

암백신

¹삼척국립대학교 생약자원개발학과, ²성균관대학교 약학부

손은화¹ · 인상환² · 표석능²

Cancer Vaccines

Eun-Wha Son¹, Sang-Whan In² and Suhkneung Pyo²

¹Department of Pharmacognosy Material Development, Samcheok National University, Samcheok,

²Division of Immunopharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Korea

ABSTRACT

Cancer vaccine is an active immunotherapy to stimulate the immune system to mount a response against the tumor specific antigen. Working as a stimulant to the body's own immune system, cancer vaccines help the body recognize and destroy targeted cancers and may help to shrink advanced tumors. Research is currently underway to develop therapeutic cancer vaccines. It is also possible to develop prophylactic vaccines in the future. The whole cell approach to eradicate cancer has used whole cancer cells to make vaccine. In an early stage of this approach, whole cell lysate or a mixture of immunoadjuvant and inactivated cancer cells has been used. Improved vaccines are being developed that utilize cytokines or costimulatory molecules to mount an attack against cancer cells. In case of melanoma, these vaccines are expected to have a therapeutic effect of vaccine. Furthermore, it is attempting to treat stomach cancer, colorectal cancer, pancreatic cancer, and prostate cancer. Other vaccines are being developing that are peptide vaccine, recombinant vaccine and dendritic cell vaccine. Out of them, reintroduction of antigen-specific dendritic cells into patient and DNA vaccine are mostly being conducted. Currently, research and development efforts are underway to develop therapeutic cancer vaccine such as DNA vaccine for the treatment of multiple forms of cancers. (**Immune Network 2005;5(2):55-67**)

Key Words: Cancer vaccine, DNA, dendritic cell, immunotherapy

서 론

암세포들을 탐색하여 파괴하는 면역능력을 나타내는 면역감시기능(immune surveillance)은 virus 감염과 연관된 암세포의 성장을 조절하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1). 그러나 자연적으로 발생하는 암세포들의 경우에는 복합적인 유전자 돌연변이들에 의해서 생성된 새로운 항원들에 대한 면역감시기능이 정상적으로 반응하지 않는다. 암세포는 인체내 면역반응을 억제하는 물질을 스스로 분비하거나 암세포에 대한 항체생성에 필수적인 항원을 제시하지 않기 때문에 적절한 항원-항체 면역반응을 일으키지 못하며, 인체는 암세포에

대한 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell; CTL)를 활성화하지 못하여 효과적으로 암세포를 제거하지 못한다(2). 따라서 최근에는 암을 치료하기 위한 면역요법으로 암세포를 특이적으로 파괴하는 T 세포의 활성을 인위적으로 조절할 수 있는 치료용 암백신(cancer vaccine)의 개발이 시도되었다(3,4).

암백신은 암세포가 지니는 암특이항원(tumor-specific antigen; TSA)을 암환자에게 투여하여 면역시스템을 활성화시킴으로써 생체 내 면역기능을 강화하여 암세포를 제거하는 능동적 면역치료법이다. 암세포를 제거하는 면역반응에서는 T 세포의 반응이 결정적으로 중요하다. CTL이 활성화되면 항원인식 분자인 MHC class I형을 통하여 암세포를 파괴할 수 있기 때문이다. T 세포가 활성화되기 위해서는 암관련항원(tumor associated antigen; TAA)을 인식하는 과정이 필수적이다(5). 그러나 현재까지 발견된 암항원 중 어떠한 항원도 완전하게 암세포에

책임저자 : 표석능, 성균관대학교 약학부
☎ 440-746, 경기도 수원시 장안구 천천동 300
Tel: 031-290-7713, Fax: 031-292-8800
E-mail: snpyo@skku.ac.kr

대하여 특이적인 항원으로 작용하지 않고 있다. 암항원들이 비록 암세포들에서 주로 발현되긴 하나, 정상세포에서도 발현되기 때문에 암관련 항원을 인식하기 위해 면역계를 자극하면 정상세포도 공격받는 결과를 초래하므로 결과적으로는 자가면역반응(autoimmune reaction)으로 인한 질환이 발생할 수 있기 때문이다.

지금까지 암백신의 개발은 대부분 해당 암세포들을 직접 사용하는 방법을 이용하였는데, 세포에 기초한 암백신 개발 초기단계에는 면역보조제와 혼합된 불활성화시킨 암세포 전체 또는 암세포 용해물질들이 이용되었다. 이후 개량된 암백신들이 기존의 백신을 대체하게 되었는데, 이것은 cytokine과 공동자극분자(costimulatory molecules)를 암화하는 유전자들을 응용하는 것이다(6). 이외에도 항원 또는 항원결정기(epitope)를 이용한 항원 백신(7), *in vitro*에서 수지상세포(dendritic cell)와 암항원을 배양하여 암세포의 항원을 제시하게 하는 암백신 요법 등이 시도되었다(8). 암백신은 항원의 종류 및 항원 전달방법에 따라 DNA 백신(9), peptide 백신(10), 세포백신(11) 등으로 개발될 수 있는데, 그 중에서도 항원을 도입시켜 개발하는 세포백신과 DNA 백신이 대표적이다. 특히 DNA 백신은 가장 유력한 차세대 암백신으로 기대되고 있어 지금까지 암백신 개발 연구를 진행해온 연구자들 대부분이 DNA 백신 기술을 응용하는 데 주력하고 있다.

본 론

암백신 개발의 주요 인자. 감염성 질환에 대한 대부분의 백신과는 달리 암백신은 암세포의 항원에 노출되었을 때 면역계를 활성화시키는 치료백신을 의미한다. 그러나 세포의 형질전환 중에 암 신생아(tumor neoantigen)에 대한 효과적인 면역반응은 잘 관찰되지 않고 있다. 암에 대하여 효과적인 면역반응을 유도할 수 없는 이유는 항원소실 변이체(antigen-loss tumor variants)의 생성, MHC 발현의 소실, 항원처리과정(antigen processing)의 억제, 그리고 암괴사요소(tumor necrosis factor)와 Fas-ligand 등의 특정부위 억제물질(inhibitory molecules)들의 발현 등이라고 보고되고 있다(3).

암백신 개발에 가장 중요한 초점은 항원특이 T 세포 반응(antigen specific T-cell response)을 유도하는 데 있다(12). 면역계가 활성화되어 있음을 나타내는 대표적인 현상으로는 바이러스나 박테리아 감염에 따른 염증반응(inflammation) 또는 조직괴사 반응이다. 항원인식(antigen recognition) 시 T 세포 수준에서의 면역반응은 공통자극신호들에 의존한다. 어떤 염증관련 사이토카인(inflammatory cytokine) 반응에서 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)들은 T 세포 활성을 촉진하는 B7과 같은 공동자극 분자들(costimulatory molecules)을 발현한다. 그러나 적절한 공동자극물질들의 부재 시에는 T 세포 수용체의 항원 결합은 항원특이 T 세포의 ignorance,

