면역 요법 또는 바이러스 감염증에 대한 면역 요법에서 유효한, 암항원 또는 바이러스 항원 펩티드 백신용 보조약을 제공하는 것이며, 이로써 그 면역 요법에 유효한 암 또는 바이러스 감염증 치료제를 제공하는 것에 있다.

### 과제의 해결 수단

[0024] 본 발명자들은, 상기 과제를 감안하여 예의 연구한 결과, 전균체 백일해 백신이 항원 제시 세포(APC)와 헬퍼 T 세포(Th) 양쪽 모두를 활성화하는 것, 또 암항원 또는 바이러스 항원 펩티드와, 보조약으로서 전균체 백일해 백신을 포함하는 백신이 우수한 항종양 활성 또는 항바이러스 활성을 나타내는 것을 발견했다. 또한, 백일해 백신은, FIA와 같이 유효하여 이용할 필요가 없고, 발적, 종창도 거의 보이지 않기 때문에, BCG-CWS와 달리 주 1회의 간격으로 반복 투여하는 것이 가능하다는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0025] 즉, 본 발명은 이하의 것을 제공한다.

[0026] [1] 암항원 펩티드 및 백일해 백신을 포함하는 암의 치료 또는 전이 또는 재발의 예방 제제,

- [0027] [2] 백일해 백신은 보조약인 상기 [1]의 제제,
- [0028] [3] 백일해 백신이 전균체 백일해 백신인 상기 [1] 또는 [2]의 제제,
- [0029] [4] 암항원 펩티드가, WT1, 서비빈(survivin) 및 전립선 특이 항원으로 이루어지는 군에서 선택되는 단백질 또는 그 아미노산 서열의 일부를 포함하는 펩티드인 상기 [1]~[3] 중 어느 하나의 제제,
- [0030] [5] 암이, WT1, 서비빈 및 전립선 특이 항원으로 이루어지는 군에서 선택되는 단백질을 고발현하는 악성 종양인 상기 [1]~[4] 중 어느 하나의 제제,
- [0031] [6] 적어도 3회의 면역 접종이 가능한 상기 [1]~[5] 중 어느 하나의 제제,
- [0032] [7] 바이러스 감염증을 야기하는 바이러스 유래의 펩티드 및 백일해 백신을 포함하는 바이러스 감염증의 치료제,
- [0033] [8] 백일해 백신은 보조약인 상기 [7]의 치료제,
- [0034] [9] 백일해 백신이 전균체 백일해 백신인 상기 [7] 또는 [8]의 치료제,
- [0035] [10] 바이러스가 악성 종양 유발성의 바이러스인 상기 [7]~[9] 중 어느 하나의 치료제,
- [0036] [11] 바이러스 유발성 악성 종양의 예방·치료용인 상기 [10]의 제,
- [0037] [12] 바이러스가, C형 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 뎅기 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 상기 [7]~[9] 중 어느 하나의 치료제,
- [0038] [13] 적어도 3회의 면역 접종이 가능한 상기 [7]~[12] 중 어느 하나의 제제,
- [0039] [14] 백일해 백신을 주성분으로 하는, 암항원 펩티드 또는 바이러스 펩티드를 유효 성분으로 하는 백신용의 보조약,
- [0040] [15] 백일해 백신이 전균체 백일해 백신인 상기 [14]의 보조약,
- [0041] [16] 바이러스가 악성 종양 유발성의 바이러스인 상기 [14] 또는 [15]의 보조약,
- [0042] [17] 펩티드가, WT1, survivin 및 전립선 특이 항원으로 이루어지는 군에서 선택되는 단백질 또는 그 아미노산 서열의 일부를 포함하는 펩티드인 상기 [14] 또는 [15]의 보조약, 및
- [0043] [18] 바이러스가, C형 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 뎅기 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 상기 [14] 또는 [15]의 보조약.
- [0044] 본 발명의 암 또는 바이러스 감염증의 치료 및 암의 전이·재발 또는 바이러스 유발성 악성 종양의 예방제는, 암항원 또는 바이러스 펩티드 및 백일해 백신을 포함한다. 백일해 백신은, 암항원 펩티드 및 바이러스 펩티드의 투여에 대하여 우수한 보조약 활성을 갖는다. 또, 백일해 백신은, 그 자체가 백신으로서 널리 사용되고 있으며, GMP 등급의 백신을 입수할 수 있다. 따라서, 본 발명에 의해, 효과적이고 안전한 암 및 바이러스 감염증 치료제가 제공된다.

**발명의 효과**

- [0045] 백일해 백신은, 암항원 펩티드 및 바이러스 항원 펩티드의 투여에 대하여 우수한 보조약 활성을 나타내고, 자체 백신으로서 안전하게 사용되어 온 실적이 있기 때문에, 그 백신을 보조약으로서 포함하는 본 발명 제제는, 암 및 바이러스 감염증의 치료에 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0046] 도 1은 백일해 독소 및 섬유상 적혈구 응집소에 대한 IgG 항체 생성에서의 백일해 백신의 헬퍼 유도 활성을 나타내는 도면이다. B6 마우스를 PBS, Ac 또는 Wc 백일해 백신으로 피하에 주 1회 면역했다. 혈청중의 백일해 독소 및 섬유상 적혈구 응집소에 대한 IgG 항체 활성을,  $\gamma$ 쇄 특이적 2차 항체를 이용하여 ELISA에 의해 측정했다. 3회째 면역의 1주일 후의 항체 활성을 나타낸다. 데이터를 2마리의 마우스의 평균과 SD로서 나타낸다.

도 2는 세포 상해 활성의 유도를 상이한 면역군 사이에서 비교한 도면이다. B6 마우스를 백일해 백신 유무로 OVA-I 펩티드에 의해 주 1회 면역했다. 4회째 면역의 1주일후, 비장 세포를 EG7(a, c, e, g), 오보알부민 형질

인입 세포 또는 그 친세포주 EL4(b, d, f, h)에 대한 세포 상해 활성에 대해 조사했다. 다양한 E/T비로 5시간 인큐베이트하고, 그 동안의 특이적 용해를 나타낸다. 개개의 마우스로부터 취한 비장 세포의 데이터를 각각의 꺾인 선으로 나타낸다.

도 3은 EGFP<sup>+</sup>OT1 세포의 생체내 증식을 나타내는 도면이다. EGFP<sup>+</sup>OT1 세포를 정맥내에 주사했다. 다음날 마우스를 백일해 백신 유무로 OVA-I 펩티드에 의해 피내 주사했다. 다음주 동일하게 면역을 반복했다. 2회째 면역의 1주일후, 비장 세포를 유세포 분석기(flow cytometry)에 의해 조사했다. 비장 세포중의 형광 트랜스제닉 TCR을 가진 세포의 비율을 나타낸다.

도 4는 백일해 백신 유무로 OVA-II 펩티드에 의해 면역한 DO11.10 마우스에서의 Th1/Th2 사이토카인 생성을 나타내는 도면이다. 주 1회 3회 면역후, 1주일째에 비장 세포를 취하고, OVA-II 펩티드로 자극하여, 사이토카인 생성을 조사했다. 사이토카인, IFN- $\gamma$ , IL-4 및 IL-5를, Luminex 100 및 Fluorokine MAP 키트에 의해 측정했다. 항원 자극을 하여 48시간 인큐베이트한 후의 배양 상청중의 사이토카인 농도를 나타낸다. Ac 백신은 보다 많은 Th2형 사이토카인(IL-4 및 IL-5)의 생성을 유도하는 한편, Wc 백신은 보다 많은 Th1형 사이토카인(IFN- $\gamma$ )의 생성을 촉진하고, 한편 Th2 사이토카인의 생성은 적은 경향을 나타냈다.

도 5는 백일해 백신 유무로 OVA-I 펩티드에 의해 면역한 마우스에서의 생체내 종양 증식을 나타내는 도면이다. 주 1회 3회 면역후, EG7 및 EL4 세포를 B6 마우스의 등부위 옆구리 양측에 피내 접종했다. 종양 사이즈를, 긴 직경과 그것에 수직인 짧은 직경을 곱한 곱으로 하여 하루 걸러서 측정했다. 5마리의 마우스의 평균을 나타낸다.

도 6은 마우스의 생존에 관한 면역의 효과를 FBL3 종양 세포의 치사 용량을 복강 주사하여 생존을 조사한 도면이다. 5마리의 B6 마우스군을, 백일해 백신 유무로 Db126 WT1 펩티드의 주 1회의 피내 투여에 의해 미리 3회 면역했다. FBL3 세포를 이어서 복강내에 주사하고, 마우스의 생존을 모니터링했다. 데이터는 재현성을 확인하는 실험 중 대표적인 것을 나타낸다.

도 7은 장기 면역 마우스의 뇨, 혈액 소견을 나타내는 도면이다. 도 8에 나타내는 장기 면역 마우스의 뇨 총단백량, 혈액중의 적혈구(a.), 백혈구수(b.)를 세었다. 각 에러 바(error bar)는 평균값과 표준편차를 나타낸다. 뇨단백은, 성별 10마리씩의 정상 B6 마우스의 평균값과 표준편차를 대조하여 나타낸다.

도 8은 Wc 백신 및 Db126 WT1 펩티드에서의 장기 면역후의 마우스의 조직을 나타내는 도면이다. PBS(a.c.) 및 Wc 백신과 Db126 펩티드(b.d.)로 주 1회 8회 면역한 마우스 유래의 신장(a.c.) 및 폐(b.d.)를 나타낸다. 파라핀 세그먼트를, Hematoxylin 및 Eosin으로 염색했다. 림프구 침윤 등의 유의한 변화는 없었다.

