



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0089341
(43) 공개일자 2014년07월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7006938
- (22) 출원일자(국제) 2012년08월16일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년03월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/051187
- (87) 국제공개번호 WO 2013/025925
 국제공개일자 2013년02월21일
- (30) 우선권주장
 13/210,696 2011년08월16일 미국(US)

- (71) 출원인
 어드박시스, 인크.
 미국 08540 뉴저지 이스트 프린스턴 컬리지 로드 305
- (72) 발명자
 샤하비 바파
 미국 19481 펜실베니아주 벨리 포지 저그 할로우 로드 200
- (74) 대리인
 유미특허법인

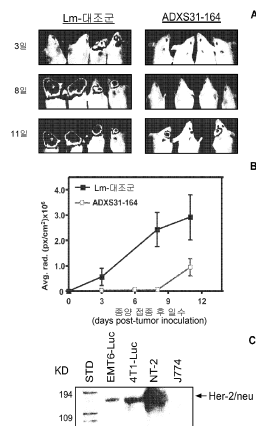
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 HER2/NEU를 과발현하는 종양의 치료에서, 회피 돌연변이의 예방을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원-발현 종양을 치료 및 백신화하며 이에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원-발현 종양의 성장 또는 암을 치료하는 예시적인 방법을 제공하며, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하되, 상기 융합 폴리펩타이드는 추가적인 아쥬반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다.

대표도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

인간이 아닌 동물에서 Her-2/neu-발현 종양의 성장 또는 암을 치료하는 방법으로서,

상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 *리스테리아(Listeria)*를 투여하는 단계를 포함하되,

상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간이 아닌 동물이 개인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 융합 폴리펩타이드를, Her2/neu-발현 종양을 가진 대상에게 투여하여, 상기 종양 내에서 회피 돌연변이 (escape mutation)를 예방하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 핵산 분자가, 상기 번역원성 조성물을 코딩하는 제1 개방형 해독틀(open reading frame)을 포함하되,

상기 핵산 분자는 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주에 존재하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 핵산 분자가, 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀을 추가로 포함하되,

상기 대사 효소가, 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 Her2/neu 키메라 항원이, 매핑된(mapped) 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17개로 포함하는, 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 핵산 분자가 *리스테리아* 게놈에 삽입되는, 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 핵산 분자가 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주 내 플라스미드에 존재하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 플라스미드가 항생제 선별의 부재 하에 상기 제조합 *리스테리아* 백신 균주에서 안정하게 유지되는, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 플라스미드가 상기 제조합 *리스테리아*에 항생제 내성을 부여하지 않는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제조합 *리스테리아* 균주가 감쇠(attenuation)되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 제조합 *리스테리아*에 ActA 병원성 유전자(virulence gene)가 결합되어 있는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 비-용혈성 LLO 단백질 또는 N-말단 분절인, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 PEST 서열인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 N-말단 ActA 분절인, 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 상기 Her2/neu 키메라 항원에 융합되는, 방법.

청구항 17

제5항에 있어서,

상기 제2 개방형 해독틀에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 아미노산 대사 효소인, 방법.

청구항 18

제5항에 있어서,

상기 제2 개방형 해독틀에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 알라닌 라세마제(racemase) 효소 또는 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소인, 방법.

청구항 19

제5항에 있어서,

상기 핵산 분자가 제3 개방형 해독틀을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 제3 개방형 해독틀에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소 또는 알라닌 라세마제 효소인, 방법.

청구항 21

제1항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아* 균주가 동물 숙주를 통해 계대배양된(passaged through), 방법.

청구항 22

제1항에 있어서,

독립적인 아쥬반트를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 아쥬반트가 과립구/대식 세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 리피드 A, 또는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항에 있어서,

상기 종양이 Her2/neu 양성 종양인, 방법.

청구항 25

제1항에 있어서,

상기 암이 Her2/neu-발현 암인, 방법.

청구항 26

제1항에 있어서,

상기 암이 골육종, 난소암, 위암 또는 중추신경계(CNS) 암인, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서,

상기 골육종 암이 개 골육종(canine osteosarcoma)인, 방법.

청구항 28

인간이 아닌 동물에서 Her-2/neu-발현 종양의 성장 또는 암을 예방하는 방법으로서,

상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 *리스테리아*를 투여하는 단계를 포함하되,

상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아쥬반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 인간이 아닌 동물이 개인, 방법.

청구항 30

제28항에 있어서,

상기 융합 폴리펩타이드를, Her2/neu-발현 종양을 가진 대상에게 투여하여, 상기 종양 내에서 회피 돌연변이를 예방하는, 방법.

청구항 31

제28항에 있어서,

상기 핵산 분자가, 상기 면역원성 조성물을 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하되,

상기 핵산 분자는 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주에 존재하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 핵산 분자가, 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀을 추가로 포함하되,

상기 대사 효소가, 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완하는, 방법.

청구항 33

제28항에 있어서,

상기 Her2/neu 키메라 항원이, 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17개로 포함하는, 방법.

청구항 34

제32항에 있어서,

상기 핵산 분자가 *리스테리아* 게놈에 삽입되는, 방법.

청구항 35

제32항에 있어서,

상기 핵산 분자가 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주 내 플라스미드에 존재하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 플라스미드가 항생제 선별의 부재 하에 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주에서 안정하게 유지되는, 방법.

청구항 37

제35항에 있어서,

상기 플라스미드가 상기 재조합 *리스테리아*에 항생제 내성을 부여하지 않는, 방법.

청구항 38

제28항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아* 균주가 감쇠되는, 방법.

청구항 39

제28항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아*에 ActA 병원성 유전자가 결합되어 있는, 방법.

청구항 40

제28항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 비-용혈성 LLO 단백질 또는 N-말단 분절인, 방법.

청구항 41

제28항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 PEST 서열인, 방법.

청구항 42

제28항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 N-말단 ActA 분절인, 방법.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 상기 Her2/neu 키메라 항원에 융합되는, 방법.

청구항 44

제32항에 있어서,

상기 제2 개방형 해독들에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 아미노산 대사 효소인, 방법.

청구항 45

제32항에 있어서,

상기 제2 개방형 해독들에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 알라닌 라세마제 효소 또는 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소인, 방법.

청구항 46

제32항에 있어서,

상기 핵산 분자가 제3 개방형 해독들을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서,

상기 제3 개방형 해독들에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소 또는 알라닌 라세마제 효소인, 방법.

청구항 48

제28항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아* 균주가 동물 숙주를 통해 계대배양된, 방법.

청구항 49

제28항에 있어서,

독립적인 아쥬반트를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서,

상기 아쥬반트가 과립구/대식 세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 리피드 A, 또는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드를 포함하는,

방법.

청구항 51

제28항에 있어서,

상기 종양이 Her2/neu 양성 종양인, 방법.

청구항 52

제28항에 있어서,

상기 암이 Her2/neu-발현 암인, 방법.

청구항 53

제28항에 있어서,

상기 암이 골육종, 난소암, 위암 또는 중추신경계(CNS) 암인, 방법.

청구항 54

제28항에 있어서,

상기 골육종 암이 개 골육종인, 방법.

청구항 55

인간이 아닌 동물에서 Her-2/neu-발현 종양의 성장 또는 암에 대해 강화된 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 *리스테리아*를 투여하는 단계를 포함하
되,

상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함하는, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서,

상기 인간이 아닌 동물이 개인, 방법.

청구항 57

제55항에 있어서,

상기 융합 폴리펩타이드를, Her2/neu-발현 종양을 가진 대상에게 투여하여, 상기 종양 내에서 회피 돌연변이를
예방하는, 방법.

청구항 58

제55항에 있어서,

상기 핵산 분자가, 상기 면역원성 조성물을 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하되,

상기 핵산 분자는 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주에 존재하는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서,

상기 핵산 분자가, 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀을 추가로 포함하되,

상기 대사 효소가, 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완하는, 방
법.