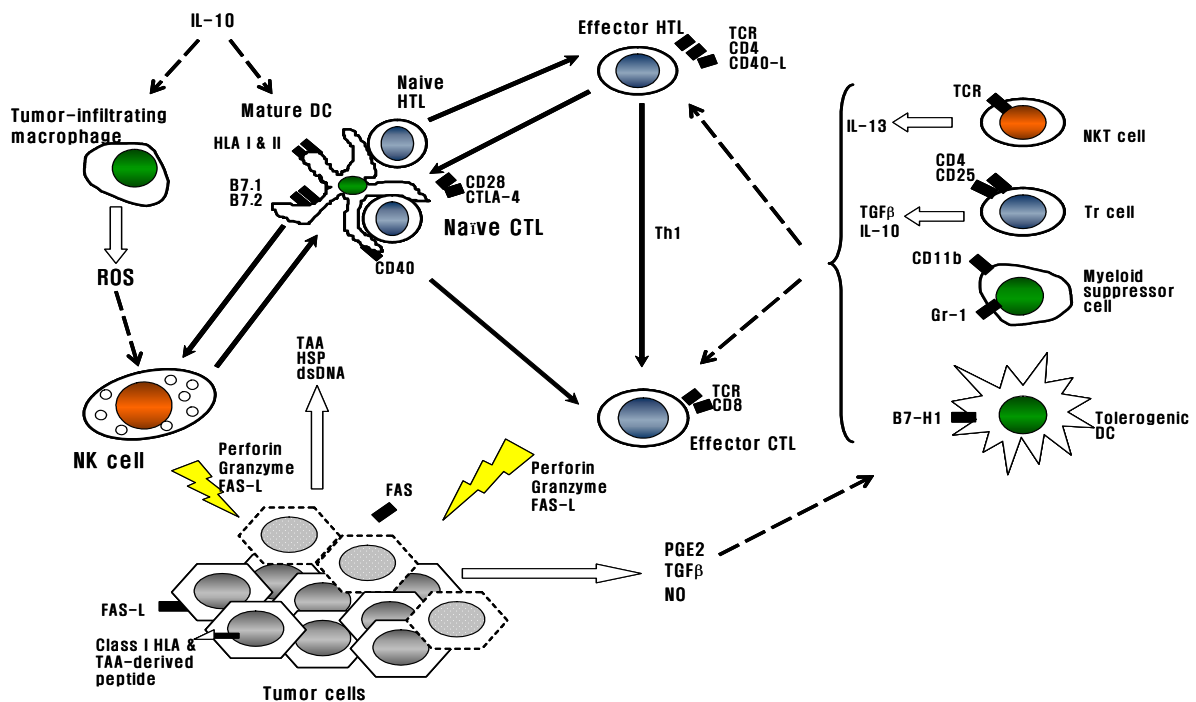


Figure 1. The immune response to tumor cells (full lines: stimulatory effect, dotted lines: inhibitory effect).

anergy 또는 apoptosis를 초래하게 된다(13). 암세포의 경우 이러한 항원특이 T 세포의 내성을 유도하는 특성을 지니고 있는데, 그 증거로 생쥐의 암에서 antigenic tumor cells (항원성 암세포)들이 면역능적격 숙주(immuno-competent host) 내에서 기억(memory), T 세포 반응 없이 계속 성장해 가는 것을 볼 수 있다(14). 이러한 사실은 암들이 면역반응에 충분하지 않는 자극제라는 것과 내성을 매우 적극적으로 유도할 능력을 가졌을 가능성을 보여 준다. 결국 효과적인 암백신이 되기 위해서는 내성을 극복할 수 있거나, 암세포에서 발현된 항원들과의 낮은 친화성에 의한 내성을 탈출할 수 있는 T 세포 집단들을 활성화시켜야 한다(Fig. 1).

모든 암백신의 주요 목표는 골수(bone marrow)에서 유도된 적절한 APC에 항원을 면역화(immunizing)하는 것으로, 백신의 종류에 따라서 여러 가지 경로를 통하게 할 수 있다. 첫 번째로 가장 중요한 외인성(exogenous) 경로는 항원 수용(uptake)을 들 수 있는데, 최근 연구결과에 따르면, 노출된 골수에 의해 APC로 세포 내 이입(endocytosis)된 암 항원들은 MHC class II뿐만 아니라, class I processing 경로를 경유하는 것으로 밝혀졌다(15). 두 번째 경로는 항원을 골수로 직접 도입하는 형질도입(transduction)이 있다. 이 경로는 어떤 재조합 바이러스 백신이나 박테리아 백신에 이용될 수 있다(16). 항원이 APC에 표적되는 세 번째 경로는 peptide 백신에 이용될

수 있는데, peptide가 APC 표면에 비워져 있는 MHC molecule들에 도입됨으로써 항원 처리(antigen processing) 과정을 우회하게 된다(17).

효과적인 암백신을 개발하기 위해 크게 3종류의 접근 방법이 제시되고 있다. 즉 암세포 등을 이용한 다가 백신(polyvalent vaccine)(18), 특이적인 암항원을 이용한 항원 백신(antigen-defined vaccine)(19), 그리고 수지상 세포 등을 이용한 세포 백신(cell-based vaccine)이다(Table I)(20).

T 세포에서 인식되는 암관련 항원.

T 세포에서 인식되는 암항원에 대한 대부분의 연구는 CD8⁺ T 세포와 MHC class I에 제한된 항원에 집중되어 왔으나, MHC class II에 제한된 CD4⁺ T 세포의 반응도 간과해서는 안 된다. 그것은 모든 항암 작용에 있어서 CD4⁺ T 세포들이 CTL과 항원 비특이적 면역 반응의 초회감작(priming) 단계에 매우 중요하기 때문이다(21).

T 세포에 의해 인식되는 암항원의 확인은 암환자로부터 얻어진 암특이 T 세포주 또는 클론(clone)이 *in vitro* 상태로 배양되기 시작하면서 용이하게 되었다(Table II). 지금까지 생쥐와 사람의 암에서 확인된 항원은 크게 다음과 같이 분류된다(22).

첫째, 식별된 암에서 주로 발현된 특이적(specific) 또는 특이한(unique) 암항원, 둘째, 정상 성인조직에 비해 암에서만 높게 발현되는 공유 암특이적 항원(shared tumor specific antigen), 셋째, 암이 발생하는 개체의 정상

Table I. Approach of cancer vaccine

Vaccine	Components	Contents
Polyvalent vaccines	Whole tumor cell	Auogous or allogeneic tumor cells that can be genetically engineered to secrete cytokines No need to know the molecular identity of TAA
	Lysate tumor cell	Mechanical, enzymatic, or viral tumor lysates No need to know the molecular identity of TAA
	Shared antigens	TAA or TAA-derived peptides released in vitro by allogeneic tumor cell lines No need to know the molecular identity of TAA
	Heat shock proteins	Prepared from auogous tumor cells No need to know the molecular identity of TAA
Antigen-defined vaccines	TAA	Proteins (eg., CEA, p53), idiotypes (lymphoma, multiple myeloma), glycoproteins (eg., MUC-1), glycolipids (eg., gangliosides)
	Peptides	HLA class I or class II restricted
	Recombinant DNA	Genetically engineered to express TAA±cytokines
	Recombinant virus	Genetically engineered to express TAA±cytokines
	Anti-idiotypic antibody	Mimicking the natural TAA
Dendritic cell-based vaccines	Tumor-DC hybrids	No need to know the molecular identity of TAA
	Peptide loaded DC	HLA class I or class II restricted
	Whole tumor cell loaded DC	Auogous or allogeneic tumor cells No need to know the molecular identity of TAA
	Tumor mRNA loaded DC	No need to know the molecular identity of TAA
	Genetically engineered DC	Engineered to secrete cytokines or express TAA

TAA: tumor associated antigens, DC: dendritic cell.

Table II. Tumor-associated antigens

Scope	Tumor antigen	Type of cancer*
Cancer testis antigens	MAGE-1	Melanoma,
	MAGE-2	Brcast, Head/neck
	MAGE-3	Bladder, gastric, lung
	MAGE-12	
	BAGE	
	GAGE	
Differentiation antigens	NY-ESO-1	
	Tyrosinase	Melanoma
	TRP-1	
	TRP-2	
	gp100	
	MART-1	
Tumour-specific antigens	MCIR	
	Ig Idiotype	B-ceII NHL, MM
	CDK4	Melanoma
	Caspase-B	Head/neck
	β -catenin	Melanoma
	CLA	Bladder
	BCR/ABL	CML
	Mutated p21/ras	Pancreatic, colon, lung
	Mutated p53	Colorectal, lung, bladder, head/neck
Overexpressed self antigens	Proteinase 3	CML
	WT1	CML, ALL, AML
	MUC-1	Breast adenocarcinoma
	Nonmal p53	Breast, colon, other cancers
	Her2/neu	Breast, ovary, lung
	PAP	Prostate
	PSA	Prostate
	PSMA	Prostate
	G250	Renal cell carcinoma
Viral antigens	HPV E6/E7	Cervical and penile cancer
	EBV LMP2a	EBV+Hodgkin's disease
	HCV	Liver cancer
	HHV-8	Kaposi sarcoma
Onco foetal antigens	CEA	Colon, breast, pancreatic cancer
	α -Fetoprotein	Liver Cancer
	5T4	Many Carcinomas
	Onco-trophoblast glycoprotein	(Including colon, gastric, breast, cervix, ovary, lung, renal cell)

NHL: non-Hodgkin lymphoma, MM: multiple myeloma, CML: chronic myeloid leukaemia, ALL: acute lymphoblastic leukaemia, AML: acute myeloid leukaemia, CEA: carcinoembryonic antigen, HPV: human papilloma virus, EBV: Epstein-Barr virus, HCV: hepatitis C virus, HHV: human herpes virus. *proportion of antigen-positive tumour types is very variable.