도 9는 우측 대퇴골 전이를 갖는 전립선암 환자 KB07-005에서의 W10 펩티드를 이용한 면역 요법의 초기 제 I/II상 임상 시험의 결과를 나타내는 도면이다. (A) 종양의 최장 직경의 합(SLD)의 치료 개시후의 추이를 나타낸다. 파선 화살표는 W10 단독 투여의 기간, 실선 화살표는 W10과 전균체 백일해 백신(Wc)의 병용 투여의 기간을 나타낸다. Wc 첨가후 14주간 SLD의 변화는 115%, RECIST 평가는 SD였다. (B) PSA 농도의 치료 개시후의 추이를 나타낸다. 파선 화살표는 W10 단독 투여의 기간, 실선 화살표는 W10과 전균체 백일해 백신(Wc)의 병용 투여의 기간을 나타낸다.

도 10은 표적 골병변에 방사선 요법의 이력이 있는, 치골 전이를 갖는 전립선암 환자 KB07-003에서의 W10 펩티드를 이용한 면역 요법의 초기 제 I/II상 임상 시험의 결과를 나타내는 도면이다. (A) 종양의 최장 직경의 합(SLD)의 치료 개시후의 추이를 나타낸다. 파선 화살표는 W10 단독 투여의 기간, 우측 실선 화살표는 W10과 전균체 백일해 백신(Wc)의 병용 투여의 기간을 나타낸다. 좌측 실선 화살표는 방사선 치료 기간을 나타낸다. Wc 첨가후 14주간 SLD의 변화는 58%, RECIST 평가는 PR이었다. (B) PSA 농도(원래는 PSA 양성종의 종양)의 치료 개시후의 추이를 나타낸다. 화살표는 Cre 상승으로 인해 휴약한 회를 나타낸다.

도 11은 (A) 구강 선양 낭포암 환자 KB07-006, (B) 다발 간전이를 갖는 기관지 선양 낭포암 환자 KB07-001 및 (C) 유방의 Paget병 환자 KB07-002에서의 W10 펩티드를 이용한 면역 요법의 초기 제 I/II상 임상 시험의 결과를 나타내는 도면이다. 종축은 종양의 최장 직경의 합(SLD)을 나타내고, 횡축은 치료 개시후의 일수를 나타낸다. 파선 화살표는 W10 단독 투여의 기간, 우측 실선 화살표는 W10과 전균체 백일해 백신(Wc)의 병용 투여의 기간을 나타낸다. (C)는, 처음부터 W10과 전균체 백일해 백신(Wc)의 병용이다. (A) Wc 첨가후 14주간 SLD의 변화는 117%, RECIST 평가는 SD였다. (B) Wc 첨가후 14주간 SLD의 변화는 107%, RECIST 평가는 SD였다. (C) 13주간 SLD의 변화는 87%, RECIST 평가는 SD였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0047] 본 발명은, 암항원 펩티드(또는 바이러스 감염증을 야기하는 바이러스 유래의 펩티드) 및 백일해 백신을 포함하는 암(또는 바이러스 감염증)의 치료 및 암의 전이·재발(또는 바이러스 유발성 악성 종양)의 예방제를 제공한다(이하, 「본 발명 제제」라고도 함). 본 명세서에서 「치료」란, 「증상의 경감」, 「진행 억제」도 포함하는 의미이다.
- [0048] 본 발명에서 「암항원 펩티드」란, 항체 생성, 세포성 면역 등의 면역 반응을 유도하는 활성을 갖는 단백질(펩티드)을 말하지만, 그 중에서도 세포 상해성 T 림프구(CTL)를 자극하는 T 세포 유도 활성을 갖는 단백질(펩티드)이 특히 바람직하다. 암항원 펩티드로는, T 세포 유도 활성을 갖는 단백질(펩티드)인 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, HER-2/neu, MART-1, NY-ESO-1, Gp-100, MUC-1, p53, 전립선 특이 항원(PSA), hTERT, WT1, 서비빈, CEA, MAGE 등을 들 수 있고, 바람직하게는, WT1, 서비빈, PSA 등, 보다 바람직하게는 WT1이다. 구체적으로는, WT1 항원 펩티드로는, WO 00/06602, WO 00/26249, WO 2006/030770 등에 기재된 것이 바람직하게 이용될 수 있다. 또, 서비빈 항원 펩티드로는, WO 2006/080142 등에 기재된 것이 바람직하게 이용될 수 있다.
- [0049] 한편, 본 발명에서 「바이러스 펩티드」란, 인간을 비롯한 포유동물에 감염됨으로써, 어떠한 질환·병태를 야기하는 바이러스에 유래하는 단백질 또는 그 아미노산 서열의 일부를 포함하는 펩티드를 말하며, 예를 들어, C형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 뎅기 바이러스, 성인 T 세포 바이러스, 인간 면역부전 바이러스, 파필로마 바이러스 등이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 일 실시형태에서는, 바이러스 펩티드는 종양 관련(종양 유발성) 바이러스 유래의 항원 펩티드이다. 여기서 「종양 관련 펩티드」란, C형 간염 바이러스를 비롯한 악성 종양의 발생에 강하게 관련된 바이러스군 유래의 단백질 또는 그 아미노산 서열의 일부를 포함하는 펩티드를 말한다. 구체적으로는, C형 간염 바이러스 펩티드로는, WO 2005/105993 등에 기재된 것이 바람직하게 이용될 수 있다.
- [0050] 또, 항원으로서의 면역 원성을 갖는 한, 상기 암항원 펩티드는, 암항원 또는 바이러스 항원 펩티드 단편이어도 된다.
- [0051] 암항원 펩티드는, 예를 들어, Sambrook et al. (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.)에 기재되어 있는 바와 같은 방법으로 조제할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 암항원 단백질(펩티드)을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터를 도입한 형질 전환체를 배양하여 암항원 단백질(펩티드)을 생성하고, 얻어지는 배양물로부터 암항원 단백질(펩티드)을 분리·정제함으로써도 제조할 수 있다. 또, 암항원 단백질(펩티드)은, 공지의 펩티드 합성법으로 제조할 수도 있다. 그 펩티드 합성법으로는, 예를 들어, 고상 합성법, 액상 합성법 어느 것이어도 된다.
- [0052] 「백일해 백신」에는, 포름알데히드 처리 또는 가열 비활성화 처리한 백일해균(*Bordetella pertussis*)의 세포벽 단편을 포함하는 전균체 백일해 백신, 백일해균으로부터 반정제 또는 정제한 성분(예, 백일해 독소, 섬유상 적혈구 응집소 등)을 포함하는 무세포 백일해 백신 등을 들 수 있다. 바람직하게는, 백일해 백신은, 전균체 백일해 백신이지만, 대상 환자나 병태에 따라서는, 무세포 백일해 백신이 유용한 경우도 있다.
- [0053] 백일해 백신의 조제 방법은, 공지의 방법을 한정없이 사용할 수 있다. 또, 백일해 백신은, 시판품을 이용해도 되고, 예를 들어, BIOFARMA사(Indonesia) 등으로부터 입수할 수 있다.
- [0054] 본 발명 제제에 포함되는 암항원 펩티드(또는 바이러스 펩티드)와 백일해 백신의 비는, 항원의 종류나 백일해 백신의 특성에 따라 일괄적으로 규정할 수는 없지만, 예를 들어, WT1 항원과 전균체 백일해 백신을 사용한 경우, 어른 1인 1회 투여분으로서 펩티드 0.1~5 mg :  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 개 전균체 백일해 백신이 예시되며, 바람직하게는 펩티드 0.5~4 mg :  $1 \sim 7 \times 10^8$ 개 전균체 백일해 백신이다.
- [0055] 본 발명 제제는, 또한 의약으로서 허용될 수 있는 담체를 포함하고 있어도 된다. 상기 의약으로서 허용될 수 있는 담체로는, 백신의 제조에 통상 사용되는 담체를 한정없이 사용할 수 있고, 구체적으로는, 식염수, 완충화 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 등장수성 완충액 및 이들의 조합을 들 수 있다. 담체는, 바람직하게는 멸균된 것이다. 또, 여기에 유화제, 보존제(예, 티메로살), 등장화제, pH 조절제 및 비활성화제(예, 포르말린) 등이 적절하게 배합된다.
- [0056] 본 발명 제제의 투여 대상은, 유효 성분인 암항원 펩티드에 유래하는 단백질을 고발현하는 암에 걸려 있거나,

또는 바이러스 펩티드에 유래하는 바이러스에 감염된 동물인 한 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 인간을 포함하는 포유류, 조류 등을 들 수 있다.

[0057] 본 발명 제제는, 백신의 투여 양식에 적합한 형태를 갖는 것이 바람직하고, 예를 들어, 주사 가능한 형태로서, 용액, 현탁액 또는 유화액을 들 수 있다. 또는, 액체 용액, 현탁액 또는 유화액으로 제공되는 형태로서, 동결 건조 제제 등의 고체 형태를 들 수 있다.

[0058] 본 발명 제제는, 상기 암항원 펩티드 또는 바이러스 펩티드를 유효 성분, 백일해 백신을 보조약 성분으로 하여, 상기 담체와 함께 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 그 암항원 펩티드 또는 바이러스 펩티드 및 백일해 백신은, 제제 중에 각각 성인 1인 1회 투여분으로서, 펩티드 0.1~5 mg 및  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 개 전균체 백일해 백신, 바람직하게는 펩티드 0.5~4 mg 및  $1 \sim 7 \times 10^8$ 개 전균체 백일해 백신이 함유되어 있으면 된다.