청구항 60

제55항에 있어서,

상기 Her2/neu 키메라 항원이, 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17개로 포함하는, 방법.

청구항 61

제58항에 있어서,

상기 핵산 분자가 *리스테리아* 계놈에 삽입되는, 방법.

청구항 62

제58항에 있어서,

상기 핵산 분자가 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주 내 플라스미드에 존재하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

상기 플라스미드가 항생제 선별의 부재 하에 상기 재조합 *리스테리아* 백신 균주에서 안정하게 유지되는, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서,

상기 플라스미드가 상기 재조합 *리스테리아*에 항생제 내성을 부여하지 않는, 방법.

청구항 65

제55항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아* 균주가 감쇠되는, 방법.

청구항 66

제55항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아*에 ActA 병원성 유전자가 결합되어 있는, 방법.

청구항 67

제55항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 비-용혈성 LLO 단백질 또는 N-말단 분절인, 방법.

청구항 68

제55항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 PEST 서열인, 방법.

청구항 69

제55항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 N-말단 ActA 분절인, 방법.

청구항 70

제67항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부가적인 폴리펩타이드가 상기 Her2/neu 키메라 항원에 융합되는, 방법.

청구항 71

제59항에 있어서,

상기 제2 개방형 해독틀에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 아미노산 대사 효소인, 방법.

청구항 72

제59항에 있어서,

상기 제2 개방형 해독틀에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 알라닌 라세마제 효소 또는 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소인, 방법.

청구항 73

제59항에 있어서,

상기 핵산 분자가 제3 개방형 해독틀을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서,

상기 제3 개방형 해독틀에 의해 코딩되는 상기 대사 효소가 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소 또는 알라닌 라세마제 효소인, 방법.

청구항 75

제55항에 있어서,

상기 재조합 *리스테리아* 균주가 동물 숙주를 통해 계대배양된, 방법.

청구항 76

제55항에 있어서,

독립적인 아쥬반트를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 77

제76항에 있어서,

상기 아쥬반트가 과립구/대식 세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 리피드 A, 또는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

청구항 78

제55항에 있어서,

상기 종양이 Her2/neu 양성 종양인, 방법.

청구항 79

제55항에 있어서,

상기 암이 Her2/neu-발현 암인, 방법.

청구항 80

제55항에 있어서,

상기 암이 골육종, 난소암, 위암 또는 중추신경계(CNS) 암인, 방법.

청구항 81

제55항에 있어서,

상기 골육종 암이 개 골육종인, 방법.

청구항 82

제1항, 제28항, 또는 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 Her2/neu-발현 종양에 대한 상기 면역 반응이, 상기 Her2/neu 단백질의 아우성(subdominant) 에피토프에 대한 면역 반응을 포함하는, 방법.

명세서

기술분야

[0001]

관련 출원에 대한 교차-참조

[0002]

본 출원은 2011년 8월 16일에 출원된 미국 특허 출원 시리얼 번호 제13/210,696 호를 우선권으로 주장하며, 이는 2010년 11월 12일에 출원된 코-펜딩(co-pending) 중인 미국 특허 출원 시리얼 번호 제12/945,386 호의 일부 계속출원이며, 이는 2009년 11월 11일에 출원된 미국 가출원 시리얼 번호 제61/260,277 호의 이득을 주장한다. 이들 출원은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003]

본 발명은 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원을 발현하는 종양을 치료 및 백신화하고, 이에 대한 면역 반응을 유도하기 위한, 조성물 및 방법을 제공한다.

배경기술

[0004]

Her-2/neu(이하 "Her-2"로 지칭됨)는 티로신 키나제의 외피 성장 인자 수용체(EGFR) 패밀리의 구성원인 185 kDa 당단백질로서, 세포 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 세포내 도메인, 막관통 도메인, 및 세포외 도메인으로 이루어진다(Bargmann CI et al, Nature 319: 226, 1986; King CR et al, Science 229: 974, 1985). 인간에서, HER2 항원은 모든 유방암들 중 25% 내지 40%에서 과발현되어 있으며, 또한 많은 난소암, 폐암, 췌장암, 뇌암, 및 위장관암에서 과발현되어있다. Her-2의 과발현은 조절되지 않은 세포 성장 및 신호전달과 관련이 있으며, 이는 둘 다 종양의 발병에 기여한다. Her-2를 과발현하는 암에 걸린 환자의 경우, Her-2에 대한 체액성 반응, CD8+ T 세포 반응, 및 CD4+ T 세포 반응이 검출되지만, 이에 대한 관용성이 나타난다.

[0005]

*리스테리아 모노사이토제네스(Listeria monocytogenes)*는 항원 제시 세포를 주로 감염시키고, 이들 세포의 세포질에서 생존을 위해 조정된, 세포내 병원체이다. 대식 세포와 같은 숙주 세포는 *리스테리아 모노사이토제네스*를 능동적으로 식균작용하며, 상기 박테리아 중 대부분이 포식리소솜에서 분해된다. 박테리아 중 일부는 헤모리신(hemolysin), 리스테리오리신 O(Listeriolysin, LLO)의 작용을 통해 포식소체 막을 관통함으로써, 숙주 세포기질 내로 도망간다. 세포기질에 존재하는 경우, *리스테리아 모노사이토제네스*는 숙주 액틴을 중합하여, 이 세포에서 저 세포로 직접 통과하며, 더 나아가 숙주 면역계를 회피하여, *리스테리아 모노사이토제네스*에 대해 미미한 항체 반응을 유도할 수 있다.

[0006]

단백질의 세포외 도메인 및 세포내 도메인으로부터 인간 Her2/neu 단백질의 작은 분절들을 독립적으로 발현하는, *리스테리아 모노사이토제네스(Lm)*를 기재로 하는 다수의 백신의 구축 및 개발이 보고되어 있다. Her2/neu는, Her2/neu 분절의 생성을 필요로 하는 *Lm*에 피트(fit)되기에는 너무 크다. 이들 백신은 모두, FVB/N 마우스에서 이미 구축된 종양을 억제하는 데 있어서 면역원성이며 효능이 있으며, Her2/neu-발현 유전자 도입 동물에서 자발적인 유방 종양의 발병을 지연시키는 것으로 나타났다. 이러한 예비 실험들에서 수득한 고무적인 결과들은, Her2/neu 자가-항원에 대한 관용성을 망가뜨릴 수 있는 재조합 *리스테리아*-Her2/neu 백신이 제조될 수 있음을 제안하였다. 그러나, 지금까지 개발된 *리스테리아*-Her2/neu 백신은, 클로람페니콜의 존재 하에 재조합 박테리아의 시험관 내 선별을 위해, 항생제 마커(*cat*)를 사용하는 감쇠된 *리스테리아* 플랫폼(platform)을 토대로 한 것이었다. 임상적으로 사용되기 위해서는, 감쇠율이 높은 것 뿐만 아니라, 항생제에 대한 내성이 존재하지 않는 것도 중요하다.

[0007]

개 골육종(canine osteosarcoma)은, 10살이 넘는 큰 개의 주된 죽음의 원인으로, 긴 (다리) 뼈에 생기는 암이다. 표준 치료는 진단 직후 절단한 다음, 화학치료를 수행하는 것이다. 그러나, 불가피하게도, 이 암은 폐에 전이된다. 치료를 받지 않은 개의 경우 생존기간이 6개월인데 비해, 화학치료를 이용하면, 개는 약 12개월간 생존한다. HER2 항원은 골육종 중 50% 이하에서 존재한다.