적인 조직에서 발견되는 조직특이 분화항원, 넷째, 암인자, 암억제인자 그리고 바이러스 관련암들의 바이러스 항원들이다.

Specific 또는 unique 암항원: 만약 거의 모든 암거부 (tumor rejection) 반응이 특정한 항원에 의한 것이라면 암 백신은 해당 환자로부터의 암세포 사용이 필수적이 될 것이다. Specific 또는 unique 항원들은 돌연변이나 유전 재배열에 의해 발생된 암들에서 특이하게 발견되는 것을 말한다. 이와 같이 최근에 돌연변이에 의해 유도된 다수의 MHC class I에 제한되는 melanoma 항원들이 확인되었는데, 한 펩타이드는 p16INK4a와의 결합을 방해하는 cdk4 유전자에서 돌연변이된 것이며(23), unique squamous cell carcinoma 항원에서는 apoptosis의 중요한 조절자인 caspase-8 유전자의 비활성 점 돌연변이(point mutation)가 발생한 것이다(24).

공유 암특이 항원(Shared tumor specific antigens): 생쥐 암에서의 교차 보호(cross-protection) 실험에 의하면 가장 면역원성(immunogenic)이 높은 암항원들이 특이적이라는 결과가 있었지만(25), 실제로 shared 암항원의 존재를 암시하는 교차 면역(cross immunization) 경우도 다수 관찰되었다(26,27). 생쥐와 사람 암에서 분리된 대부분의 공유 암항원은 보통 정상조직에서는 발견되지 않고 특정 암에서만 전사적으로 활성화된다. 인간에서 가장 잘 연구된 예로는 mage 유전자계를 들 수 있다. Mage 유전자는 melanoma에서는 흔히 발견되지만 다른 형태의 암에서는 흔하지 않다. 그리고 많은 암항원의 원형으로서 발견이 암과 고환(testis) 부분에만 국한되어 있다. MAGE-1과 MAGE-3의 공유 펩타이드는 melanoma 특이 CD8⁺ T 세포에 의해서 인식되고(28,29), 암에서 공유적 또는 선택적 발현 양상 때문에 이 항원들은 항원 특이 암백신을 위한 적절한 후보 중 하나로 평가되고 있다(30).

조직특이 분화항원: Melanoma 환자 대부분의 T 세포에서 melanocyte 특이 분화 항원에서 유도된 펩타이드를 인식하는 항원 식별능이 발견된 것은 매우 흥미로운 사실이다(31). 이것은 자가 항원에 특이한 T 세포들이 deletion 되었거나 기능적으로 되었기 때문에 나타난 결과이다. Melanoma 환자들에서 가장 흔히 인지되는 MHC class I에 제한된 조직 특이 항원들은 pigment 생합성에 관련된 melanosomes의 단백질로부터 유도된 것들이다(32). 이 melanosoma 항원들로부터 HLA-A2에 제한된 펩타이드 mart-1/melan-A와 gp100은 많은 암환자들의 T 세포에 의해 인식되고 있으며(33), 특히 CTL에서 우성 반응(dominant reactivity)을 나타낸다(34).

암인자와 암억제인자: 암인자와 암억제인자는 특정 암과 밀접하게 연관되어 있으며, 항암 면역성을 위한 효과적인 표적들이다. 그 중에서도 암에서 형질변화가 가장 잘 연구된 p53은 대표적인 암항원 인자로 연구되었다

(3,35). p53단백질은 거의 대부분의 정상조직에서 발현되기 때문에 암특이적 항원으로 분류되지 않으나, 암에서 단백질의 발현 정도가 정상조직보다 현저히 높기 때문에 암백신의 표적으로 이용될 수 있다. 이에 wild-type p53 펩타이드에 특이적으로 반응하는 CTL이 p53을 다량 발현하는 암에 적용될 수 있음이 보고된 바 있다(36). 그 외에도, 암항원 후보로서 많이 연구된 암인자 중에 ras를 들 수 있다. 실제로 돌연변이체 ras에 대한 항체 생성과 T 세포 면역반응이 위장관(gastrointestinal) 암환자에서 확인되었다(37,38). 또 항암 면역증강을 위한 표적으로 평가되고 있는 암인자로서 her-2/neu가 있다. 이것은 membrane tyrosine kinase receptor로 포유(mammary), 난소(ovarian)와 다른 상피세포에서는 낮은 수준으로 발현되나, mammary 및 ovarian carcinoma에서는 높은 수준으로 발현이 증가하게 된다(39). her-2/neu는 전형적인 세포 매개성 면역증강작용 이외에도 막 부위(membrane localization) 작용이 있어 항체에 기초를 둔 면역증강요법에서 암관련 항원으로서의 역할을 가능하게 한다(40).

바이러스와 관련된 암항원: 인간에서 많은 종류의 암은 특정한 바이러스와 직·간접적으로 관련되어 있고, 바이러스 항원은 중요한 암관련 항원으로 다시 연구되고 있다. 대표적으로 간암과 자궁경부암은 바이러스 감염과 직접 관련되어 있는데(22), 간암의 경우 B형간염 바이러스가 병원성 인자(etiological agent)로서 알려져 있으며(41), 자궁경부암의 80~90%는 'high risk' human papillomavirus (HPV)의 type-16, -18, -31 그리고 -45의 E6과 E7 항원 발현과 직접 관련되어 있다(42). 바이러스와 관련된 암에서 가장 중요한 부분은 초기 바이러스 감염 단계에서 바이러스가 면역 반응으로부터 회피하는 과정과 암에서 연속적으로 발현되는 바이러스 항원들의 면역 내성에 대한 기전에 관한 문제이다. 바이러스 관련

암항원들은 치료용 암백신과 예방용 암백신을 위한 중요한 표적으로 연구되고 있다.

암백신의 개발 형태.

암백신을 형태(type)별로 분류하면 다음과 같이 분류할 수 있다(Table III).

전세포백신(cancer cell vaccine): 암항원에 대한 면역학적 중요성은 많이 연구되었음에도 불구하고 암연구에 가장 중요한 암거부항원에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 그래서 지금까지 대부분의 암백신을 위한 접근방법으로 해당 암세포들을 항원의 재료로서 직접 사용해 왔다.

암세포백신은 외과적 수술로 제거한 암세포 자체를 이용하는 것으로 더 이상 암세포를 형성하지 않도록 방사선을 조사하여 암세포를 사멸시킨 후 환자에게 주사한다. 1970년대부터 melanoma 등에 대한 방법이 시도되어 왔다(43). 그러나 이러한 방법으로 처리하더라도 암세포 표면에는 암항원(tumor antigen)이 존재하기 때문에 특이적인 면역반응을 자극시킬 수 있다. 따라서 이러한 암항원을 갖고 있는 암세포는 체내에 주사 시 체내 면역계에 의해 인식되고, 공격을 당하게 된다. 때로는 화학물질의 처리나 유전자 조작을 통한 암세포의 변형이나 또는 면역증강작용이 있는 다른 물질, 즉 면역보조제(adjuvant) 등과 혼합하여 면역작용을 보다 증강시켜 사용하기도 한다(44). 즉, 세포에 기초한 암백신 개발의 적합 여부는 암세포에서 널리 발현되는 자가 항원들에 대한 것보다도 암특이(tumor-specific) 또는 암선택항원(tumor-selective)들에 대해서 강한 면역성을 생성하게 되는 그들의 능력에 달려있다(20).

암세포 자체를 백신으로 개발하려는 시도가 이루어지는 것은 아직까지 모든 암항원이 알려져 있지 않기 때문이며, 암세포 전체를 이용함으로써 아직 밝혀지지 않은

Table III. The type of cancer vaccines and manufacturing techniques

Type	Manufacturing techniques
세포(whole cell)백신 자가유래 백신 동종이계 백신	방사선 조사한 암세포 또는 세포용해물 환자의 자기 암세포를 이용한 백신 다른 사람에게 분리한 암세포를 이용한 백신
수지상세포 백신	암항원을 가한 수지상세포 암항원을 발현하는 유전자를 도입시킨 수지상세포
항원백신 펩타이드백신	Emulsion 중의 CTL epitope Liposome 중의 CTL epitope Lipopeptide 중의 CTL epitope
바이러스 벡터 백신	암항원 또는 암항원+cytokine을 발현하는 adenovirus 및 vaccinia virus
사이토카인, 공동자극분자 백신	Cytokine 또는 B7 gene을 도입시킨 암세포 암항원을 가하고 cytokine gene을 도입시킨 항원제시세포
DNA백신	항원을 발현하는 plasmid 이용

암항원을 포함한 많은 중요 암항원을 체내 면역계에 노출시킴으로써 보다 효과적인 면역반응을 유도하기 위함이다. 최근 연구에서는 수지상 세포를 암세포에 융합(fusion)시켜 면역작용을 증강시키려는 시도가 이루어지고 있다(45,46).