[0059] 바람직한 제제예의 하나로서, 펩티드의 1회 투여량(예를 들어 3 mg)을 300  $\mu$ l의 용제(예, 5% 포도당액)에 용해하고, 여기에  $5 \times 10^8$ 개의 전균체 백일해 백신을 100  $\mu$ l의 현탁제(예, 생리식염수)에 현탁한 것을 투여 직전에 혼합하여, 합계 400  $\mu$ l의 백신액으로 하는 방법을 들 수 있지만, 이것에 한정되지 않는다.

[0060] 본 발명 제제의 투여 경로는 특별히 제한되지 않지만, 국소 투여가 바람직하다. 예를 들어, 근육내, 피하, 피내, 복강내 등에 대한 투여를 들 수 있고, 투여 방법으로는 주사 등을 들 수 있다. 또, 피부, 비강내, 구강내에 대한 투여의 가능성도 생각할 수 있고, 투여 방법으로는, 분무, 도포 등을 들 수 있다.

[0061] 투여량은, 대상 연령, 성별, 체중, 약품에 대한 인용성(忍容性) 등을 고려하여 결정할 수 있지만, 통상 성인 1인 1회 투여분으로서, 펩티드 0.1~5 mg 및  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 개 전균체 백일해 백신, 바람직하게는 펩티드 0.5~4 mg 및  $1 \sim 7 \times 10^8$ 개 전균체 백일해 백신을 1회 또는 2회 이상 투여할 수 있다. 바람직하게는 복수회의 투여이며, 이 경우 1~4주, 바람직하게는 1~2주, 보다 바람직하게는 1주일의 간격을 두고, 3회 이상, 바람직하게는 6회 이상, 보다 바람직하게는 10회 이상, 한층 더 바람직하게는 12회 이상 투여하는 것이 바람직하다. 복수회 투여 시에는, 펩티드 및/또는 백일해 백신의 1회 투여량을, 상기 범위내에서 적절하게 변경해도 된다. 통상, 안전성 시험을 위해, 우선 저용량으로 수회 시험하여 안전성을 확인한 후 증량하는 투여 프로토콜을 취하는 경우가 많다. 또, 백일해 백신과 병용하기 전에, 펩티드 단독 투여에 의한 안전성 시험을 행해도 된다. 또한, 백일해 백신의 투여에 의해, 발적 등의 부작용이 보이는 경우에는, 일시적으로 펩티드 단독 투여로 하거나 휴약하여 상태를 보는 것이 바람직하다.

[0062] 투여시에는, 환자의 부담이 적은 범위에서, 가능한 한 많은 림프절에 펩티드를 도달시킬 수 있도록 투여하는 것이 중요하다. 수상 세포 등의 항원 제시 세포의 MHC 분자 위에 결합한 1세포당의 펩티드의 수와, 펩티드를 제시하여 림프절까지 주행하는 수상 세포의 총수가 중요하기 때문에, 1곳에 대량으로 투여하는 것보다, 부위를 바꿔 몇개의 림프절에 도달하도록 하는 편이 효율이 좋다. 단, 표면적이 넓은 부분에 동일한 항원이 고밀도인 조건으로 면역하면, I형 알레르기(즉시형 알레르기 : 두드러기, 아나필락시스 쇼크, 천식 등)를 유발하기 쉬워지는 것은 아닐지, 경험상 추측되기 때문에, 통상 사지 말단의 림프절에 가까운 피부에 각 1-2곳, 합계 4-8곳 투여하는 경우가 많다.

[0063] 바람직한 일투여 형태로서, 예를 들어, 양액와(both axillae) 및 양서혜부의 림프절에 가까운 피부에, 총 4곳, 각각 100  $\mu$ l씩 피내 주사하는 방법 등을 들 수 있지만, 이것에 한정되지 않고, 상기 목적을 달성할 수 있는 한 어떠한 변경도 가능하다. 예를 들어, 두경부 종양의 환자에게는, 서혜부 대신 목의 말단에 좌우 2곳(쇄골하의 림프절에 항원을 공급할 목적) 및 양액와 부근에 1곳씩의 총 4곳의 투여로 할 수 있다. 피내 주사는, 1곳에 100  $\mu$ l를 초과하여 주사하면 약간 통증이 있고, 주사후에 바늘구멍에서 역류하여 새는 경우도 있기 때문에, 1곳에 대한 투여량은 100  $\mu$ l 이하로 하는 것이 바람직하다.

[0064] 백일해 백신은, 종래 공지의 펩티드 면역 요법에서의 보조약과 비교하여, 투여에 의한 발적, 종창, 궤양, 경화와 같은 부작용이 적다는 특징을 갖는다(5-20 mm 정도의 홍반이 발생하지만, 48시간 정도로 거의 소실됨). 특히 궤양은, 암환자에게 있어서는 치명적인 사태를 초래할 우려도 있기 때문에, 이러한 특징은 본 발명의 우수한 효과라고 할 수 있다. 또, FIA와 같이, 유화하여 사용할 필요가 없기 때문에, 투여에 의해 지속성의 발적, 구진(丘疹)을 발생시키는 경우는 없다. 또한, BCG-CWS에서 반드시 생기는 궤양이 발생하지도 않기 때문에, 주 1회의 빈번한 투여가 가능하며, 휴약에 의한 증상 악화의 리스크를 최소한으로 할 수 있다.

[0065] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 발명 제제는, 암항원 펩티드로서 WT1 단백질 유래의 펩티드를 포함한다. WT1



단백질은 자연 발생의 악성 종양의 약 7할 정도에서 고발현되고 있으며, 신장암, 폐암, 식도암을 비롯한 소화기 암, 난소암, 유방암, 뇌종양, 육종 등의 고형 악성 종양 및 백혈병이나 혈액 악성 종양 중, 그 종양 항원을 고 발현하는 환자의 치료에 특히 유용하다. 또, 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명 제제는, 바이러스 펩티드로서 C형 간염 바이러스 유래의 항원 펩티드를 포함하며, C형 간염의 치료 및 C형 간염 바이러스 유발성의 악성 종양(간암 등)의 예방에 유용하다.

[0066] 또, 본 발명은, 본 발명 제제의 1 또는 2 이상의 성분을 포함하는 1 또는 2 이상의 용기로 이루어지는 키트를 제공한다.

[0067] 본 발명 제제 및 키트를 이용하여, 암 또는 바이러스 감염증을 치료 또는 그 증상을 경감할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 유효 면역 감작량의 본 발명 제제를 대상으로 투여하는 것을 포함하는 암 또는 바이러스 감염증의 치료 방법을 제공한다.

[0068] 이하에 실시예를 이용하여 본 발명을 상세히 서술하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 실시예

[0070] (재료와 방법)

[0071] 세포 및 항체

[0072] 오보알부민을 트랜스펙트한 EL4 세포주인 E.G7-OVA(Moore, M. W. et al., (1988), Cell 54 : 777-785)은, Herman N. Eisen 박사를 통해 Michael Bevan 박사로부터의 호의로 증여되었다. FBL3은, 적백혈병 계통(H-2<sup>b</sup>)이며, Bruce Chesebro 박사의 호의로 허가를 얻어 Masaaki Miyazawa 박사로부터 제공되었다.

[0073] 마우스

[0074] OT1 트랜스제닉 마우스(OT-1 tg)는, H-2 K<sup>b</sup> 분자에 결합하는 오보알부민 펩티드, 257-264에 특이적인 한쌍의 TCR을 발현하고(Hogquist, K. A. et al., (1994), Cell 76 : 17-27), 이것은 F. Carbone 박사로부터 호의로 증여되었다. OT1 tg는, M. Okabe 박사의 호의로 제공된 EGFP 트랜스제닉 마우스(Okabe, M. et al., (1997), FEBS Letters 407 : 313-319)와 교배시켰다. 두 트랜스제닉 마우스 계통은, C57BL/6(B6) 백그라운드와 몇번이나 백크로스시켰다. B6 마우스는 SLC(Shizuoka, Japan)로부터 구입하여, 고치대학 의학부의 SPF 시설에서 번식시켰다. D. Y. Loh 박사로부터의 호의로 증여인 DO11.10 트랜스제닉 마우스는, BALB/c와 교배시키고, I-A<sup>d</sup>에 결합하는 OVA-II 펩티드(오보알부민 323-339)에 특이적인 TCR의 쌍을 코딩하는 트랜스진에 대해 호모 접합체로서 유지하였다(Murphy, K. M. et al., (1990), Science 250:1720-1723).

[0075] 펩티드

[0076] OVA-I(SIINFEKL(서열번호 : 1)) 펩티드 및 Db126(RMFPNAPYL(서열번호 : 2)) 펩티드는, Fmoc법으로 수동으로 합성했다. 펩티드는, >95%의 순도까지 역상 HPLC로 정제하고, 그 분자량은 MALDI TOF 질량 분석기(Voyager DE-RP, Applied Biosystems, Foster city, CA)로 확인했다. 펩티드의 농도는, MicroBCA 분석(Pierce, Rockford IL)으로 결정했다.

[0077] 보조약

[0078] 백일해 백신은, Bordetella Pertussis 히가시하마 I상주세균으로부터 제조하고, (재)오사카대 미생물병 연구회(Bikenkai, Kannonji, Japan)에 의해 제공되었다. 무세포 백신은 비활성화 백일해 독소와 섬유상 혈구 응집소로 이루어지며, 인산알루미늄과 혼합되어 있다. 전균체 백신은 PBS에 현탁한 비활성화 세균이다.

[0079] Ac 또는 Wc 백일해 백신으로 면역한 마우스에서의 IgG-항체 생성

[0080] B6 마우스를, 함께 프리인트 불완전 보조약(FIA) 중에 유화시킨, 인산알루미늄에 흡착시킨 무세포(Ac) 백신 5  $\mu$ g 또는  $2 \times 10^9$ 의 비활성화 전균체(Wc)로 피하 면역했다. 주 1회의 면역을 1회, 2회 및 3회한 1주일후에 마우스를 도살하고, 혈청을 ELISA 분석을 위해 채취했다.