[0008] 종양이 회피 돌연변이(escape mutation)를 통해 숙주 면역 반응을 회피한다는 것은 충분히 입증되어 있으며, 이는 종양 치료법에서 주 방해물이다. 따라서, 치료 효능은 높으면서 회피 돌연변이를 유도하지 않는 백신을 개발하는 것이 요구되고 있다. 전술한 각각의 분절 백신에서 활성을 밝혀낸 후, 본 발명은 각각의 독립적인 분절들부터의 활성 부위를 모두 삽입하여, 백신 제조에 사용될 새로운 면역원성 조성물을 제공한다. 더욱이, 동물 시장에서는 안전하고 효과적인 암 치료법에 대한 요구가 높으며 충족되지 않고 있다. 본 발명은, 명확한 감쇠 메커니즘을 가지며 항생제 선별 마커를 포함하지 않는, *LmddA* 백신 벡터를 사용하여 제조된 재조합 *리스테리아*-Her2/neu 백신(ADX31-164)을 제공함으로써, 이러한 요구를 충족한다. 이러한 키메라 항원을 사용할 경우, 회피 돌연변이가 유도되지 않으며, 이는 종양이 이러한 새로운 항원을 이용한 치료에 대해 치료 효능이 있는 반응으로부터 변형되지 않음을 나타낸다.

발명의 내용

[0009] 일 실시 양태에서, 본원에 제공되는 발명은 융합 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함하며, 상기 융합 단백질을, Her2/neu-발현 종양을 가진 대상에게 투여하면 돌연변이 회피(mutation avoidance)가 유발된다. 다른 실시 양태에서, 돌연변이 회피는 에피토프 확산(epitope spreading)으로 인한 것이다. 보다 다른 실시 양태에서, 돌연변이 회피는 항원의 키메라 특성으로 인한 것이다.

[0010] 다른 실시 양태에서, 본원에 제공되는 발명은 핵산 분자를 포함하는 재조합 *리스테리아* 백신 균주에 관한 것으로, 다른 실시 양태에서, 상기 핵산 분자는 폴리펩타이드를 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 Her2/neu 키메라 항원을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀을 추가로 포함하되, 상기 대사 효소는 재조합 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완한다.

[0011] 일 실시 양태에서, 본원에 제공되는 발명은 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원-발현 종양의 성장 또는 암을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 *리스테리아*를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다.

[0012] 다른 실시 양태에서, 본원에 제공되는 발명은 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원-발현 종양의 성장 또는 암을 예방하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 *리스테리아*를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다.

[0013] 일 실시 양태에서, 본원에 제공되는 발명은 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원-발현 종양의 성장 또는 암에 대한 강화된 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 *리스테리아*를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0014] **도 1.** ADXS31-164의 구조를 보여준다. (A) *LmddA* 균주에서 염색체 *dal-dat* 결실의 보완을 위한 구성적(constitutive) *리스테리아* p60 프로모터의 조절 하에, *바실러스 서브틸리스(bacillus subtilis)* *dal* 유전자를 가지는, pAdv164의 플라스미드 맵(map). 이는 또한, 3개의 분절의 Her2/neu: EC1(aa 40-170), EC2(aa 359-518) 및 ICI(aa 679-808)의 직접적인 융합에 의해 구축된, 키메라 인간 Her2/neu 유전자에 절단된(truncated) LLO₍₁₋₄₄₁₎를 융합하는 것을 포함한다. (B) tLLO-ChHer2의 발현 및 검출은, TCA 침전된 세포 배양 상층액을 항-LLO 항체를 이용해 블롯팅(blotting)하여 웨스턴 블롯으로 분석함으로써, *Lm*-LLO-ChHer2(*Lm*-LLO-138) 및 *LmddA*-LLO-ChHer2(ADX31-164)에서 검출하였다. 약 104 KD의 차별적인 밴드는 tLLO-ChHer2에 상응한다. 내인성 LLO는 58 KD 밴드로서 검출된다. *리스테리아* 대조군은 ChHer2 발현을 포함하지 않았다.

도 2. ADXS31-164의 면역원성 특성을 보여준다. (A) 면역화된 마우스의 비장세포에서 Her2/neu *리스테리아*-기제의 백신에 의해 유도된 세포독성 T 세포의 반응은, NT-2 세포를 자극물질로 사용하고 3T3/neu 세포를 표적으로 사용하여 시험하였다. *Lm*-대조군은 모든 면에서 동일하지만 관련이 없는(irrelevant) 항원(HPV16-E7)을 발현하는 *LmddA* 배경을 토대로 하였다. (B) 면역화된 FVB/N 마우스의 비장세포에 의해 세포 배양 배지로 분비되는 IFN- γ 는, 미토마이신 C가 처리된 NT-2 세포로 시험관 내 자극한 지 24시간 후에, ELISA에 의해 측정하였다.

(C) 단백질의 서로 다른 영역의 펩타이드와의 시험관 내 인큐베이션에 반응하는, 키메라 백신으로 면역화된 HLA-A2 유전자도입 마우스의 비장 세포에 의한 IFN- γ 분비를 측정하였다. 제조합 ChHer2 단백질은 양성 대조군으로 사용되었으며, 관련이 없는 펩타이드를 포함하는 군 또는 펩타이드를 포함하지 않는 군은, 도면에 대한 설명에 열거된 바와 같이 음성 대조군을 이루었다. IFN- γ 분비는, 코-인큐베이션한 지 72시간 후에 수집한 세포 배양 상층액을 사용하여 ELISA 분석법으로 검출하였다. 각각의 데이터 지점은 3회의 중복 데이터의 평균 \pm 표준 편차를 나타내었다. * P 값 < 0.001.

도 3. 리스테리아-ChHer2/neu 백신에 대한 종양 예방 연구를 보여준다. Her2/neu 유전자도입 마우스에, 제조합 리스테리아-ChHer2 또는 대조군인 리스테리아 백신 각각을 6회 주입하였다. 면역화는 6주령제에 시작하였으며, 21주까지 3주마다 계속하였다. 종양의 외양은 매주 모니터링하였으며, 종양이 없는 마우스의 %로서 표현하였다. * p<0.05, N = 군 당 9마리.

도 4. 비장에서 Treg의 %에 대한, LmddA-LL0-ChHer2(ADXS31-164)의 면역화의 효과를 보여준다. FVB/N 마우스에, 1×10^6 개의 NT-2 세포를 피하 접종하고, 1주 간격으로 각각의 백신으로 3회 면역화하였다. 제2 면역화를 한 후 7일째에 비장을 수집하였다. 면역 세포를 분리한 후, 항 CD3, CD4, CD25 및 FoxP3 항체에 의해 Treg를 검출하기 위해 이들을 염색하였으며, 대표적인 실험에서의 Treg의 도트-플롯은 CD25⁺/FoxP3⁺ T 세포의 빈도를 보여주며, 이는 서로 다른 처리군에 대한 총 CD3⁺ 또는 CD3⁺CD4⁺ T 세포의 %로서 표현된다.

도 5. NT-2 종양에서 종양을 침윤하는 Treg의 %에 대해 LmddA-LL0-ChHer2(ADXS31-164)를 이용한 면역화가 미치는 효과를 보여준다. FVB/N 마우스에, 1×10^6 개의 NT-2 세포를 피하 접종하고, 1주 간격으로 각각의 백신으로 3회 면역화하였다. 제2 면역화를 한 후 7일째에 종양을 수집하였다. 면역 세포를 분리한 후, 항 CD3, CD4, CD25 및 FoxP3 항체에 의해 Treg를 검출하기 위해 이들을 염색하였다. (A). 대표적인 실험에서의 Treg의 도트-플롯. (B). CD25⁺/FoxP3⁺ T 세포의 빈도로서, 서로 다른 처리군에 대한 총 CD3⁺ 또는 CD3⁺CD4⁺ T 세포(좌측 패널), 및 종양내 CD8/Treg 비율(우측 패널)을 %로서 표현한다. 데이터는 2개의 독립적인 실험에서 수득한 평균 \pm SEM으로 나타난다.