자가유래 암세포백신(augous vaccine): 환자 자신에게서 분리한 암세포 자체를 이용하는 즉 자기세포(self)를 이용한 백신이다. 분리된 암세포를 처리 후 즉시 주사하거나, 일정기간 *in vitro* 배양 후 또는 동결처리 후 주사한다. 이러한 자가 유래 암세포백신은 자신의 세포를 이용하기 때문에 MHC 서열이 일치하고, 최상의 면역반응을 유도할 수 있다는 장점은 있으나 다음과 같은 단점을 가지고 있다(47).

첫째, 환자 개개인에게 적합한 백신의 제조가 어렵고 비용이 많이 소요된다는 점이다. 둘째, 암세포는 돌연변이(mutation)가 쉽게 일어나기 때문에 백신의 효력이 제한된다. 셋째, 여러 종류의 암세포를 갖고 있거나, 여러 부위에 암세포를 갖고 있는 환자의 경우에는 암세포마다 조금씩 또는 매우 다른 암항원을 가지고 있어서 백신의 효력이 제한적이다. 넷째, 분리된 암세포에서 백신을 제조할 수 있는 유용한 세포가 충분하지 않아 많은 양의 백신의 제조가 어렵다. 다섯째, 자기(self)로 인식되어 백신 투여 후 강력한 면역반응을 유도하기 어렵거나, 오히려 면역반응을 억제시키는 물질을 분비하여 역효과를 초래할 수 있다는 점이다.

따라서 이러한 현상을 극복하기 위해 반복적인 백신 투여, 암세포 표면의 화학처리에 의한 변형, 유전자 조작, 면역계를 효과적으로 활성화시키는 cytokine의 투여 등의 방법이 모색되고 있다(48).

동종이계 암세포백신 (allogenic vaccine): 자가 유래 암세포백신의 여러 단점을 극복하기 위해 다른 사람에게서 분리한 암세포를 이용하는 방법으로, 동종이계 암세포 백신은 실험실의 대량 배양을 통해 많은 양을 확보할 수 있고, 여러 환자로부터 분리한 여러 종류의 암세포 즉, 여러 종류의 암항원을 동시에 투여할 수 있다는 장점이 있다. 대개는 사멸시킨 동종이계 암세포와 1종 이상의 면역보조제를 함께 투여하여 면역반응을 극대화하고 있다.

자가 유래 백신보다 실용적이긴 하나 이러한 백신이라도 모든 환자에게 면역반응을 유도하지 않기 때문에 선택할 암세포를 주의 깊게 선정해야 한다(49).

수지상세포 백신(dendritic cell vaccine): 수지상세포는 림프계 조직을 비롯하여 여러 조직에서 각 조직 세포간극에 수상돌기를 내고 있는 세포로, 세망세포나 대식세포(macrophage)와 유사하나 결합조직을 형성하지 않고, 식작용(phagocytosis)을 하지 않는다는 점이 다르다. 골수의 조혈간세포에서 유래하며, 표피의 Langerhan's 세포

도 수지상세포의 일종이고 같은 기능을 한다. 수지상세포는 암세포를 체내 면역계가 인식할 수 있도록 보조하는 APC의 한 종류로, 암세포 표면의 항원을 분해하여 항원결정기를 T 세포에 제시함으로써 CTL 반응을 유도하게 하는 역할을 한다(45). 그러나 아직도 수지상세포가 가장 효과적인 항원제시세포 인지는 논란이 되고 있다.

수지상세포는 macrophage보다 약 50배 높은 수준의 MHC molecule들을 발현함으로써 T 세포 수용체와의 결합을 위한 더 많은 펩타이드/MHC 리간드를 제공하게 된다. 또한 T 세포 활성화에 매우 중요한 세포 부착물질(adhesion molecule)과 보조 자극 물질(costimulatory molecule)을 매우 높은 수준으로 발현한다(50). T 세포 특이 chemokine을 코드화하는 유전자들과 같이 수지상세포 특이 유전자들은 T 세포 반응을 유도하는데 수지상세포에 강한 활성을 유도한다. 이와 같은 결과에 근거하여 많은 연구자들은 직접 분리한 수지상세포 또는 GM-CSF로 유도된 수지상세포를 종양 면역을 위한 항원 운반체로 이용하였다(51).

환자로부터 분리된 수지상세포는 실험실에서 대량배양 후 계속적으로 항원을 가하거나, 자기 항원을 생성할 수 있도록 유전자 조작 등의 방법으로 암세포 인식 능력을 증강시킨 후 주사함으로써 면역반응을 일으키게 한다. 최근에는 수지상세포와 암세포를 융합시켜 수지상세포가 암세포를 스스로 발견, 제시할 수 있도록 하는 방법이 시도되었으며 이렇게 *in vitro*에서 훈련 또는 교육시킨 수지상세포에서 암세포에 대한 높은 면역반응이 나타났다(52). 수지상세포에 도입된 항원의 형태로는 MHC class I에 제한된 최소의 펩타이드부터 단백질까지 다양하고, 여기에서 항원은 종양세포와 수지상세포의 융합에 의해서 공여된다. 이에 이디오펡형으로 펄스(idiotypic-pulsed)된 수지상세포를 이용하여 B 세포 lymphoma 환자에게 면역화했을 때, 임상적 효과와 더불어 idotype 특이 면역성이 생성되었다(53).

Melanoma 환자에게 이용된 augous 수지상세포는, 먼저 GM-CSF와 IL-4가 있는 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)의 배양에서 생성되어, tumor lysate 또는 MHC class I에 제한된 melanoma 펩타이드로 pulse된 것으로서, delayed type hypersensitivity의 유도와 함께 임상적 효과를 보였다(45). 그렇지만 궁극적인 systemic 항암 면역성을 유도하기 위해서는 수지상세포의 다양한 loading 방법들이 개발되어야 한다.

수지상세포 백신은 자가 유래 암세포 백신과 같이 개개 환자에 대하여 특이적이며, 환자 개개인으로부터 분리하여 배양 후 투여되기 때문에 제조하기가 어렵고 비용이 많이 든다는 단점이 있으나, 현재 그 효능이 우수하여 melanoma 환자 외에도 prostate cancer (54), lung cancer