[0081] ELISA

[0082] 평평한 바닥의 96 웰플레이트(SUMILON, Akita, Japan)를, 알루미늄염없이 20  $\mu$ g/ml 농도의 Ac 백신으로 코팅하고, PBS 중 5%의 스킵밀크로 블로킹했다. 마우스 혈청을 1/10부터 처음부터 연속 희석하여, 4°C에서 1시간 인큐

베이트했다. HRP 표지한 염소 항마우스 IgG( $\gamma$ 쇄 특이적) 항체(Zymed, South San Francisco, CA)를 2차 시약으로서 사용하여, 4°C에서 30분간 인큐베이트했다. OPD 기질을 첨가하여, 흡광도를 490 nm으로 측정했다.

[0083] in vivo CTL 증식 실험

[0084] OT1 tg 유래의 비장 세포 10,000,000개를 정맥내 주사했다. 다음날, 마우스를 50 nmoles의 OVA-I 펩티드로 등부위 피부에 면역했다. 보조약으로서 첨가한 백일해 백신은, 인산알루미늄에 흡착시킨 Ac 백신 10  $\mu$ g/마우스 또는  $2 \times 10^7$ 의 비활성화 전균체 세균였다. 마우스를, 다음주에 동일한 항원으로 추가 면역했다. 2회째 면역의 1주일후 마우스를 도살하고, 비장 세포를 유세포 분석기에 의해 분석했다. 트랜스제닉 TCR을 확인하기 위해, 피코에리트린(PE) 표지한 모노클로날 항V $\beta$ 5 특이적 항체인 MR9-4(Kanagawa, O. et al., (1991), J. Immunol. 147 : 1307-1314)를 사용했다.

[0085] 세포 독성 분석을 위한, MHC 클래스 I 결합 펩티드에 의한 면역

[0086] B6 마우스를, 보조약 유무로, PBS에 용해한 50 nmoles의 OVA-I 펩티드 또는 100 nmoles의 Db126 펩티드(Udaka, K. et al, (2000), J Immunol 164 : 1873-1880)에, 5  $\mu$ g의 무세포 백신 또는 전균체 백신 유래의  $1 \times 10^7$ 의 비활성화 세균을 첨가하여 면역했다. 면역원을 등부위 피부의 2부위에 피내 주사했다. 주 1회의 펩티드 면역을 4회 반복했다.

[0087] 세포 독성 분석

[0088] 4회의 주 1회 면역을, 상술한 바와 같이 B6 마우스로 실시했다. 최후의 면역의 1주일후, 비장 세포를 EG7 세포에 대하여 in vitro로 자극했다. 간결하게 서술하면, 하나의 비장 유래의 비장 세포를, 5% 래트 ConA 상청을 포함하는 10% FCS DMEM(32 ml) 중에 현탁했다. EG7 세포에  $^{137}$ Cs원(源)으로부터의 60 Gy를 조사하고,  $1 \times 10^5$  세포/ml의 밀도로 비장 세포에 첨가했다. 자극으로부터 5일째, 여러가지 E/T비로, 10,000개의 EG7 세포에 대한 5시간의  $^{51}$ Cr 방출 분석에 의해 세포 용해 활성을 측정했다. %특이적 용해는, (실험적 방출-자발적 방출)/(총방출-자발적 방출) $\times 100$ 의 값이다.

[0089] 사이토카인 분석

[0090] Th1/Th2 사이토카인 분비를, Luminex 100(Luminex Corporation, Austin, TX) 및 Fluorokine MAP 마우스 키트(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)를 사용하여 측정했다. DO11.10 마우스에, 마우스 1마리당 100 nmoles의 PBS 중 OVA-II 펩티드를, 보조약 유무로 등부위 피부의 2부위에 피내 주사했다. 사용한 보조약은, 10  $\mu$ g/마우스의 인산알루미늄에 흡착시킨 Ac 백신 또는  $2 \times 10^7$  세포/마우스의 Wc 백신이었다. 주 1회 면역의 3회째의 1주일후 마우스를 도살하고, 비장 세포를 OVA-II 펩티드로 자극했다. 간결하게 서술하면,  $2 \times 10^6$ 의 DO11.10 비장 세포/웰을, DMEM을 포함하는 10% FCS(200  $\mu$ l/웰) 중의 OVA-II의 연속 희석물로 자극했다. 37°C에서 48시간의 인큐베이션 기간중에 상청 중에 분비된 사이토카인을, IFN- $\gamma$ , IL-4 및 IL-5에 대한 Fluorokine 키트로 측정했다. 사이토카인 농도는, 분석중에 존재하는 KJ1.26 $^+$ , CD4 $^+$ T 세포(DO11.10 트랜스제닉 TCR 보유 세포(Haskins, K. et al., (1983), J. Exp. Med. 157 : 1149-1169))의 수로 보정했다.

[0091] 종양 접종 실험

[0092] 3,000,000개의 EL4 세포 및 4,000,000개의 EG7 세포를, B6 마우스의 제모한 등부위의 옆구리 양측에 피내 접종했다. 서로 수직인 최대 치수를, 접종후 7일째부터 시작하여 하루 걸러서 측정했다. 종양 세포수를 미리 결정하여, 2개의 세포 계통에 대하여 동일한 정도의 종양 성장 속도를 부여했다. 5마리의 마우스의 균을, 보조약(인산알루미늄에 흡착시킨 Ac 백신 5  $\mu$ g 또는  $1 \times 10^7$ 의 비활성화 백일해 전균체) 유무로, PBS 중에 용해한 50 nmoles의 OVA-I에 더하여, 주 1회의 피내 주사에 의해 3회 면역했다. 종양 접종 부위에서 떨어진 등부위 피부를 면역에 사용했다. 3회째 면역의 1주일후에 종양 세포를 접종했다. 주 1회의 면역을 2회 더, 종양 접종의 1주일후에 시작하여 실시했다. WT1 펩티드에서의 면역 효과를 조사하기 위해서는, FBL3 적백혈병 세포를, 종양 챌린지 실험에 사용했다(Udaka, K. et al., (2000), J Immunol 164 : 1873-1880). 마우스를, 보조약 유무로 100 nmoles의 Db126 펩티드(RMFPNAPYL(서열번호 : 2), (Udaka, K. et al., (2000), J Immunol 164 : 1873-1880))에 피내 주사함으로써 주 1회 면역했다. 3회째 면역의 1주일후, 5,000,000개의 FBL3 세포를 복강내 주사하여 생존일수를 조사했다. 주 1회의 펩티드 면역을, 종양 접종의 1주일후에 재개했다.