도 6. LmddA-LL0-ChHer2(ADXS31-164)를 이용한 백신화가 뇌에서 유방암 세포주의 성장을 지연시킬 수 있음을 보여준다. Balb/c 마우스를, ADXS31-164 또는 대조군인 리스테리아 백신으로 2회 면역화하였다. EMT6-Luc 세포(5,000개)를 마취된 마우스에 두개내로 주입하였다. (A) 마우스의 생체의 촬영은 Xenogen X-100 CCD 카메라를 사용해 지시된 날짜에 수행하였다. (B) 픽셀 강도는 표면적 cm² 당 초(second) 당 광자(photon)의 수로 나타내었으며; 이는 평균적인 레이디언스(average radiance)로 나타난다. (C) EMT6-Luc 세포, 4T1-Luc 및 NT-2 세포주에 의한 Her2/neu의 발현을 항-Her2/neu 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검출하였다. 쥐과 대식 세포 유사 세포주인 J774.A2 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 일 실시 양태에서, 돌연변이 회피를 유발하면서도, Her2-neu 항원-발현 종양을 예방, 치료 및 백신화하고, Her2-neu 항원의 아우성(sub-dominant) 에피토프에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 돌연변이 회피는 에피토프 확산으로 인한 것이다. 보다 다른 실시 양태에서, 돌연변이 회피는 항원의 키메라 특성으로 인한 것이다.
- [0016] 다른 실시 양태에서, 융합 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함하며, Her2/neu-발현 종양을 가진 대상에게 상기 융합 단백질을 투여하면, 상기 종양에서 회피 돌연변이가 방지된다. 다른 실시 양태에서, 면역원성 조성물을 포함하는 제조합 리스테리아 백신 균주를 제공한다.
- [0017] 일 실시 양태에서, 인간이 아닌 동물에서 Her2/neu 항원-발현 종양의 성장 또는 암에 대해 강화된 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 제조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하되, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아주반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다.
- [0018] 다른 실시 양태에서, 인간이 아닌 동물에서 Her-2/neu-발현 종양의 성장 또는 암을 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 제조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하되,

상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다.

- [0019] 일 실시 양태에서, 인간이 아닌 동물에서 Her-2/neu-발현 종양의 성장 또는 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 *리스테리아*를 투여하는 단계를 포함하되, 상기 융합 폴리펩타이드는 부가적인 아류반트 폴리펩타이드에 융합된 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 인간이 아닌 동물은 개과 동물(canine)이다. 보다 다른 실시 양태에서, 상기 개과 동물은 개이다.
- [0020] 일 실시 양태에서, 핵산 분자를 포함하는 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 제공하며, 상기 핵산 분자는 폴리펩타이드를 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 Her2/neu 키메라 항원을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀을 추가로 포함하되, 상기 대사 효소는 재조합 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완한다. 다른 실시 양태에서, 재조합 *리스테리아* 백신 균주는 대사 효소를 코딩하는 제3 개방형 해독틀을 포함하는 핵산 분자를 추가로 포함하되, 상기 대사 효소는 재조합 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완한다.
- [0021] 다른 실시 양태에서, 핵산 분자를 포함하는 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 제공하며, 상기 핵산 분자는 폴리펩타이드를 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 Her2/neu 키메라 항원을 포함하며, 상기 핵산 분자는, 각각이 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀 및 제3 개방형 해독틀을 추가로 포함하되, 상기 대사 효소는 상기 재조합 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완한다. 일 실시 양태에서, 핵산 분자는 *리스테리아* 게놈에 삽입된다. 다른 실시 양태에서, 핵산 분자는 재조합 *리스테리아* 백신 균주 내 플라스미드에 존재한다. 보다 다른 실시 양태에서, 상기 플라스미드는 항생제 선별의 부재 하에 재조합 *리스테리아* 백신 균주에서 안정하게 유지된다. 다른 실시 양태에서, 상기 플라스미드는 재조합 *리스테리아*에 항생제 내성을 부여하지 않는다. 다른 실시 양태에서, 재조합 *리스테리아* 균주는 감쇠된다(attenuated). 다른 실시 양태에서, 재조합 *리스테리아*는 감쇠된 영양요구성 균주이다. 다른 실시 양태에서, 외래 항원의 발현이, 본 발명의 것과 같은 박테리아에 가하는 높은 대사 부담(metabolic burden)이 또한, 중요한 감쇠 메커니즘이다.
- [0022] 일 실시 양태에서, 감쇠된 균주는 *LmddA*이다. 다른 실시 양태에서, 이러한 균주는, *리스테리아*-기재의 백신이 가지는 고유한 특성인, 강한 아류반트 효과를 발휘한다. 이러한 아류반트 효과가 나타나는 일례는, 관련이 없는 *리스테리아* 또는 ADXS-31-164 백신에 의해 종양내 Treg의 수가 5-배 감소한 것이다(본원의 도 5 참조). 다른 실시 양태에서, 관련이 없는 항원(HPV16 E7)을 발현하는 *LmddA* 박터는 또한, 종양 내 Treg의 빈도가 상당히 감소한 것과도 관련이 있으며, 이는 아마도 선천성 면역 반응의 결과일 것이다.
- [0023] 일 실시 양태에서, 본 발명은 her-2-키메라를 클로닝하기 위한 핵산 서열을 제공한다(본원 실시예의 표 1 참조).
- [0024] Her-2/neu 키메라 구축물은 SOEing PCR 방법에 의한 직접 융합에 의해 생성되었으며, 각각은 hHer-2/neu 절편을 주형으로 분리한다. 프라이머는 표 2에 나타나 있다(본원 실시예 참조).
- [0025] 일 실시 양태에서, *LmddA*-LLO-ChHer2(ADXS31-164)는 본원에서 제공되는 실시예에 따라 생성된다. 일 실시 양태에서, 키메라 Her2 유전자(ChHer2)는 XhoI 및 SpeI 제한 효소를 사용해 pAdv138로부터 절단되고, *Lmdd* 서플렉스 벡터인 pAdv134에서 LLO의 절단된, 비-용혈성 분절과 함께 프레임(frame) 내에서 클로닝된다. 다른 실시 양태에서, 인서트(insert), LLO 및 *hly* 프로모터의 서열은 DNA 서열 분석에 의해 확인된다. 그런 다음, 다른 실시 양태에서, 이 플라스미드는 일렉트로-컴피턴트(electro-competent) *actA*, *dal*, *dat* 돌연변이체 *리스테리아* 모노사이토제네스 균주, *LmddA*에 전기천공되고, 양성 클론들은 스트렙토마이신(250 µg/ml)을 포함하는 뇌 심장 침출(Brain Heart infusion, BHI) 한천 플레이트 상에서 선별된다. 다른 실시 양태에서, hHer2/neu(Lm-hHer2) 분절을 발현하는 유사한 *리스테리아* 균주들이 비교용으로 사용되었다. 다른 실시 양태에서, 면역계에 대한, *리스테리아*의 항원 독립적인 효과를 설명하기 위해, 관련이 없는 *리스테리아* 구축물(*Lm*-대조군)이 포함된다. 다른 실시 양태에서, *Lm*-대조군은 *LmddA*-LLO-ChHer2(ADXS31-164)와 동일한 *리스테리아* 플랫폼을 토대로 하지만, HPV16-E7 또는 NY-ESO-1과 같은 서로 다른 항원을 발현하였다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아* 유래의 융합 단백질의 발현 및 분비는 면역블롯, RNA 블롯, 면역형광법 등을 포함하나 이로 한정되지 않는 당해 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 시험 및 확인된다. 다른 실시 양태에서, 각각의 구축물은 생체 내에서 2회 계대배양된다(본원 실시예 참조).
- [0026] 일 실시 양태에서, 감쇠된 영양요구성 *리스테리아* 백신 균주 *LmddA*-LLO- ChHer2(ADXS31-164) 균주는, 병원성 유

전자 *actA*의 결실로 인해 감쇠되는 리스테리아 백신 벡터를 토대로 하며, *dal* 유전자의 보완에 의해 생체내 및 시험관내에서 Her2/neu를 발현하는 플라스미드를 가진다. 일 실시 양태에서, ADXS31-164는 리스테리오리신 O(LLO)의 맨처음 441개 아미노산에 융합된 키메라 Her2/neu 단백질을 발현하고 분비한다. 다른 실시 양태에서, 상기 구축물은, 당해 기술분야에 알려진 적절한 프로모터 및 신호 서열 또는 신호 펩타이드를 사용하여, 융합 단백질을 발현 및 분비할 수 있게 한다. 이들 프로모터 및 신호 서열 중 일부로는, *리스테리아 actA* 프로모터 및 신호 서열, *hly* 프로모터 및 신호 서열, p60 프로모터 및 당해 기술분야에 알려진 다른 프로모터 및 신호 서열을 포함하나, 이로 한정되지 않으며, 이중 일부는 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 삽입된 미국 특허 제 5,830,702 호에 기술되어 있다.