Table IV. The current development of cancer vaccines using dendritic cells

Materials	Company	Property
다발성골수종백신 APC8020	Dendreon사(미국), 기린비루(일본)	환자의 혈액에서 수지상세포를 분리하여 특이단백질인 이디오타입으로 활성화하여 환자체내로 재투여함. 임상 1상(02)
전립선단백질 APC8015	"	전립선암 항원과 수지상세포를 이용한 암백신. 공동개발, 임상시험 중(02)
Provenge Mylovenge	Dendreon사(미국) "	전립선암을 대상으로 한 수지상세포요법. 임상3상(02) 다발성골수종을 대상으로 한 수지상세포요법. 임상2상(02)
APC8024	"	유방암, 난소암, 대장암을 대상으로 한 수지상세포요법. 임상1상(02)
Ex vivo 텔로메라제 · 암백신	Geron사(미국)	수지상세포 등 항원제시세포를 환자로부터 분리하고 체외에서 텔로메라제 단백질단편이나 텔로메라제 항원을 세포내에서 생산하기 위한 핵산으로 처리하여 환자에게 다시 주입하는 방식의 암면역요법.
수지상세포/암항원백신	Genzyme Molecular Oncology사(미국), Massachusetts종합병원(미국)	환자의 수지상세포에 Melan-A/Mart-1과 gp100라는 두개 항원을 제시하여 백신으로서 재주입하는 ex vivo 백신을 악성흑색종환자에 투여. 임상1/2상(02)
수지상세포 · 암세포융합 유방암백신	Genzyme Molecular Oncology사(미국), Beth Israel Deaconess의료센터(미국), Dana-Farber암연구소(미국)	환자의 종양세포와 수지상세포를 화학적으로 융합하여 백신으로서 이용한 말기유방암 대상의 임상1/2상시험
다발성골수종 대상의 수지상세포 백신	Aastrom Biosciences사(미국), Stanford대학(미국), 미국국립위생연구소	다발성골수종에 대한 신행 수지상세포 백신의 임상계획
DC-I 세포치료 키트	Aastrom Biosciences사(미국), 동사의 유럽자회사인 Zellera사	사람 수지상세포의 ex vivo 제조를 위한 DC-I 세포치료키트의 유럽내 시판허가
DCVax-Prostate	Northwest Biotherapeutics사(미국)	전립선암을 대상으로 한 수지상세포백신. 임상1/2상 종료
DCVax-Brain	"	글리오블라스토마를 대상으로 한 수지상세포백신. 임상2상.
IL13과 수지상세포를 이용한 암백신(IDD3)	Sanofi-Synthelabo사(프랑스), Immuno-Designed Molecules사(프랑스)	멜라노마를 대상으로 한 암백신. 임상2상 종료(02) 암 면역요법의 개발판매를 목적으로 제휴. Sanofi사는 IDM사의 세포치료제로부터 최대 20품목 선택키로 함.
수지상세포 치료제	동경대학의과학연구소(일본)	세포를 분리하는 유닛을 이용하여 분리한 미숙한 수지상 세포를 유전자를 도입하지 않고 암환자에게 투여하는 실험 개시
CpG올리고뉴클레오타이드	Coley Pharmaceutical사(미국)	CpG 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 수지상세포 활성화. 특허등록

(55) 등에 대한 임상 시험이 시도되고 있다(Table IV). **항원 백신 (antigen vaccine):** 항원백신은 수천 개의 항원을 함유하고 있는 암세포 자체를 이용하는 것이 아니라, 개별적으로 분리, 정제된 개개의 암항원을 이용하여 보다 효율적으로 면역반응을 유도하는 백신이다. 특정 암항원이 어떠한 종류의 암에서는 특이적인 반응을 유도하기 때문에 자가 유래 암세포 백신의 경우처럼 환자마다 특이적인 백신을 만들지 않아도 되는 장점이 있다. 최근에는 많은 암항원에 대한 유전적 구조가 규명되어 대량 생산이 가능하게 되었고, 보다 효율적으로 면역반응을 유도하도록 암항원의 구조적 변형도 가능하게 되었다(56). 따라서 이러한 신기술의 도입으로 특이성이

높은 암항원이 대량 생산되어 환자에게 투여할 수 있게 되었다. 또한 동시에 여러 암항원을 혼합하여 투여할 수 있기 때문에 앞으로 많은 개발을 기대하고 있다.

현재까지 암세포의 분화, 암 유발 바이러스, 암관련 항원 TAA 등 암특이적 항원에 대한 많은 진전이 있어 왔다(57). 이러한 TAA를 목표로 하여 세포성 매개(immune cell-mediated) 및 항체 표적(antibody-targeted) 면역반응을 유도하려는 연구들이 진행되면서 암 치료에 이용하려는 시도가 활발하다(58).

펩타이드 백신(peptide vaccine): 가장 먼저 임상 시험된 특이 항원 암백신은 공통 HLA alleles에 의해 공여된 특정 펩타이드이다(59). 거의 모든 펩타이드에 기초한 백

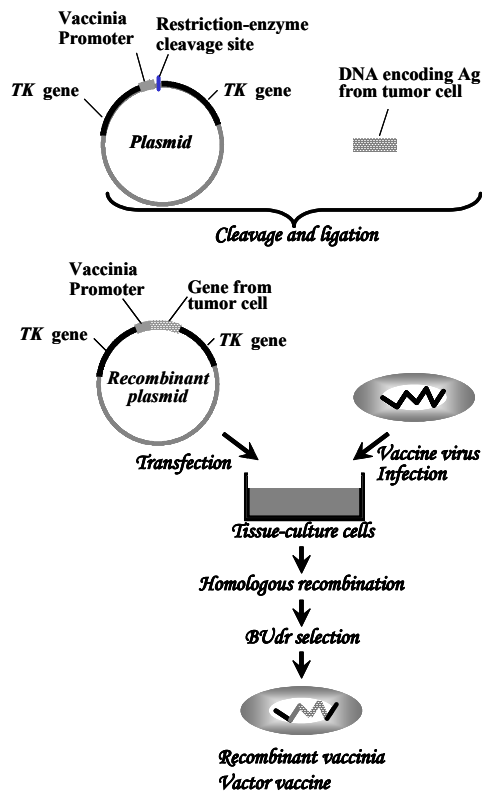


Figure 2. The generation of recombinant viral cancer vaccines.

신은 MHC class I에 제한된 항원성 펩타이드가 이용되어 왔다. 실제로 이러한 면역원성 펩타이드 백신을 투여한 암 함유(tumor-bearing)에서 방어 면역성을 관찰할 수 있었다(60).

펩타이드 백신의 효과는 *in vivo*에서 비워져 있는 MHC molecules들의 APC loading 과정에 좌우된다. 그러므로 활성화 APC로의 표적화에 대한 고려 없이 펩타이드를 단순히 이용하는 것은 MHC class I의 내성을 초래하게 되며, non-professional APC로의 loading을 야기할 가능성이 크다. 실제로 어떤 펩타이드를 복강내 투여했을 때 방어 면역보다는 내성을 유발하였다. 백신 투여에 인한 종양 성장의 증가는 이와 같은 펩타이드 epitope 주입으로 유도되는 특이 내성과 밀접한 관계가 있다. 그 예로 incomplete Freund's adjuvant와 펩타이드 백신을 함께 투여하여 혈장으로 도입되었을 때 APC에 결합함으로써 costimulatory signals의 발현 없이 내성을 유도한 경우가 있었다(61). 또한, melanoma 환자에게 시험된 HLA-A2에 제한된 MAGE-3 펩타이드/Freund's incomplete adjuvant의 경우에도 MAGE-3에 특이적으로 반응하는 CTL의 유도를 *in vitro* chromium 방출 실험에서 관찰할 수 없었다(62). 그 이후 다양한 개량을 통해서 MHC class I 펩타이드를 이용한 vaccination과 CTL 유도에 관한 연구가 있었

으나 아직 큰 진전을 보이지 않고 있다.

재조합 바이러스 백신(recombinant viral vaccine): 면역성을 높이기 위해서 다양한 재조합 바이러스 백신이 시험되고 있으며(Fig. 2), 그 중에서도 recombinant vaccinia, adenovirus와 poxvirus가 암의 면역치료에 많이 이용되고 있다(63-65).

재조합 바이러스 백신에 의해서 일어나는 면역반응은 첫째, 바이러스 감염으로 야기된 세포손상의 danger signal이 골수를 활성화시켜 APC를 유도함으로써 항원에 대한 costimulatory molecule의 활성을 유도하게 한다. 둘째, 어떤 재조합 바이러스 백신은 골수에서 유도된 APC의 직접 감염과 관련되어 있어서, MHC class I 반응 과정의 endogenous 방법으로 합성된 항원들의 효과적인 처리(processing)를 일으킨다. APC에 바이러스의 직접 감염은 재조합 바이러스 백신의 수정(modification)을 유도함으로써, 항원들의 processing과 항원공여 그리고 costimulatory molecule을 발현하는 유전자들의 참여를 증가시킨다(66). 그렇지만 이러한 백신 개발의 가장 큰 장애는 이미 존재하고 있는 중화 항체에 의한 백신의 억제효과이다. 중화 항체는 교차 반응하는 바이러스(adenovirus)에 사전 노출 또는 사전 면역화에 의해서 생성된 결과이다. 그러므로 이런 중화 항체의 제거와 지금까지 노출된 적이 없는 바이러스의 백신 개발이 필요하다.