- [0093] Wc 백신 및 Db126 펩티드에서의 장기 면역
- [0094] B6 마우스를, 50 nmoles의 Db126 펩티드 유무로,  $1 \times 10^9$ 의 비활성화 백일해 전균체(CTL 유도 및 중앙 집중 실험에서 사용한 양의 100배)와 함께 주 1회 피내 면역했다. 9회째 면역의 1주일후 뇨를 채취하고, 마우스를 도살하여 혈액 및 조직(폐, 신장, 난소, 정소, 골수)을 채취했다. 조직을 10% 포르말린으로 고정하고, 그 파라핀 세그먼트를 Haematoxylin & Eosin으로 염색했다. 액하 대동맥 및 대정맥으로부터 채취한 혈액을, 10 mM EDTA를 포함하는 PBS 중에 즉시 10배 희석하고, 적절한 희석후에 적혈구(RBC)를 혈구 계산판을 사용하여 계수했다. 백혈구를, Turk 용액 중에서 10배 희석하여 RBC를 용해후에 동일하게 계수했다. 뇨 총단백질량은, 마이크로 TP 테스트 키트(와코준야쿠공업, 오사카)를 사용하여 측정했다.
- [0095] (결과)
- [0096] 백일해 백신의 보조약 활성
- [0097] 백일해 백신의 보조약 활성을 조사하기 위해, 내인성 중앙 항원으로서 오보알부민(OVA)을 도입한 모델 항원계를 이용했다(Moore, M. W. et al., (1988), Cell 54 : 777-785, Hogquist, K. A. et al., (1994), Cell 76 : 17-27).  $K^b$  결합 OVA-I(SIINFEKL(서열번호 : 1)) 펩티드는,  $H-2^b$  마우스에서의 주요 CTL 에피토프인 것이 알려져 있다(Moore, M. W. et al., (1988), Cell 54 : 777-785). OVA-I 펩티드 면역에 의한 CTL의 유도를, 백일해 백신의 첨가에 의해 증강할 수 있는지의 여부를 처음에 시험했다. 우선, CTL 유도 실험전에, 백일해 백신의 헬퍼 유도 활성을 시험했다. 헬퍼 활성은, PT와 FHA의 혼합물에 대한 IgG 항체의 생성에 의해, 따라서 주로 Th2 편위 한 활성을 시험함으로써 조사했다. 도 1에 나타난 바와 같이, IgG 항체는, Ac 백신으로 면역했을 때에는 3주간 이내에 매우 양호하게 생성되었다. Wc 백신도 또한 IgG 항체 생성을 유도했지만, 그 양은 Ac 백신을 사용했을 때보다 적었다. 이에 따라, Ac 백신 및 Wc 백신이 모두 Th 세포 활성을 자극할 수 있는 것이 나타났다.
- [0098] 이어서, Ac 백신 또는 Wc 백신과 함께, OVA-I 펩티드로 C57BL/6 (B6) 마우스를 면역했다. 백일해 백신 유무로, 펩티드의 피내 주사에 의해 4회 면역한 비장 세포를 이펙터로 한, 세포 상해성 시험의 결과를 도 2에 나타낸다. OVA-형질 이입 세포 E.G7-OVA(EG7) (Moore, M. W. et al., (1988), Cell 54 : 777-785) 및 그 친세포주 EL4를 표적으로 사용했다. 헬퍼 활성이 부족할 것으로 예상되는 OVA-I 펩티드 단독 투여에서는, 낮은 세포 상해 활성만 유도되었다. 때때로, OVA 특이적 용해가 관찰되었다(도 2c 중의 5마리의 마우스 중 1마리, 반복 실험 중에서 평균 10-20%). 이것은, 임상 시험에서 우발적으로 발견되는, 치료에 응답하여 항종양 효과가 보이는 환자를 상기시킨다. WT1 펩티드(이번 신청과는 상이한 펩티드) 단독 또는 프린트 불완전 보조약(FIA) 중에 유화시킨 펩티드를 투여한 담암(cancer-bearing) 환자의 평균 수~10%가, 중앙 억제를 나타내는 임상 응답을 나타냈다(Oka, Y. et al., (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 : 13885-13890, Rosenberg, S. et al., (1998), Nat. Med. 4 : 321-327). 이러한 우발적인 응답자는, 이전의 감염 등의 영향으로 면역 부위에 염증을 촉진시키는 환경에 있어, 우연히 CTL이 자극된 사람일 가능성이 있다. Th2 응답을 촉진시키는 Ac 백신을 첨가하면, 세포 상해 활성이 높아졌다. 한편, Wc 백신은, 모든 마우스에서 매우 강한 세포 상해 활성을 유도했다. CTL 활성이 강한 유도는, Wc 백신에서 잘 재현되어 관찰되었다. Wc 면역 마우스의 응답은 항원 특이적이고, EL4에 대한 세포 상해는 관찰되지 않았다. 이에 따라, 강한 세포 상해 활성은, 대량의 사이토카인에 의해 유도되는 LAK 세포와 같은, 비특이적 세포 상해 활성에 의한 것이 아니라는 것을 알 수 있다. Ac 및 Wc로 면역한 마우스의 비장 세포에는, 특히 EG7에 대한 세포 상해 활성이 높은 세포주에서는, CD8 T 세포(CTL)의 비율이 증대하는 경향이 보였다(데이터 나타내지 않음). 따라서, 다음에 항원 특이적 CD8 T 세포의, 마우스 체내에서의 증식 정도를 조사했다.
- [0099] 항원 특이적 CD8 T 세포의 생체내 증식
- [0100] 중앙 항원 특이적 T 세포의 생체내 증식을 모니터하기 위해, 닭  $\beta$ -액틴 프로모터 및 사이토메가로바이러스 인핸서 하에서 EGFP를 발현하는 트랜스제닉 마우스와 교배한 OVA-I 특이적 TCR 트랜스제닉 마우스(OT1)의 비장 세포를, 정상 마우스에게 양자 이입했다. 이 EGFP 트랜스제닉 마우스에서는, 이유는 밝혀지지 않았지만, 모든 T 세포가 EGFP를 발현하는 것은 아니다(Okabe, M. et al., (1997), FEBS Letters 407 : 313-319). 비장 중의  $80 \pm 10$ (SD)%의 CD8 T 세포가 EGFP 발현에 대하여 양성이었다. 모노클로날 항  $V_{\beta}5$  특이적 항체, MR9-4(Kanagawa, O. et al., (1991), J. Immunol. 147 : 1307-1314)를, 트랜스제닉 TCR을 특정하기 위해 사용했다. 도 3에 나타난 바와 같이, OT1-TCR<sup>+</sup>, EGFP<sup>+</sup>CD8 T 세포는, 정맥내 주사의 15일 후에는, 비장에서 검출 한계 가까이까지 감소하였다. 그러나, 마우스를 OVA-I 펩티드 단독으로 피내에 2회 면역하면, 트랜스제닉 OT1-TCR<sup>+</sup>, EGFP<sup>+</sup>, CD8 T 세포

포는, 관찰할 수 있을 정도로 증가하였다. 백일해 백신을 OVA-I 펩티드에 첨가한 결과, OT1 세포는 더욱 증식되었다. 흥미롭게도, Ac 백신에 의한 OT1 세포의 증식은, Wc 보다 약간 강한 것이 잘 재현되어 관찰되었다. 이 결과에 의해, Ac는 항원 특이적 T 세포의 수를 증대하는 활성은 있지만, 도 2에서 관찰된 바와 같이, 세포 상해 활성은 그다지 강하지 않았다. 이에 비해, Wc 백신은 강한 세포 상해 활성을 유도함에 있어서 매우 유효했다. 세포 상해 활성을 발생시키기 위해서는, 새로운 단백질 합성을 하여, 세포 상해성 과립의 성분인 퍼포린(Perforin) 및 그랜자임을 생성해야 한다. Wc 백신에 의해 유도된 면역 자극 환경은, 이러한 단백질 합성의 유도에서 역할을 했을 가능성이 있다.

[0101] 백일해 백신으로 자극한 CD4 T 세포의 Th1/Th2 사이토카인 프로파일

[0102] 다음으로, 보조약으로서 첨가한 백일해 백신이, 근방에 있는 B. Pertussis와는 관계없는 이중 펩티드 항원으로 자극한 T 세포가 분비하는 사이토카인 프로파일에도 영향을 미치는지의 여부를 시험했다. 모델 항원계로서, 리스폰더에는 DO11.10 TCR 트랜스제닉(DO11.10tg) CD4 T 세포를 사용했다. DO11.10 TCR은, I-A<sup>d</sup> 분자에 결합한 OVA-II 펩티드(323-339, ISQAVHAHAHAEINEAGR(서열번호 : 3), (Hunt, D. F. et al., (1992), Science 256 : 1817-1820))에 특이적이다. DO11.10 tg 마우스를, 재료와 방법에 기재한 바와 같이, 백일해 백신 유무로, PBS에 용해한 OVA-II 펩티드와 함께 피내 면역했다. 주 1회, 3회 면역하고 1주일후, 비장을 채취하여 OVA-H 펩티드로 자극했다. 48시간후, 배양 상청을 회수하여 사이토카인 함량을 측정했다. 도 4에 나타낸 바와 같이, IL-2를 생성하는 활성에 의해 처음으로 확인된 DO11.10 T 세포(Haskins, K. et al., (1983), J. Exp. Med. 157 : 1149-1169)는, 상당한 양의 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )을 생성했다(도 4a). Wc 백신으로 면역한 경우, Th1형 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 보다 높은 생성이 잘 재현되어 관찰되었다. 대조적으로, Ac 백신에서의 펩티드 면역은, Th2형 사이토카인인 IL-5의 보다 높은 생성을 유도했다. 다른 Th2형 사이토카인인 IL-4의 생성은, 상이한 면역군 사이에서 그다지 차이가 없었다. 그러나, 단독 또는 AC 백신을 OVA-II 펩티드와 함께 투여하면, 보다 높은 IL-4 생성을 유도하는 경향이 있었다. 이러한 결과는, 백일해 백신에 의해 유도된 염증 환경이, 근방에 있는 관계없는 항원에 특이적인 T 세포에 대해서도 영향을 갖는 것을 시사한다. 종양 항원(그 대부분이 자기 단백질인)에 대한 Th 세포를 능동적으로 자극함으로써 자기 공격적인 응답을 유도하는 위험성을 고려하면, 외래 항원 특이적 Th 세포에 의해 정지 CTL을 자극하는 것은, 보다 안전한 전략일 것이다. 외래 항원에 대한 면역 응답은, 자기 관용에도 불구하고 일반적으로 보다 강력하다. 또한, 면역 응답이 지나친 경우에는, 외래 항원이라면 면역을 정지함으로써 용이하게 항원의 공급을 정지할 수 있다.

[0103] 생체내 종양 거절 반응

[0104] 다음으로, 백일해 백신에서의 펩티드 면역이 생체내에서 종양 거절을 촉진시키는지의 여부를 조사했다. 백일해 백신 유무로 OVA-I 펩티드를 주 1회, 3회 주사후, 마우스에게 EG7 및 친 EL4 종양 세포를 피내 접종했다. 접종 1주일후, 주 1회의 펩티드 면역을 재개했다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 펩티드 단독 면역에서는, 종양 증식에 대하여 유의한 영향을 갖지 않았다. 이것은, 임상 시험에서, 담암 환자를 펩티드 단독 또는 FIA와 같은 보조약 활성이 거의 없는 보조약과 함께 면역한 경우에 관찰된, 낮은 임상 응답을 상기시킨다(Rosenberg, S. A. et al., (2004), Nat. Med. 10 : 909-915, Oka, Y. et al., (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 : 13885-13890, Nencioni, A. et al., (2004), Ann. Oncol. 15 : 153-160, Romero, P. et al., (2004), Cancer Immunol. Immunother. 53 : 249-255). Ac 백신을 보조약으로서 첨가한 경우, 종양 증식은 어느 정도 천천히 진행되었다. 이와는 대조적으로, Wc 백신은 종양 증식을 강력히 억제했다. 결핵균 성분과 같은 다른 Th1 유도 보조약과는 달리, Wc 백신은, 반복 면역을 하더라도 개방성 궤양을 일으키지 않았다. 이것은, 임상으로 넘어간 경우에, Wc 백신이 더욱 유리한 점이다.