[0027] 일 실시 양태에서, ADXS31-164는, 유전자도입 동물에서 HER2/neu에 대한 관용성을 망가뜨리는 능력을 가진, 강한 항원 특이적 항-종양 반응을 발휘한다(실시예 2 참조). 다른 실시 양태에서, ADXS31-164는, 표적화된 항원의 서로 다른 도메인에 위치하는 인간 에피토프에 대한 항-Her2/neu 특이적 면역 반응을 유도할 수 있다(실시예 2 참조). 다른 실시 양태에서, ADXS31-164 균주는, 매우 감쇠되며, 면역화된 마우스의 비장으로부터 보다 신속하게 제거되기 때문에 이전의 *리스테리아* 백신 제제보다 더 양호한 안정성 프로파일을 가진다. 다른 실시 양태에서, ADXS31-164는 *Lm*-LLO-ChHer2보다 더 감쇠되지만, Her2/neu 유전자도입 동물에서 자발적인 유방 종양의 발병을 예방하는 데는 더 효능이 있다(실시예 3 참조).

[0028] 다른 실시 양태에서, ADXS31-164는 *Lm*-LLO-ChHer2보다 유전자도입 동물에서 종양의 발병을 더 지연시키며, 이러한 백신의 항생제 내성이면서 보다 병원성인 버전을 제공한다(도 3 참조). 다른 실시 양태에서, ADXS31-164 균주는 매우 면역원성이어서, HER2/neu 자가-항원에 대한 관용성을 망가뜨리고, Her2/neu 유전자도입 동물에서 종양의 형성을 예방할 수 있다. 다른 실시 양태에서, ADXS31-164는 종양내 T 조절 세포(Treg)를 상당히 감소시킨다(본원 실시예 5 참조). 다른 실시 양태에서, *LmddA* 백신으로 처리된 종양에서 Treg의 빈도가 낮으면, 종양내 CD8/Treg 비율이 증가하고, 이는 *LmddA* 백신을 이용해 면역화한 후, 보다 선호할만한 종양의 미세환경이 수득될 수 있음을 제안한다(본원 실시예 5 참조). 다른 실시 양태에서, 이러한 키메라 항원을 사용할 경우, 회피 돌연변이가 발생하지 않으며, 이는, 종양이 이러한 새로운 항원을 이용한 치료에 대해 치료 효능이 있는 반응으로부터 변형되지 않음을 나타낸다(본원 실시예 6 참조). 다른 실시 양태에서, ADXS31-164를 이용한 주변부 면역화(peripheral immunization)는 뇌에서 전이성 유방암 세포주의 성장을 지연시킨다(본원 실시예 7 참조). 다른 실시 양태에서, ADXS31-164를 주변부에 투여하면 이는 중추신경계에 도달하며, *LmddA*-기재의 백신이 CNS 종양의 잠재적인 치료법을 제공함을 나타낸다(본원 실시예 7 참조).

[0029] 개 골육종은 10살이 넘는 큰 개의 주된 죽음의 원인으로, 긴 (다리) 뼈에 생기는 암이다. 표준 치료는 진단 직후 절단한 다음, 화학치료를 수행하는 것이다. 그러나, 불가피하게도, 이 암은 폐에 전이된다. 치료를 받지 않은 개의 경우 생존기간이 6개월 내지 12개월인데 비해, 화학치료를 이용하면, 개는 약 18개월간 생존한다. HER2 항원은 골육종 중 50% 이하에서 존재하는 것으로 생각된다. 일 실시 양태에서, 본원의 백신인 ADXS31-164는 이러한 항원을 발현하는 세포를 면역학적으로 공격하여, 인간 유방암을 치료한다.

[0030] 조직학적 검사에 의해 골육종을 진단받은 개들은, 악성 세포에 의해 HER2/neu가 발현된다는 증거를 보여준다. 따라서, 일 실시 양태에서, 개 골육종의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 골육종에 걸린 개에게 ADXS31-164 및 아쥬반트를 포함하는 백신 조성물을 투여하여, 개 골육종을 치료하는 단계를 포함한다(본원 실시예 8 참조). 다른 실시 양태에서, 개 골육종의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 ADXS31-164 및 아쥬반트로 이루어진 백신 조성물을 골육종에 걸린 개에게 투여하는 단계를 포함하여, 개 골육종을 치료하는 단계를 포함한다(본원 실시예 8 참조). 다른 실시 양태에서, 개 골육종의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 골육종에 걸린 개에게 ADXS31-164로 이루어진 백신 조성물을 투여하여, 개 골육종을 치료하는 단계를 포함한다(본원 실시예 8 참조).

[0031] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 백신은 정맥내, 복강내, 근육내, 경구, 비내 등을 비롯하여 당해 기술분야에 알려져 있으며 당해 기술분야의 당업자가 이해할 만한 여러 가지 방법을 이용하여 개에게 투여된다. 다른 실시 양태에서, 상기 백신은 개의 혀의 기저 세포 또는 그 부근에 백신을 전달하는 방식으로 투여된다.

[0032] 다른 실시 양태에서, 투여는 단일 투여일 수 있거나, 또는 다중의 부스터 투여량이 여러 가지 시간 간격으로 투여되어, 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 강아지에게 투여되는 경우, 전형적인 투여 섭생은 예를 들어, 2주령 내지 3주령제에 처음 투여되며, 4주 및 6주제에 부스터 투여량이 투여될 것이다. 다른 실시 양태에서, 투여는 예방적인 것으로, 즉, 종양의 성장이 발생하기 전이거나 또는 발생하기 쉬워지기 전에 이루어지지만, 발생 이후에 이루어질 수도 있는데, 즉, 치료적인 것으로, 예를 들어, 종양 또는 암성 성장과 관련된 질환의 증후가 발생한 후에 투여될 수도 있다.