재조합 박테리아 백신(recombinant bacterial vaccine): Salmonella, BCG 그리고 *Listeria monocytogenes*와 같은 박테리아 strain들은 백신 벡터로서의 다음과 같은 두 가지 특성을 가지고 있다(67). 첫째, 위장관을 통한 감염 경로를 가지고 있기 때문에 백신의 경구 투여 가능성을 제공하고, 둘째, monocytes와 macrophages에 감염됨으로써 항원들을 professional APC로 표적화시킬 수 있다. 동물 실험에서 주목할 만한 결과를 보인 재조합 *Listeria monocytogenes* 백신의 경우, monocytes 또는 macrophages에 감염되자마자, phagolysosomes을 점령해서, phagosomal 막을 불안정화시켜 박테리아의 세포질로 전이를 가능하게 하는 listeriolysin O를 분비한다. *L. monocytogenes*의 세포질에서의 생활주기는 분비된 항원들의 phagolysosomal phase 중의 MHC class II 과정에서 뿐만 아니라 cytosolic phase 중의 MHC class I 과정에서도 효과적인 processing을 하게 한다(68). 항원 특이 T 세포 면역반응 이외에도, 재조합 *L. monocytogenes*에 의한 비특이적 면역반응에 관련된 구성 성분의 활성화 등으로 효과적인 접근을 가능하게 할 것이다.

DNA 백신(DNA vaccine): 항원 등을 백신으로 투여하면 최초에는 원하는 면역반응이 유도되지만 시간이 지남에 따라서 백신의 효력이 감소한다. 이것은 투여된 백신에 대한 항체가 점차 친화성을 갖게 되고 결국 면역반응이 유도되어 투여한 백신이 파괴되기 때문이다. 즉 더 이상

의 자극이 없다면 생체는 백신을 투여하기 전의 정상적인 면역감시 상태로 회귀하게 된다. 따라서 원하는 면역 반응을 지속적으로 유도시킬 수 있도록 항원을 안정적으로 공급하는 방법으로 암특이 항원을 코딩하는 DNA를 백신으로 이용하는 암백신이 개발되고 있다(69).

특히 recombinant DNA 기술의 진보로 암항원뿐만 아니라 면역반응을 조절하는 cytokine (70), costimulatory molecule (71) 등을 백신으로 이용할 수 있게 되면서(72), 이러한 기술의 진보는 비정상적인 성장을 억제할 수 있는 암세포 gene을 변형시키거나, 항암제에 대한 감수성

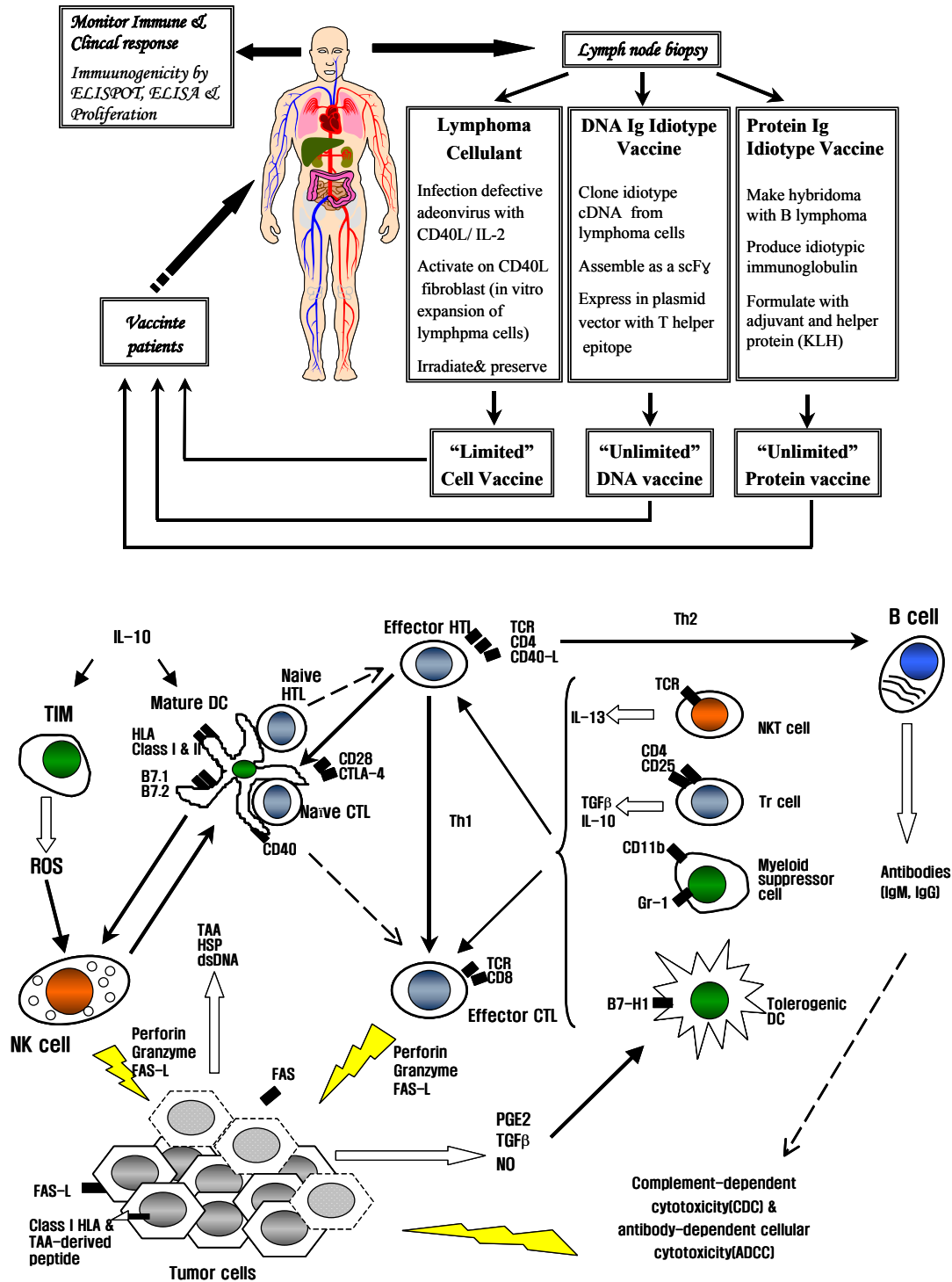


Figure 3. The strategy of anti-idiotype vaccine generation to treat lymphoma.

을 증강시키는 새로운 gene의 삽입 등에 이르러 gene therapy로 발전하고 있다. 또한 human genome project의 조기 완성으로 향후 DNA 백신과 gene therapy의 개발이 암정복의 열쇠로 작용할 것이라는 전망도 나오고 있다.

Naked DNA를 이용하는 백신은 현재 가장 유력한 차세대 백신 후보로써 연구되고 있는데, 최초의 연구에서는 influenza 핵단백질을 코드화하는 naked DNA로 vaccination했을 때 influenza 바이러스의 감염으로부터 동물을 보호할 수 있었다(73). 감염성 질환 외에도, 암항원을 코드화하는 naked DNA vaccine는 systemic tumor protection을 제공한다는 보고도 있다(74). 그렇지만 일반적으로 naked DNA 백신의 효력은 재조합 바이러스 백신보다도 감소된다. 이것은 naked DNA가 재조합 바이러스나 박테리아 백신에서와 같은 복제·증폭 능력이 없으므로, 면역계로 제시될 수 있는 항원의 양적인 제한 때문이다. 뿐만 아니라 naked DNA 백신은 생바이러스 감염 때보다도 많은 염증 또는 위험한 반응을 초래한다.

그러나 DNA 백신은 subunit이나 펩타이드 백신과는 달리 숙주 세포 안에서 항원이 생산됨으로써 CTL 반응을 유도한다는 점과 강한 Th1 면역반응을 동시에 유도한다는 장점이 최근 보고되고 있다(75). 박테리아 DNA 경우 IFN- α/β 와 IFN- γ 의 유도 및 NK 세포활성 증가와 밀접히 관련되어 면역증진에 효과가 있음이 알려졌다(76). 이후 Krieg 등은 박테리아 DNA를 여러 종류의 oligodeoxynucleotide (ODN)으로 합성하여 B세포 증식과 IgM 분비 능력을 조사하여 CpG-ODN의 면역활성 개념을 정립하였고 ODN이 methylation 되었을 때 면역증진 활성이 사라진다고 보고하였다(77). CpG-ODN은 macrophage, 수지상세포 그리고 NK 세포들을 활성화시켜 IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α 와 같은 cytokine들의 분비를 촉진시키고, costimulatory molecule이나 MHC class I과 class II의 발현을 증가시켜 Th1 면역반응을 특이적으로 유도할 수 있다(78). 또한 CpG-ODN motifs는 DNA 백신의 plasmid backbone에 삽입되어 DNA 백신의 면역조절 능력을 향상시킬 수 있으며, 이러한 경우에도 장기간 특이 Th1 면역반응이 항진되는 것으로 밝혀졌다(79).