[0105] 자기 WT1 종양 항원에 대한 항종양 응답의 생체내 유도

[0106] 상기 실험은, 면역 응답이 보다 용이하게 야기될 수 있는 모델 종양 항원으로서의 외래 항원 OVA를 사용했다. 다음으로, 백일해 백신이 자기 종양 항원에 대한 항종양 응답의 유도를 돕는지의 여부를 조사했다. 이 목적을 위해, 종양 항원으로서 빌름스 종양 1(WT1) 유전자 산물(Udaka, K. et al., (2000), J Immunol 164 : 1873-1880)을 표적으로 했다. 본 발명자들은, D<sup>b</sup> 분자에 의해 제시되며, 항종양 CTL 응답을 유도한 마우스 WT1 산물 유래의 에피토프 Db126(126-134, RMFPNAPYL(서열번호 : 2))을 이전에 확인했다. FBL3 적백혈병 세포를, 높은 레벨의 WT1 산물을 자연스럽게 발현시키는 종양으로서 사용했다. FBL3 세포는, 피내 주사에 의해서는 충분히 증식되지 않았기 때문에, 치사 용량의 FBL3 세포를 복강내 주사한 마우스의 생존을 모니터링했다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 펩티드 면역 단독은, 극히 약한 항종양 활성을 유도했다. Ac 백신을 투여하면 죽는 마우스의 수가 감소했다. 이와는 대조적으로, Wc 백신과 펩티드를 면역한 마우스에서는, 모두 살아남았다. 그 결과, 자기 종양

펩티드를 표적으로 한 종양 거절 실험에서도, Wc 백신이 강력한 보조약 활성을 갖는 것이 나타났다.

- [0107] 종양 펩티드 및 백일해 백신에서의 반복 면역의 장기 효과
- [0108] Wc 백신의 보조약 활성이 매우 강한 것을 알 수 있지만, 그 결과, Wc 백신이 자기 단백질에 대하여 공격적인 응답을 유도하여, 유해한 부작용을 일으킬 가능성도 나왔다. 장래 인간에게 적용하기 위해, 이것은 중요한 포인트가 된다. 따라서, Wc 백신을 첨가하여 WT1 펩티드로 장기간에 걸쳐 면역을 반복하여 반응을 조사했다. WT1 종양 항원은, 정상 조직에서도, 골수중의 조혈 줄기 세포, 중피 기원의 흉막 및 복막, 신장의 족세포, 정소, 난소 및, 아마도 여러가지 줄기 세포에도, 소량 발현된다. Db126 WT1 펩티드 단독 또는 Wc 단독, 또는 Db126과 Wc를 혼합하여, 매주 1회, 합계 8회 면역을 반복하여 부작용이 생기는지의 여부를 조사했다. 지금까지 사용한 양의 100배 과잉량( $1 \times 10^9$ 의 비활성화 세균)의 Wc 백신을 면역했다. 최후의 면역으로부터 1주일후, 뇨단백 및 말초혈의 세포수와 조직을 조사했다. 그 결과, 모든 면역군에서 조직에 이상이 보이지 않았다. 뇨단백, 혈액 이미지도 이상이 보이지 않았다(도 7).
- [0109] Db126 펩티드 및 Wc 백신으로 주 1회, 9회 면역을 한 마우스의 신장 및 폐를 도 8에 나타낸다. 모든 면역군에서 림프구 침윤 또는 조직 상해와 같은 자기 면역 반응을 나타내는 징후는 없었다. 이러한 결과에서, 자기 단백질인 WT1 종양 항원을 표적으로 한 펩티드 면역 치료를 장기간에 걸쳐 반복하더라도, 유해한 자기 공격 반응은 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다.
- [0110] WT1 종양 항원 펩티드를 이용한 악성 종양의 임상 시험
- [0111] 고치대학 의학부 부속병원에서, WT1 종양 항원 펩티드로서 W10 펩티드(ALLPAVPSL(서열번호 : 4))를, 보조약으로서 전균체 백일해 백신(Wc)을 각각 이용하여, 각종 악성 고형 종양 환자의 제 I/II상 임상 시험을 실시하였다(일부 계속중). 펩티드의 1회 투여량(1 또는 3 mg)을  $300 \mu\text{l}$ 의 5% 포도당액에 용해하고, 여기에,  $5 \times 10^8$ 개의 Wc 균체를  $100 \mu\text{l}$ 의 생리식염수에 현탁한 것을 투여 직전에 혼합하여, 합계  $400 \mu\text{l}$ 의 백신액으로 했다. 그 백신액을, 인슐린의 자기 주사용의 주사통과 바늘을 사용하여, 양액와 및 양서혜부의 피부, 총 4곳에  $100 \mu\text{l}$ 씩 피내 주사했다.
- [0112] 투여 프로토콜은 각 증례에 따라서 다르지만, 전형적으로는, W10 단독 투여 3회후, 1주일후에 안전성 시험을 위한 검사와 치료 효과를 평가하고, 데이터 매니지먼트 위원회를 열어 치료 계속의 가부를 판단하여, 계속이 결정된 것에 대하여 1, 2주 후에 W10+Wc 투여로 이행했다. 각 증례의 구체적인 투여 프로토콜은 이하와 같다.
- [0113] · 시험번호 KB07-001 :
- [0114] W10(3 mg) 단독으로 5회→2주후→W10 1mg+ $5 \times 10^8$  Wc를 3회→계속해서 W10 3 mg+ $5 \times 10^8$  Wc로 계속 투여중
- [0115] · 시험번호 KB07-002 :
- [0116] W10 1 mg+ $5 \times 10^8$  Wc를 2회→계속해서 W10 3 mg+ $5 \times 10^8$  Wc로 계속 투여중
- [0117] · 시험번호 KB07-003 :
- [0118] W10(3 mg) 단독으로 4회→2주후에 W10 1 mg+ $5 \times 10^8$  Wc를 3회→계속해서 W10 3 mg+ $5 \times 10^8$  Wc로 계속 투여중
- [0119] · 시험번호 KB07-005 :
- [0120] W10(1 mg) 단독으로 3회→계속해서 W10(3 mg) 단독으로 5회→2주후에 W10 1 mg+ $5 \times 10^8$  Wc를 3회→계속해서 W10 3 mg+ $5 \times 10^8$  Wc로 계속 투여중
- [0121] · 시험번호 KB07-006 :
- [0122] W10(1 mg) 단독으로 3회→계속해서 W10(3 mg) 단독으로 4회→2주후에 W10 1 mg+ $5 \times 10^8$  Wc를 3회→계속해서 W10 3 mg+ $5 \times 10^8$  Wc로 계속 투여중
- [0123] · 시험번호 KB07-007 :
- [0124] 처음부터 W10 3 mg+ $5 \times 10^8$  Wc를 10회 투여. 7주후에 PD의 판정. 10회 투여후 PS3로 되어 시험 치료는 종료.

- [0125] · 시험번호 KB07-009 :
- [0126] 처음부터 W10 3 mg+5×10<sup>8</sup> Wc를 6회 투여. 종양이 괴사하여 탈락한 상처 자리로부터 감염되어 전신 상태가 악화, 치료 중지.
- [0127] · 시험번호 KB07-011 :
- [0128] W10(3 mg) 단독으로 5회→4주후에 W10 1 mg+5×10<sup>8</sup> Wc를 1회→계속해서 W10 3 mg+5×10<sup>8</sup> Wc로 계속, 21회째에 PD로 종료
- [0129] · 시험번호 KB07-012, KB07-013 :
- [0130] 처음부터 W10 3 mg+5×10<sup>8</sup> Wc로 계속 투여중
- [0131] · 시험번호 KB07-017 :
- [0132] 처음부터 W10 3 mg+5×10<sup>8</sup> Wc를 6회 투여. 6주째의 화상 진단(PET-CT)에서 PD의 판정. 치료 종료.
- [0133] 안전성의 평가는, 유해 사상의 판정 기준으로서 CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0) by JCOG/JSCO-Oct. 27, 2004를 이용하고, grade 2에서 휴지, grade 3 이상에서 시험 치료와의 인과 관계에 관계없이 중지로 했다.
- [0134] 또, 치료의 유효성의 평가는, RECIST 기준(Therese, P. et al., J Natl Cancer Inst. 2000, 92, 205-216)에 따라 행했다. 구체적으로는, helical CT 또는 MRI에 의해, 모든 표적 병변이 소실된 경우를 CR(complete response), 표적 병변의 최장 직경의 합이 30% 이상 감소한 경우를 PR(partial response), 표적 병변의 최장 직경의 합이 20% 이상 증가한 경우를 PD(progressive disease), PR에도 PD에도 미치지 않는 경우를 SD(stable disease)로서 평가했다. 단, 표적 병변의 유무에 상관없이, 신병변이 1개라도 출현한 경우는 PD로 평가했다. 결과를 표 1 및 도 9~11에 나타낸다.