- [0033] 일 실시 양태에서, *Lm*-LL0-ChHer2 균주는 *Lm*-LL0-138이다.
- [0034] 일 실시 양태에서, 키메라 항원을 발현하는, 재조합의, 감소된 항생제-무함유 *리스테리아*는 본원에서 예시된 바와 같이, 암 또는 고형 종양을 예방하고 치료하는 데 유용하다. 다른 실시 양태에서, 상기 종양은 Her2/neu 양성 종양이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 Her2/neu-발현 암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 유방암, 중추신경계(CNS) 암, 두경부암, 골육종, 개 골육종, 또는 당해 기술분야에 알려진 암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 종양은 골종양, 유방 종양, 두경부 종양, 또는 당해 기술분야에 공지된 기타 항원-발현 종양이다. 다른 실시 양태에서, 키메라 Her2/neu를 발현하는 재조합 *리스테리아*는 Her2/neu를 과발현하는 고형 종양의 치료를 위한 치료용 백신으로서 유용하다. 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 Her2/neu 키메라 항원은 Her2/neu-발현 종양을 치료하고, 이의 회피 돌연변이를 예방하는 데 유용하다. 다른 실시 양태에서, 용어 "회피 돌연변이"는 치료에 대한 치료 효능이 있는 반응으로부터 벗어나려는, 종양의 돌연변이를 지칭한다.
- [0035] 일 실시 양태에서, 면역원성 조성물을 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하는 핵산 분자를 제공하되, 상기 핵산 분자는 재조합 *리스테리아* 백신 균주에 존재한다. 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 핵산 분자는 *리스테리아*를 형질전환시켜서 재조합 *리스테리아*를 제공하는 데 사용된다. 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 핵산에 병원성 유전자가 결합되어 있다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아* 게놈에 삽입된 핵산 분자는 비-기능성의 병원성 유전자를 가진다. 다른 실시 양태에서, 상기 병원성 유전자는 재조합 *리스테리아*에 돌연변이되어 있다. 보다 다른 실시 양태에서, 상기 핵산 분자는 *리스테리아* 게놈에 존재하는 내인성 유전자를 불활성화시키는 데 사용된다. 보다 다른 실시 양태에서, 병원성 유전자는 ActA 유전자이다. 다른 실시 양태에서, 상기 병원성 유전자는 PrfA 유전자이다. 당해 기술분야의 당업자가 이해하듯이, 병원성 유전자는, 재조합 *리스테리아*에서의 병원성과 관련이 있는 당해 기술분야에 알려진 유전자일 수 있다.
- [0036] 일 실시 양태에서, 대사 유전자, 병원성 유전자 등은 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있다. 다른 실시 양태에서, 대사 유전자, 병원성 유전자 등은 상기 염색체, 및 *리스테리아* 균주의 에피솜 유전적 구성원(episomal genetic element)에 결합되어 있다. 다른 실시 양태에서, 대사 유전자, 병원성 유전자 등은 병원성 균주의 게놈에 결합되어 있다. 일 실시 양태에서, 병원성 유전자는 상기 염색체에서 돌연변이된다. 다른 실시 양태에서, 상기 병원성 유전자는 상기 염색체로부터 결실된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0037] 일 실시 양태에서, 대사 유전자, 병원성 유전자 등은 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있다. 다른 실시 양태에서, 대사 유전자, 병원성 유전자 등은 상기 염색체, 및 *리스테리아* 균주의 에피솜 유전적 구성원에 결합되어 있다. 다른 실시 양태에서, 대사 유전자, 병원성 유전자 등은 병원성 균주의 게놈에 결합되어 있다. 일 실시 양태에서, 병원성 유전자는 상기 염색체에서 돌연변이된다. 다른 실시 양태에서, 상기 병원성 유전자는 상기 염색체로부터 결실된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0038] 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 핵산 및 플라스미드는 재조합 *리스테리아*에 대해 항생제 내성을 부여하지 않는다.
- [0039] 다른 실시 양태에서, "핵산 분자"는 플라스미드를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 삽입 벡터를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 삽입 벡터를 포함하는 플라스미드를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 삽입 벡터는 부위-특이적 삽입 벡터이다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 핵산 분자는 당해 기술분야에 알려진 임의의 유형의 뉴클레오타이드로 이루어진다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0040] 다른 실시 양태에서, "대사 효소"는 숙주 박테리아가 요구하는 영양소의 합성에 관여하는 효소를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 숙주 박테리아가 요구하는 영양소의 합성에 필요한 효소를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 숙주 박테리아가 이용하는 영양소의 합성에 관여하는 효소를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 숙주 박테리아의 성장이 지속되는 데 요구되는 영양소의 합성에 관여하는 효소를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 효소는 영양소의 합성에 필요하다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0041] 다른 실시 양태에서, "안정하게 유지되는"은, 10세대 동안 선별(예를 들어, 항생제 선별)의 부재 하에, 핵산 분자 또는 플라스미드가, 검출가능한 손실이 없이 유지되는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 15세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 20세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 25세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 30세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 40세대이다. 다른 실시 양태에

서, 상기 기간은 50세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 60세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 80세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 100세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 150세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 200세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 300세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 500세대이다. 다른 실시 양태에서, 상기 기간은 보다 많은 세대이다. 다른 실시 양태에서, 핵산 분자 또는 플라스미드는 시험관 내에서(예를 들어, 배양액 내에서) 안정하게 유지된다. 다른 실시 양태에서, 핵산 분자 또는 플라스미드는 생체내에서 안정하게 유지된다. 다른 실시 양태에서, 핵산 분자 또는 플라스미드는 시험관 내 및 생체내 모두에서 안정하게 유지된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0042] 일 실시 양태에서, 본 발명은 항원을 발현하는 재조합 *리스테리아* 균주를 제공한다. 본 발명은 또한, Her-2 키메라 단백질 또는 이의 분절에 융합된 리스테리오리신(LL0) 단백질 분절 또는 PEST 펩타이드 또는 N-말단 ActA 분절을 포함하는 재조합 펩타이드, 이를 포함하는 백신 및 면역원성 조성물, 및 이를 포함하는, Her-2-발현 종양을 치료 및 백신화하고, 이에 대한 항-Her-2 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0043] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 *리스테리아* 균주는 동물 숙주를 통해 계대배양되었다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 백신 벡터로서의 상기 균주의 효능을 최대화한다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 *리스테리아* 균주의 면역원성을 안정화한다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 *리스테리아* 균주의 병원성을 안정화한다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 *리스테리아* 균주의 면역원성을 증가시킨다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 *리스테리아* 균주의 병원성을 증가시킨다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 *리스테리아* 균주의 불안정한 아균주(substrain)를 제거한다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 *리스테리아* 균주의 불안정한 아균주가 만연되는 것을 감소시킨다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아* 균주는 항원-함유 재조합 펩타이드를 코딩하는 유전자의 게놈 삽입(genomic integration)을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, *리스테리아* 균주는 항원-함유 재조합 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 가진다. 다른 실시 양태에서, 계대배양은 당해 기술분야에 알려진 다른 방법에 의해 수행된다.

[0044] 일 실시 양태에서, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 a) 비-용혈성 LL0 단백질 또는 N-말단 분절, b) PEST 서열, 또는 c) N-말단 ActA 분절로 이루어진 균으로부터 선택되는 부가적인 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질이며, 상기 부가적인 폴리펩타이드는 Her2/neu 키메라 항원에 융합된다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 작용성이다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드의 분절은 면역원성이다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 면역원성이다.

[0045] 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 Her2/neu 키메라 항원에 융합된 비-용혈성 LL0 단백질 또는 N-말단 분절을 포함하는 융합 단백질이다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질은 *리스테리아* 유기체 유래의 ActA 서열을 포함한다. ActA 단백질 및 이의 분절은 LL0와 유사한 방식으로 항원 제시 및 면역성을 증가시킨다.

[0046] 본 발명의 방법 및 조성물의 다른 실시 양태에서, 융합 단백질은 Her2/neu 항원 및 부가적인 아류반트 폴리펩타이드를 포함한다. 일 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 비-용혈성 LL0 단백질 또는 이의 분절이다(본원 실시예 참조). 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 PEST 서열이다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 ActA 단백질 또는 이의 분절이다. ActA 단백질 및 이의 분절은 LL0와 유사한 방식으로 항원 제시 및 면역성을 증가시킨다.