Anti-idiotype vaccine: 어떠한 항체들은 스스로 항원으로 작용하여 면역반응을 자극한다. 즉 이러한 항체에 대한 항체가 면역반응의 조절에 중요한 역할을 하며, 이러한 항체를 anti-idiotype 항체라 한다. Anti-idiotype 항체가 항원으로 작용하기 때문에, 암환자에게 주사하면 면역계는 이에 대한 면역반응을 유발한다. 특히 모든 lymphoma 세포가 정상적인 림프구 또는 다른 정상세포에 존재하지 않는 유일한 항원 수용체(antigen receptor)를 갖고 있기 때문에, 많은 연구자들은 lymphoma에 대한 anti-idiotype 백신이 가장 좋은 치료 수단으로 주장하고 있다 (Fig. 3)(80,81). 따라서 그 동안 anti-idiotype 항체의 대량

생산에 대하여 많은 진전이 있어 왔으며, 환자에게 존재하는 암세포로부터 유래된 항원으로 간주되기 때문에 특이적인 암백신으로 작용할 수 있다.

결 론

지난 수십 년간의 암과 관련된 종양면역학의 발전에도 불구하고, 암과 면역반응과의 관계에 대한 규명은 부족하다. 특히 암의 백신요법은 아직도 제한적이며, 임상시험의 단계를 벗어나지 못하고 있다. 그러나 그 동안의 전임상 및 임상시험으로부터 얻은 결과는 체내 면역계가 여러 면역요법들에 의해 암세포 또는 종양조직에 대하여 능동적으로 변화될 수 있다는 사실이다. 이것은 어떠한 환경적 자극에 의해 자연적으로 침묵하고 있던 면역세포들이 암세포에 대항하여 효과적으로 반응하고, 내부적인 무기로 활용될 수 있다는 것을 의미한다. 최근의 종양면역학의 여러 발견들은 보다 효과적이고 적극적인이면서 특이적 면역요법(active specific immunotherapy) 전략의 발전에 박차를 가하게 하고 있으며, 다음 세대의 백신개발에 의미 있는 변화를 제공하고 있다.

특히 immunological tolerance (면역관용)에 대한 기전의 이해는 암을 제거하기 위해서는 CTL, 활성화된 T helper 세포(HTL), B 세포 등이 동시에 유기적으로 협력하여야 함은 물론이고, innate immunity와 adaptive immunity와의 상호관계에 대한 중요성을 인식하게 하고 있다. 이러한 사실들의 폭넓은 이해는 면역요법의 개발에 대한 보다 많은 방법을 제시하여 줄 것이다. 또한 수지상세포에 cytokine gene의 삽입, 백신과 다른 면역보조제의 동시투여 등 면역요법의 병용요법이 active specific immunotherapy의 여러 단점을 극복할 수 있는 방법을 제시하고 있다.

그 동안 암백신은 예방목적 또는 암절제 수술 후 재발 방지에 대하여 안정성과 유효성이 입증되어 왔으며, 현재의 백신 연구과제는 면역반응을 보다 향상시키고 이미 체내 존재하는 암세포를 줄이는 것이다. 따라서 면역보조요법의 지속적인 개발과 새로이 각광 받고 있는 수지상세포 등에 대한 보다 많은 이해가 이러한 암백신의 개발에 기여할 것이다.

참 고 문 헌

1. Martin SE, Martin WJ: Anti-tumour antibodies in normal mouse sera. *Int J Cancer* 15:658-664, 1975
2. Melero I, Bach N, Chen L: Costimulation, and ignorance of cytoytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens. *Life Sci* 60:2035-2041, 1997
3. Mocellin S, Rossi CR, Nitti D: Cancer vaccine development: on the way to break immune to malignant cells. *Exp Cell Res* 299:267-278, 2004
4. Jager E, Jager D, Knuth A: CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 18:143-150,

- 1999
5. Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A: Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 94;805-818, 2002
6. Finn OJ: Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3;630-641, 2003
7. Sette A, Fikes J: Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol* 15;461-470, 2003
8. Parajuli P, Sloan AE: Dendritic cell-based immunotherapy of malignant gliomas. *Cancer Invest* 22;405-416, 2004
9. Robinson HL: DNA vaccines: basic mechanism and immune responses (Review). *Int J Mol Med* 4;549-555, 1999
10. Disis ML, Salazar LG, Knutson KL: Peptide-based vaccines in breast cancer. *Breast Dis* 20;3-11, 2004
11. Kutzler MA, Weiner DB: Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J Clin Invest* 114;1241-1244, 2004
12. Coulie PG, van der Bruggen P: T-cell responses of vaccinated cancer patients. *Curr Opin Immunol* 15;131-137, 2003
13. Pardoll DM: Cancer vaccines. *Nat Med* 4(5 Suppl);S525-S531, 1998
14. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H: Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95;1178-1183, 1998
15. Schlecht G, Loucka J, Najar H, Sebo P, Leclerc C: Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* 173;6089-6097, 2004
16. Tuting T, Steitz J, Bruck J, Gambotto A, Steinbrink K, DeLeo AB, Robbins P, Knop J, Enk AH: Dendritic cell-based genetic immunization in mice with a recombinant adenovirus encoding murine TRP2 induces effective anti-melanoma immunity. *J Gene Med* 1;400-406, 1999
17. Blum JS, Ma C, Kovats S: Antigen-presenting cells and the selection of immunodominant epitopes. *Crit Rev Immunol* 17;411-417, 1997
18. Bricks LF: Pneumococcal vaccine: overview about the protective efficacy in different high risk groups and new progress in the development of a conjugate pneumococcal vaccine. *J Pediatr (Rio J)* 70;75-81, 1994
19. Antonia S, Mule JJ, Weber JS: Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr Opin Immunol* 16;130-136, 2004
20. Yannelli JR, Wroblewski JM: On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 23; 97-113, 2004
21. Schweighoffer T, Schmidt W, Buschle M, Birnstiel ML: Depletion of naive T cells of the peripheral lymph nodes abrogates systemic antitumor protection conferred by IL-2 secreting cancer vaccines. *Gene Ther* 3;819-824, 1996
22. Dermime S, Gilham DE, Shaw DM, Davidson EJ, Meziane el-K, Armstrong A, Hawkins RE, Stern PL: Vaccine and antibody-directed T cell tumour immunotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1704;11-35, 2004
23. Maeurer MJ, Storkus WJ, Kirkwood JM, Lotze MT: New treatment options for patients with melanoma: review of melanoma-derived T-cell epitope-based peptide vaccines. *Melanoma Res* 6;11-24, 1996
24. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P: A CASP-8 mutation recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186;785-793, 1997
25. Orme IM, Collins FM: Crossprotection against nontuberculous mycobacterial infections by *Mycobacterium tuberculosis* memory immune T lymphocytes. *J Exp Med* 163; 203-208, 1986
26. McCabe WR, Bruins SC, Craven DE, Johns M: Cross-reactive antigens: their potential for immunization-induced immunity to Gram-negative bacteria. *J Infect Dis* 136(Suppl);S161-S166, 1977
27. Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau J, Palucka AK: Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192;1535-1544, 2000
28. Luiten RM, Demotte N, Tine J, van der Bruggen P: A MAGE-A1 peptide presented to cytotoxic T lymphocytes by both HLA-B35 and HLA-A1 molecules. *Tissue Antigens* 56;77-81, 2000
29. Schultz ES, Lethe B, Cambiaso CL, Van Snick J, Chaux P, Corthals J, Heirman C, Thielemans K, Boon T, van der Bruggen P: A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 60;6272-6275, 2000
30. Van Pel A, van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethe B, van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld JC, Boon T: Genes coding for tumor antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* 145;229-250, 1995
31. Parkhurst MR, Riley JP, Robbins PF, Rosenberg SA: Induction of CD4+ Th1 lymphocytes that recognize known and novel class II MHC restricted epitopes from the melanoma antigen gp100 by stimulation with recombinant protein. *J Immunother* 27;79-91, 2004
32. Wang S, Bartido S, Yang G, Qin J, Moroi Y, Panageas KS, Lewis JJ, Houghton AN: A role for a melanosome transport signal in accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4+ T cell responses. *J Immunol* 163; 5820-5826, 1999
33. Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ: MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 280;14006-14016, 2005
34. Choi C, Kusewitt DF: Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. *Vet Pathol* 40;713-718, 2003
35. Offringa R, Vierboom MP, van der Burg SH, Erdile I, Melief CJ: p53: a potential target antigen for immunotherapy of cancer. *Ann N Y Acad Sci* 910;223-233, 2000
36. van der Burg SH, Menon AG, Redeker A, Bonnet MC, Drijfhout JW, Ikenaar RA, van de Velde CJ, Moingeon P, Kuppen PJ, Offringa R, Melief CJ: Induction of p53-specific immune responses in colorectal cancer patients receiving a recombinant ALVAC-p53 candidate vaccine. *Clin Cancer Res* 8;1019-1027, 2002
37. Liedke M, Kambach C, Kalinin V, Herbst B, Frilling A, Broelsch CE: Detection of H-ras and K-ras in tumors of gastrointestinal-pancreatic system. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115(Suppl I);S255-S259, 1998
38. Brembeck FH, Schreiber FS, Deramandt TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK: The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res* 63;2005-2009, 2003
39. Zhou BP, Li Y, Hung MC: HER-2/Neu signaling and therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Dis* 15;13-24, 2002
40. Dela Cruz JS, Lau SY, Ramirez EM, De Giovanni C, Forni