표 1

시험 번호	성	질환	개시일	3회 완수	계속	투여수	경과	RECIST 평가
KB07-001	M	기관지 선양 낭포양, 다발 폐전이	2007/10/4	○	○	18	1/31까지 18회 투여했다. 14주후 CT에서 SD	SD
KB07-002	F	유방외 Paget병	2007/10/9	○	○	17	1/29까지 17회 투여했다. 14주후 CT에서 SD	SD
KB07-003	M	전립선양, 치골 전이	2007/10/4	○	○	13	15주까지 PSA 점감. MRI도 PR(치료 개시 3.5개월 전에 방사선 요법 시행으로 인해, 화상은 참고로)이었지만, Cre 상승으로 인해 휴약. 휴약후 PSA 재상승(0.01→0.03).	SD (PSA에 의함)
KB07-005	M	전립선양, 우측 대퇴골 전이	2007/10/3	○	○	18	17주까지 종양 마커가 점감. 14주후 MRI에서 SD	SD
KB07-006	F	구강 선양 낭포양	2007/10/4	○	○	18	1/31까지 18회 투여. 14주후 CT에서 SD	SD
KB07-007	M	폐대세포양, 폐내 다발 전이, 골반골 다발 전이	2007/11/12	○	○	10	7주후 PD. 특히 골반골 전이는 미만성으로 증대. 그 후 흉수도 악화되어, PS3으로 되어 종료.	PD
KB07-009	F	상악 치육양	2007/11/1	○	○	6	국소에 대한 DTH를 확인했지만, 원발소의 파열, 감염을 초래하여 입원. 섭취 불가가 되어 종료.	평가 불능
KB07-011	M	Desmoplastic small round cell tumor	2007/10/16	○	○	14	4주후 CT에서는 SD였지만, 12주후 CT에서 간 전이의 현저한 진전을 확인했다. 골반 종양에 의한 장폐색도 악화되어 중지.	PD
KB07-012	F	대장양	2007/11/19	○	○	9	2008/1/7 PD (종양 마커의 지속 상승)로 중지.	PD
KB07-013	F	악성 흑색종, 다발 폐전이	2007/11/15	○	○	12	기존 병변은 SD이지만, 미소 신병변이 출현. IFN-β 병용 요법으로의 변경 검토중.	PD
KB07-017	M	악하선양	2007/12/21	○	○	6	시험약 투여중. 투여 개시후의 평가 미시행.	PD

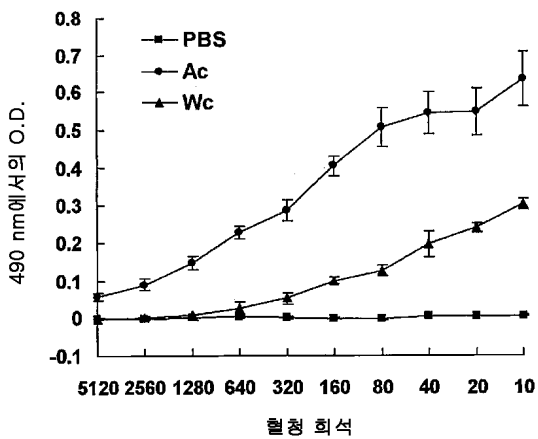
- [0135]
- [0136] W10+Wc 투여를 6회 이상 완수한 11증례 중, RECIST 기준에 의한 유효성의 평가가 가능한 것은 10증례로, 이 증반수에 해당하는 5증례가 SD로 판정되었다(표 1). KB07-003(도 10)에 대해서는, Wc 첨가 개시후의 SLD의 변화가 14주간 58%로, RECIST 기준으로 PR을 나타냈지만, 표적 골병변에 방사선 요법의 이력이 있어, 그 만발 효과의 가능성을 부정할 수 없기 때문에, 「PSA 레벨이 측정 한계값에 머물러 있다」는 지표로 SD로 평가했다(표 1).

KB07-009는, 투여후 48시간째를 피크로, 암의 전이부에 강한 발적과 종창, 동통이 있었지만, 2일 정도로 가벼워지고, 다음번 펩티드 면역후에도 그것을 반복하였다. 펩티드 면역 치료 개시후, 화상 상에서도 측두골내 및 구강으로부터 경부 피부에 이르는 중앙 덩어리가 급속하게 용해되어, 극적인 변화를 나타냈지만, 구강으로부터 경부 피부에 관통된 구멍이 나, 상처 자리로부터 감염되어 전신 상태가 악화되어 치료가 중지되고, RECIST 평가는 할 수 없었다(표 1).

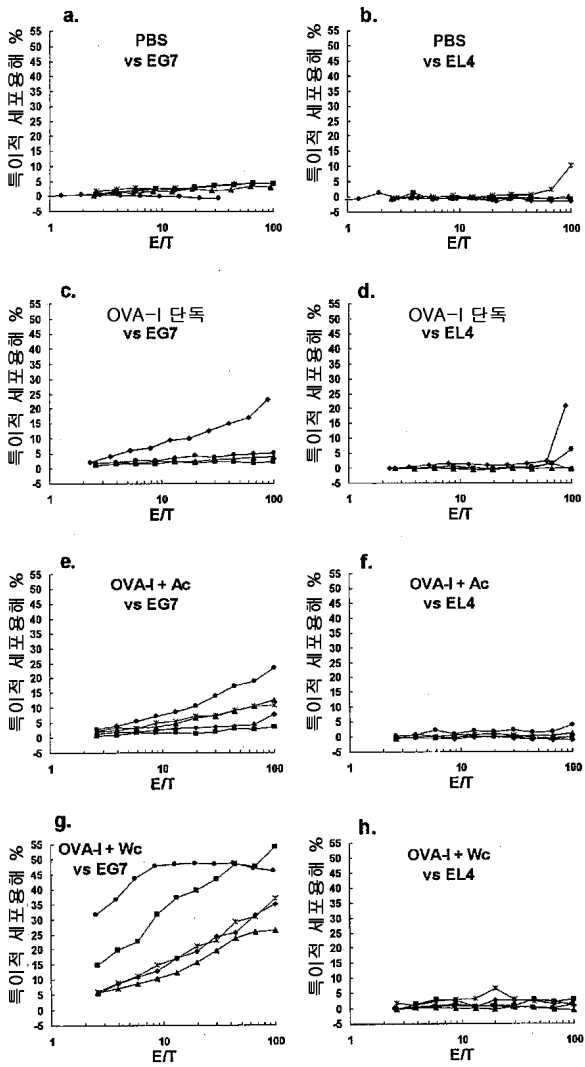
[0137] 종래의 보고에서는 SD 이상의 비율이 1할을 초과하는 예가 거의 없는 것(다른 WT1 항원 펩티드와, 보조약으로서 FIA를 이용한 시험에서도, 주 1회의 간격으로 12회 투여를 완수하여, RECIST 평가가 가능했던 증례 중, SD는 2할 이하에 그쳤다. 데이터는 나타내지 않음), 또한, 본 시험에서의 치료 대상 환자의 대부분이, 다른 치료에서 반응이 없었던 다발 전이를 갖는 진행암 환자인 것을 고려하면, 본 성적은, 본 발명의 치료법의 유효성을 여실히 나타내는 것이다.

도면

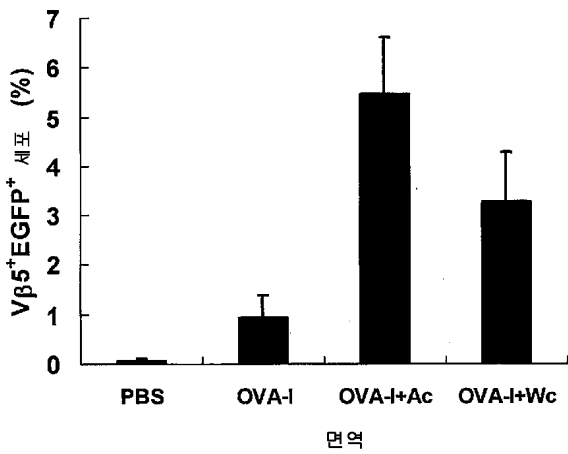
도면1



도면2

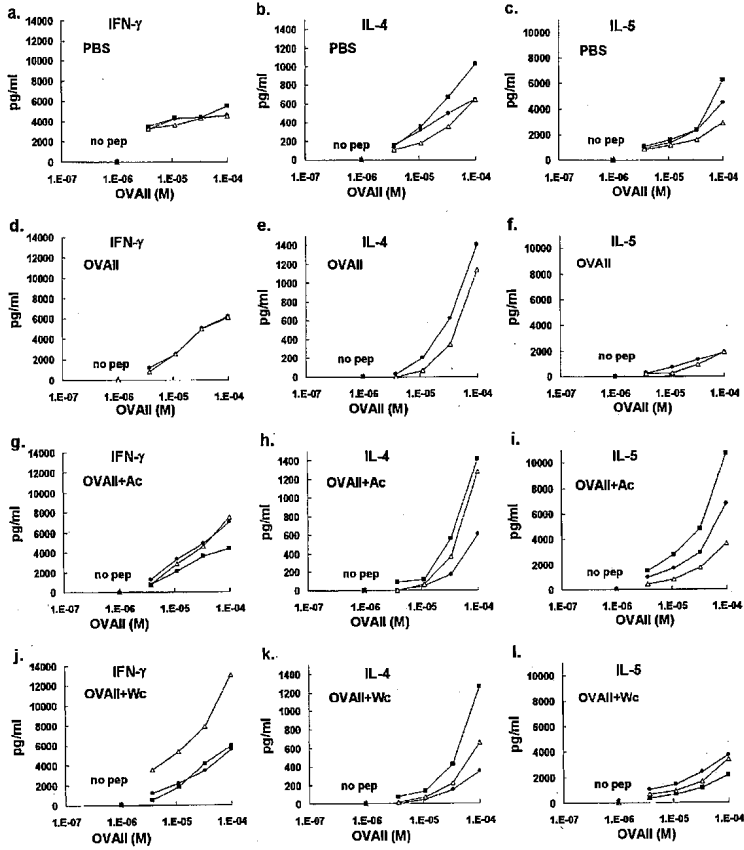


도면3

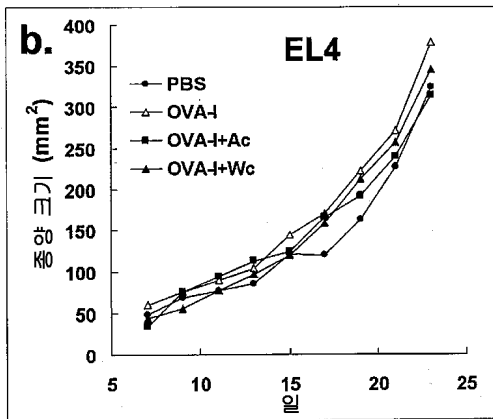
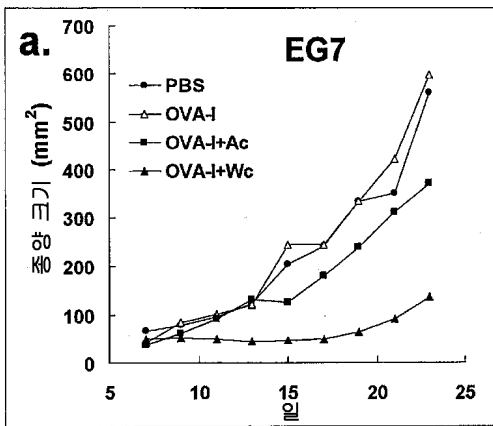