[0047] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 부가적인 폴리펩타이드는 리스테리오리신(LL0) 펩타이드이다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 ActA 펩타이드이다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 PEST-유사 서열 펩타이드이다. 다른 실시 양태에서, 부가적인 폴리펩타이드는 항원 펩타이드의 면역원성을 강화시킬 수 있는 다른 펩타이드이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0048] Her2/neu 키메라 항원을 포함하는 융합 단백질은 예를 들어, 적절한 서열의 클로닝 및 제한, 또는 후술하는 방법에 의한 직접적인 화학적 합성을 비롯한 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. 다른 예로, 부분서열(subsequence)은 클로닝될 수 있으며, 적절한 부분서열은 적절한 제한 효소를 사용해 절단될 수 있다. 그런 다음, 상기 분절들은 연결되어, 바람직한 DNA 서열을 생성할 수 있다. 일 실시 양태에서, 항원을 코딩하는 DNA는 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 DNA 증폭 방법을 이용해 생성될 수 있다. 먼저, 새로운 말단의 어느 한 쪽의 본래의(native) DNA의 절편들은 개별적으로 증폭된다. 증폭된 하나의 서열의 5' 말단은 펩타이드 링커(linker)를 코딩하며, 한편 증폭된 다른 서열의 3' 말단이 또한 펩타이드 링커를 코딩한다. 제1 분절의 5' 말단이 제2 분절의 3' 말단에 상보성이기 때문에, (예를 들어, LMP 아가로스 상에서의 부분적인 정제 후의) 2개의 분절이

제3 PCR 반응에서 오버래핑 주형(overlapping template)으로서 사용될 수 있다. 증폭된 서열은 코돈, (현재 아미노 서열을 형성하는) 개방 부위의 카르복시 쪽의 절편, 링커, 및 (현재 카르복시 서열을 형성하는) 개방 부위의 아미노 쪽의 서열을 포함할 것이다. 항원은 플라스미드에 연결된다. 각각의 방법은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

- [0049] 본 발명의 결과에서, 본 발명의 조성물의 투여는, 중앙 세포를 인지하고 살해하는 항원-특이적 T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포)의 형성을 유도하는 유용성을 가진다(본원 실시예 참조).
- [0050] 일 실시 양태에서, 본 발명은 Her-2 키메라 단백질에 융합되거나 또는 이의 분절에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 분절을 포함하는 재조합 폴리펩타이드를 제공한다. 일 실시 양태에서, 본 발명은 Her-2 키메라 단백질에 융합되거나 또는 이의 분절에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 분절로 이루어진 재조합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0051] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 Her-2 키메라 단백질은 인간 Her-2 키메라 단백질이다. 다른 실시 양태에서, Her-2 단백질은 마우스 Her-2 키메라 단백질이다. 다른 실시 양태에서, Her-2 단백질은 래트 Her-2 키메라 단백질이다. 다른 실시 양태에서, Her-2 단백질은 영장류 Her-2 키메라 단백질이다. 다른 실시 양태에서, Her-2 단백질은 인간 또는 다른 동물 종 또는 당해 기술분야에 알려진 조합의 Her-2 키메라 단백질이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0052] 다른 실시 양태에서, Her-2 단백질은 "HER-2/neu," "ErbB2," "v-erb-b2," "c-erb-b2," "neu," 또는 "cNeu"로 지칭되는 단백질이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0053] 일 실시 양태에서, Her2-neu 키메라 단백질은, 중앙 유전자의 MHC-클래스 I 에피토프의 클러스터(cluster)를 나타내는 Her2/neu 항원의 세포내 분절 하나 및 세포외 분절 2개를 가지며, 다른 실시 양태에서, 키메라 단백질은 3 H2Dq, 및 Her2/neu 항원의 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프(EC1, EC2, 및 IC1 분절)를 17개 이상 가진다(도 1 및 실시예 1 참조). 다른 실시 양태에서, 키메라 단백질은 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프(EC2 및 IC1 분절)를 13개 이상 가진다. 다른 실시 양태에서, 키메라 단백질은 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프(EC1 및 IC1 분절)를 14개 이상 가진다. 다른 실시 양태에서, 키메라 단백질은 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프(EC1 및 IC2 분절)를 9개 이상 가진다. 다른 실시 양태에서, Her2-neu 키메라 단백질은 비-용혈성 리스테리오리신 O(LLO)에 융합된다. 다른 실시 양태에서, Her2-neu 키메라 단백질은 *리스테리아-모노사이토제네스* 리스테리오리신 O(LLO) 단백질의 맨처음 441개 아미노산에 융합되며, *리스테리아 모노사이토제네스* 감쇠된 영양요구성 균주인 *LmddA*에 의해 발현 및 분비된다. 다른 실시 양태에서, 키메라 Her2/neu 항원/LLO 융합 단백질을 발현하는, 본원에서 제공되는 감쇠된 영양요구성 균주로부터의 융합 단백질 tLLO-ChHer2의 발현 및 분비는 시험관내에서 8시간 동안 성장시킨 후, TCA 침전된 세포 배양 상층액에서의 Lm-LLO-ChHer2의 발현 및 분비와 유사하다(도 1B 참조).
- [0054] 일 실시 양태에서, CTL 활성화는, 관련이 없는 리스테리아 백신이 주입된 마우스 또는 나이브(naive) 동물에서 검출되지 않는다(도 2A 참조). 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 감쇠된 영양요구성 균주(ADXS31-164)는 야생형 FVB/N 마우스의 비장세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 자극할 수 있다(도 2B).
- [0055] 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물의 대사 효소는 아미노산 대사 효소로서, 다른 실시 양태에서, 상기 대사 효소는 알라닌 라세마제 효소이다. 다른 실시 양태에서, 대사 효소는 D-아미노산 트랜스퍼라제 효소이다. 다른 실시 양태에서, 대사 효소는 재조합 *리스테리아* 균주에서 세포벽의 합성에 사용되는 아미노산의 형성을 촉매하며, 다른 실시 양태에서, 상기 대사 효소는 알라닌 라세마제 효소이다.
- [0056] 다른 실시 양태에서, 대사 효소를 코딩하는 유전자는 리스테리아 p60 프로모터의 조절 하에 발현된다. 다른 실시 양태에서, (인터날린(internalin)을 코딩하는) inlA 프로모터가 사용된다. 다른 실시 양태에서, hly 프로모터가 사용된다. 다른 실시 양태에서, ActA 프로모터가 사용된다. 다른 실시 양태에서, 인터그라제(integrase) 유전자는 다른 그람 양성 프로모터의 조절 하에 발현된다. 다른 실시 양태에서, 대사 효소를 코딩하는 유전자는, *리스테리아*에서 기능하는 다른 프로모터의 조절 하에 발현된다. 당해 기술분야의 당업자는, 다른 프로모터 또는 폴리시스트론 발현 카세트가 상기 유전자의 발현을 구동하는 데 사용될 수 있음을 알 것이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0057] 다른 실시 양태에서, Her-2 키메라 단백질은 서열 번호:1로 나타낸 하기 핵산 서열에 의해 코딩된다:

gagacccacctggacatgctccgccacctctaccagggtgccaggtggtgcagggaaacctggaactcacctacc
 tgccaccaatgccagcctgtccttctgcaggatccaggaggtgcagggctacgtgctcatcgctcacaacca
 agtgaggcaggtcccactgcagaggtgcggattgtgcgaggcaccagctctttaggacaactatgccctggcc
 gtgctagacaatggagaccgctgaacaataccaccctgtcacaggggctccccaggaggcctgctggagctgc
 agcttcgaagcctcacagagatcttgaaaggagggtcttgatccagcgaacccccagctctgctaccaggacac
 gattttgtggaagaatccaggagtttctggctgcaagaagatcttgggagcctggcatttctgccggagagc
 tttgatggggaccagcctccaacaactgccccctccagccagagcagctccaagtgtttagactctggaagaga
 tcacagttacctatacatctcagcatggccggacagcctgcctgacctcagcgtctccagaacctgcaagtaat
 ccggggacgaattctgcacaatggcgctactcgtgacctgcaagggtgggcatcagctggctggggctgcgc
 tcaactgaggaactgggcagtgactggcctcatccaccataacaccacctctgcttcgtgcacacggtgccct
 gggaccagctcttcggaacccgcaccaagctctgctccacactgccaaccggccagaggcagtggtggtggcga
 gggcctggcctgccaccagctgtgcgccgaggcagcagaagatccggaagtacacgatgaggagactgctgcag
 gaaacggagctggtggagccgctgacacctagcggagcagatgccaaccaggcgcagatgcggatcctgaaagaga
 cggagctgaggaagtgaaagtgcttggatctggcgctttggcacagctacaaggcctctggatccctgatgg
 ggagaatgtgaaatccagtgccatcaaagtgtgagggaaaacacatccccaaagccaacaagaagaatctta
 gacgaagcatcgtgatggctggtgtgggctccccatgtctccgccttctgggcatctgctgacatccacgg
 tgcagctggtgacacagcttatgccctatggctgcctcttagactaa (서열 번호 1).