- G, Morrison SL, Penichet ML. Protein vaccination with the HER2/neu extracellular domain plus anti-HER2/neu antibody-cytokine fusion proteins induces a protective anti-HER2/neu immune response in mice. *Vaccine* 21;1317-1326, 2003
41. Blumberg BS, Larouze B, London WT, Werner B, Hesser JE, Millman I, Saimot G, Payet M: The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. *Am J Pathol* 81;669-682, 1975
 42. Davidson EJ, Faulkner RL, Sehr P, Pawlita M, Smyth LJ, Burt DJ, Tomlinson AE, Hickling J, Kitchener HC, Stern PL: Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). *Vaccine* 22;2722-2729, 2004
 43. Humphrey LJ, Boehm B, Jewell WR, Boehm OR: Immunologic response of cancer patients modified by immunization with tumor vaccine. *Ann Surg* 176;554-558, 1972
 44. Antonia S, Mule JJ, Weber JS: Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr Opin Immunol* 16;130-136, 2004
 45. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM: The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15;138-147, 2003
 46. Kaminski ER, Goddard RV, Prentice AG: Dendritic cells and their potential therapeutic role in haemato-oncological malignancy. *Leuk Lymphoma* 44;1657-1666, 2003
 47. Ohno T: Auogous cancer vaccine: a novel formulation. *Microbiol Immunol* 47;255-263, 2003
 48. Berd D: Auogous, hapten-modified vaccine as a treatment for human cancers. *Vaccine* 19;2565-2670, 2001
 49. Sondak VK, Sosman JA: Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine. *Semin Cancer Biol* 13;409-415, 2003
 50. Lunde E, Western KH, Rasmussen IB, Sandlie I, Bogen B: Efficient delivery of T cell epitopes to APC by use of MHC class II-specific T cell epitopes. *J Immunol* 168;2154-2162, 2002
 51. Nakamura M, Iwashita M, Nakamori M, Ueda K, Matsuura I, Noguchi K, Yamaue H: Dendritic cells genetically engineered to simultaneously express endogenous tumor antigen and granulocyte macrophage colony-stimulating factor elicit potent therapeutic antitumor immunity. *Clin Cancer Res* 8;2742-2749, 2002
 52. Homma S, Kikuchi T, Ishiji N, Ochiai K, Takeyama H, Saotome H, Sagawa Y, Hara E, Kufe D, Ryan JL, Ohno T, Toda G: Cancer immunotherapy by fusions of dendritic and tumour cells and rh-IL-12. *Eur J Clin Invest* 35;279-286, 2005
 53. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van Beckhoven A, Liles TM, Engleman EG, Levy R: Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99;1517-1526, 2002
 54. Rini B: Recent clinical development of dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 4;1729-1734, 2004
 55. Chang GC, Lan HC, Juang SH, Wu YC, Lee HC, Hung YM, Yang HY, Whang-Peng J, Liu KJ: A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with auogous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer* 103;763-771, 2005
 56. Sette A, Fikes J: Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol* 15;461-470, 2003
 57. Gordan JD, Vonderheide RH: Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy* 4;317-327, 2002
 58. Hakomori S: Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* 491;369-402, 2001
 59. Van Pel A, van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethe B, van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld JC, Boon T: Genes coding for tumor antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* 145;229-250, 1995
 60. Vierboom MP, Feltkamp MC, Neisig A, Drijfhout JW, ter Schegget J, Neefjes JJ, Melief CJ, Kast WM: Peptide vaccination with an anchor-replaced CTL epitope protects against human papillomavirus type 16-induced tumors expressing the wild-type epitope. *J Immunother* 21;399-408, 1998
 61. Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP, van der Voort EI, Schumacher TN, Melief CJ, Offringa R, Toes RE: CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med* 5;774-779, 1999
 62. Valmori D, Lienard D, Waanders G, Rimoldi D, Cerottini JC, Romero P: Analysis of MAGE-3-specific cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients. *Cancer Res* 57;735-741, 1997
 63. Hodge JW, Poole DJ, Aarts WM, Gomez Yafal A, Gritz L, Schlom J: Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Res* 63;7942-7949, 2003
 64. Tatsis N, Ertl HC: Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 10;616-629, 2004
 65. Essajee S, Kaufman HL: Poxvirus vaccines for cancer and HIV therapy. *Expert Opin Biol Ther* 4;575-588, 2004
 66. Restifo NP: The new vaccines: building viruses that elicit antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 8;658-663, 1996
 67. Starks H, Bruhn KW, Shen H, Barry RA, Dubensky TW, Brockstedt D, Hinrichs DJ, Higgins DE, Miller JF, Giedlin M, Bouwer HG: *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. *J Immunol* 173;420-427, 2004
 68. Mandal M, Lee KD: Listeriolysin O-liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecule antigen in vivo: enhancement of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte frequency, activity, and tumor protection. *Biochim Biophys Acta* 1563; 7-17, 2002
 69. Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M, Wu TC: Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 108;669-678, 2001
 70. Marshall JL, Gulley JL, Arlen PM, Beetham PK, Tsang KY, Slack R, Hodge JW, Doren S, Grosenbach DW, Hwang J, Fox E, Odogwu L, Park S, Panicali D, Schlom J: Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA (6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA (6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J Clin Oncol* 23;720-731, 2005
 71. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, Chui S, Niedzwiecki D, Panicali D, Schlom J, Lyerly HK: Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 11;3017-3024, 2005
 72. Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, Tanabe K, Duda R, Mentzer S, Jaklitsch M, Bueno R, Clift S, Hardy S, Neuberg D, Mulligan R, Webb I, Mihm M, Dranoff G: Vaccination with irradiated, auogous melanoma

- cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 21;3343-3350, 2003
73. Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H: Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 84;1555-1560, 1996
 74. Celiker MY, Wang M, Atsidaftos E, Liu X, Liu YE, Jiang Y, Valderrama E, Goldberg ID, Shi YE: Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* 20;4337-4343, 2001
 75. Schneeberger A, Wagner C, Zemann A, Luhrs P, Kutil R, Goos M, Stingl G, Wagner SN: CpG motifs are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines. *J Invest Derma* 123; 371-379, 2004
 76. Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T: In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res* 79;866-873, 1988
 77. Krieg AM: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20;709-760, 2002
 78. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, von Stebut E, Udey MC, Vogel JC: Bacterial DNA and CpG-containing oligodeoxynucleotides activate cutaneous dendritic cells and induce IL-12 production: implications for the augmentation of Th1 responses. *Int Arch Allergy Immunol* 118;457-461, 1999
 79. Hiraoka K, Yamamoto S, Otsuru S, Nakai S, Tamai K, Morishita R, Ogihara T, Kaneda Y: Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 173;4297-4307, 2004
 80. Bianchi A, Massaia M: Idiotypic vaccination in B-cell malignancies. *Mol Med Today* 3;435-441, 1997
 81. McCarthy H, Ottensmeier CH, Hamblin TJ, Stevenson FK: Anti-idiotypic vaccines. *Br J Haema* 123;770-781, 2003
-