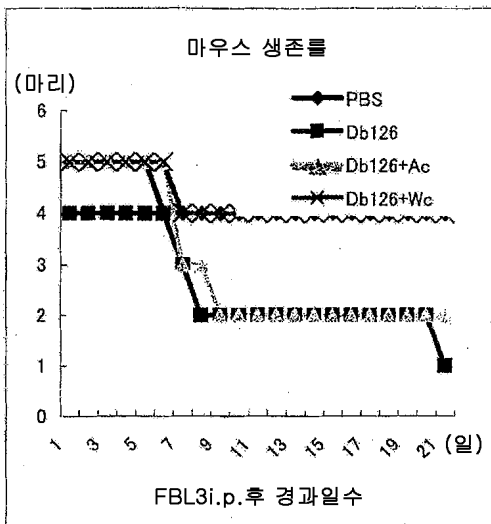
도면4



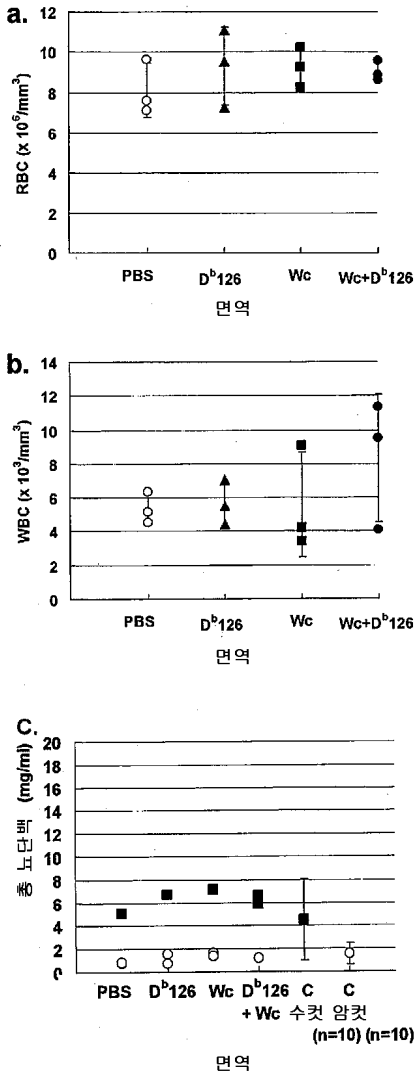
도면5



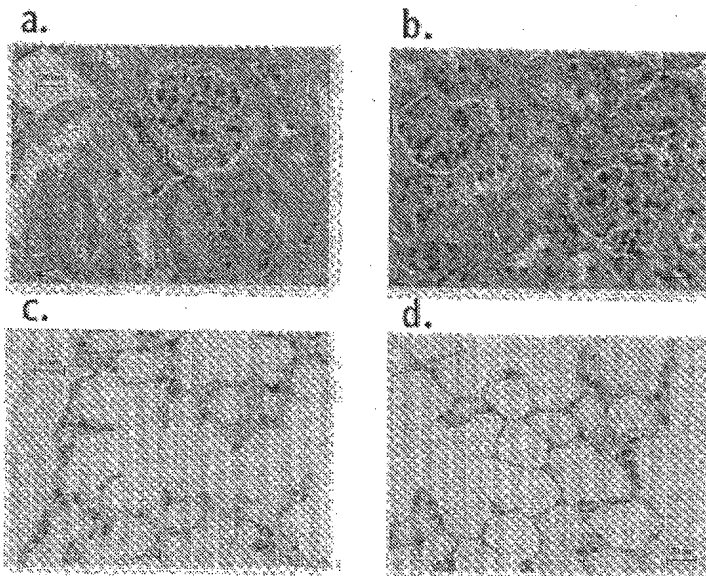
도면6



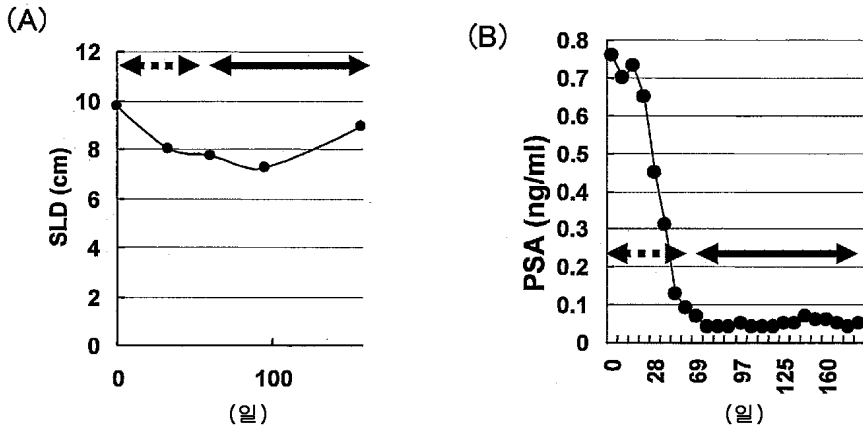
도면7



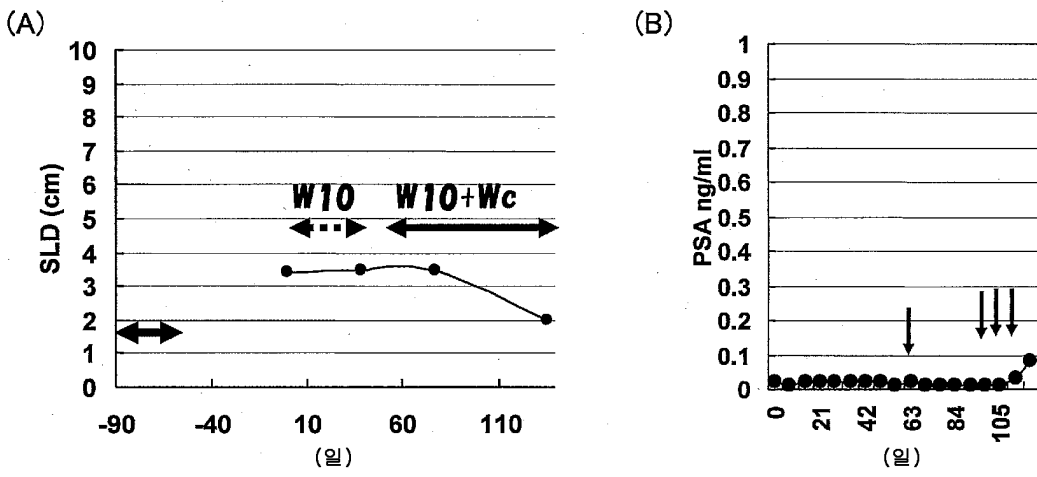
도면8



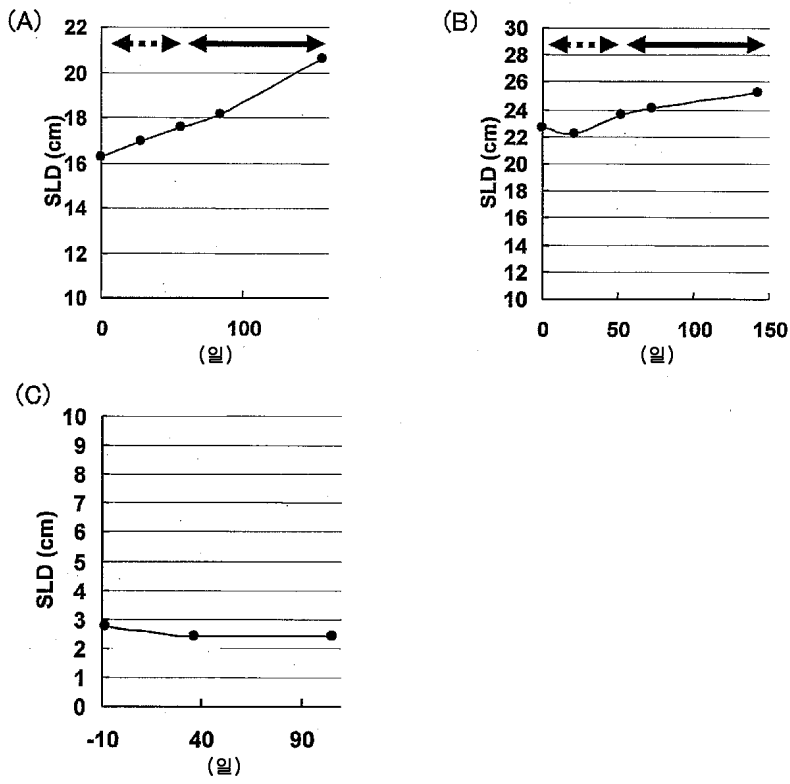
도면9



도면10



도면11



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)