[0058]

[0059] 다른 실시 양태에서, Her-2 키메라 단백질은 하기 서열을 가진다:

E T H L D M L R H L Y Q G C Q V V Q G N L E L T Y L
 P T N A S L S F L Q D I Q E V Q G Y V L I A H N Q V
 R Q V P L Q R L R I V R G T Q L F E D N Y A L A V L
 D N G D P L N N T T P V T G A S P G G L R E L Q L R
 S L T E I L K G G V L I Q R N P Q L C Y Q D T I L W
 K N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D
 P A S N T A P L Q P E Q L Q V F E T L E E I T G Y L
 Y I S A W P D S L P D L S V F Q N L Q V I R G R I L
 H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S L R E L G
 S G L A L I H H N T H L C F V H T V P W D Q L F R N
 P H Q A L L H T A N R P E D E C V G E G L A C H Q L
 C A R G Q Q K I R K Y T M R R L L Q E T E L V E P L
 T P S G A M P N Q A Q M R I L K E T E L R K V K V L
 G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V K I P V A I
 K V L R E N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y
 V S R L L G I C L T S T V Q L V T Q L M P Y G C L L
 D (서열 번호 2).

[0060]

[0061] 일 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물의 Her2 키메라 단백질 또는 이의 분절은 이의 신호 서열을 포함하지 않는다. 다른 실시 양태에서, 신호 서열이 생략되면, 신호 서열의 높은 소수성으로 인해, Her2 분절이 리스테리아에서 성공적으로 발현될 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0062] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 Her2 키메라 단백질의 분절은 이의 막관통 도메인(TM)을 포함하지 않는다. 일 실시 양태에서, TM이 생략되면, TM의 높은 소수성으로 인해, Her-2 분절이 리스테리아에서 성공적으로 발현될 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0063] 일 실시 양태에서, 래트-Her2/neu 유전자의 핵산 서열은 하기이다:

CCGGAATCGCGGGCACCCAAGTGTGTACCGGCACAGACATGAAGTTGCGGCTCCCTGCCAGTCTGAGACCCACC
 TGGACATGCTCCGCCACCTGTACCAGGGCTGTCAGGTAGTGCAGGGCAACTTGGAGCTTACCTACGTGCCTGCCA
 ATGCCAGCCTCTATTCTGCAGGACATCCAGGAAGTTCAGGGTTACATGCTCATCGCTCACAACCAGGTGAAGC

[0064]

CGGTCCCCTGCAAAGGCTGCGCATCGTGAGAGGGACCCAGCTCTTTGAGGACAAGTATGCCCTGGCTGTGCTAG
 ACAACCGAGATCCTCAGGACAATGTCCGCCCTCCACCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGC
 TTCCGAAGTCTCACAGAGATCCTGAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGG
 TTTTGTGGAAGGACGTCTTCCGCAAGAATAACCAACTGGCTCCTGTGATATAGACACCAATCGTTCCTCCGGGCT
 GTCCACCTTGTGCCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCCGGAAGACTGTCAGATCTTGACTG
 GCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGGCCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCG
 CAGGCTGCACGGGCCCCAAGCATCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAATCATAGTGGTATCTGTGAGCTGC
 ACTGCCAGCCCTCGTCACTACAACACAGACACCTTTGAGTCCATGCACAACCCTGAGGGTCGCTACACCTTTG
 GTGCCAGCTGCGTGACCACCTGCCCTACAACACTACCTGTCTACGGAAGTGGGATCCTGCACTCTGGTGTGTCCC
 CGAATAACCAAGAGGTACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCTCGAGTGT
 GCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGACAATGTCCAGGAGTTTGTGGCT
 GCAAGAAGATCTTTGGGAGCTGGCATTTCGCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGC
 TGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTGTTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAG
 ACAGTCTCCGTGACCTCAGTGTCTTCAGAACCCTCGAATCATTTCGGGACGGATTCTCCACGATGGCGGCTACT
 CATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTACTGCGGGAGCTGGGCAGTGGATTGGCTC
 TGATTACCCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACTGTACCTTGGGACCAGCTCTTCGGAAACCACATCAGG
 CCCTGCTCCACAGTGGGAACCGCCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCC
 ACGGGCACTGCTGGGGCCAGGGCCACCCAGTGTGCAACTGCAGTCAATTCCTTCGGGGCCAGGAGTGTGTGG
 AGGAGTGCCGAGTATGGAAGGGGCTCCCCGGGAGTATGTGAGTGACAAGCGCTGTCTGCCGTGCACCCCGAGT
 GTCAGCCTCAAAACAGCTCAGAGACCTGCTTTGGATCGGAGGCTGATCAGTGTGCAGCCTGCGCCCACTACAAGG
 ACTCGTCTCTGTGTGGCTCGCTGCCCCAGTGGTGTGAAACCGGACCTCTCCTACATGCCCATCTGGAAGTACC
 CGGATGAGGAGGGCATATGCCAGCCGTGCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGATCTGGATGAACGAGGCT
 GCCCAGCAGAGCAGAGAGCCAGCCGGTGACATTCATCATTGCAACTGTAGTGGGCGTCTGCTGTTCTGTATCT
 TAGTGGTGGTTCGTTGGAATCCTAATCAAAACGAAGGAGACAGAAGATCCGGAAGTATACGATGCGTAGGCTGCTGC
 AGGAAACTGAGTTAGTGGAGCCGTGACGCCCAGCGGAGCAATGCCAACAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAG
 AGACGGAGCTAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCAG
 ATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACATCTCCTAAAGCCAACAAAGAAA
 TTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTCCGTATGTGTCCCGCTCCTGGGCATCTGCCTGACAT
 CCACAGTACAGCTGGTGACACAGCTTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCC
 TAGGCTCCCAGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGCGGCTTG
 TACACAGGGACCTGGCTGCCCGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCAGTCAAGATTACAGATTTCCGGCTGG

[0065]

CTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAGATGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGG
 AATCTATTTCTCAGACGCCGGTTACCCATCAGAGTGTGTGGAGCTATGGAGTACTGTGTGGGAGCTGATGA
 CTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCGGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGAGAACGCCTAC
 CTCAGCCTCCAATCTGCACCATGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTCGCC
 CGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTTACGTATGGCGAGGGACCCCGAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACG
 AGGACTTGGGCCATCCAGCCCATGGACAGTACCTTCTACCGTTCACTGCTGGAAGATGATGACATGGGTGACC
 TGGTAGACGCTGAAGAGTATCTGGTGGCCAGCAGGGATTCTTCTCCCGGACCCTACCCAGGCACTGGGAGCA
 CAGCCCATAGAAGGCACCCGAGCTCGTCCACCAGGAGTGGAGGTGGTGGAGCTGACACTGGGCCTGGAGCCCTCGG
 AAGAAGGGCCCCCAGATCTCCACTGGCTCCCTCGGAAGGGGCTGGCTCCGATGTGTTTGTGGTACTGGCAA
 TGGGGTAACCAAAGGGCTGCAGAGCCTCTCTCCACATGACCTCAGCCCTCTACAGCGGTACAGCGAGGACCCCA
 CATTACCTCTGCCCCCGAGACTGATGGCTATGTTGCTCCCTGGCTGCAGCCCCAGCCGAGTATGTGAACC
 AATCAGAGGTTACGCTCAGCCTCCTTTAACCCAGAGGGTCTCTGCCTCCTGTCCGGCTGCTGGTGTACTC
 TAGAAAGACCAAGACTCTCTCTCTGGGAAGAATGGGGTTGCAAAGACGTTTTTGCCTTCGGGGTGTGTGG
 AGAACCTGAATACTTAGTACCGAGAGAAGGCACTGCCTCTCCGCCCCACCTTCTCCTGCCTTCAGCCAGCCT
 TTGACAACCTCTATTACTGGGACCAGAATCATCGGAGCAGGGGCTCCACCAAGTAACTTTGAAGGGACCCCA
 CTGCAGAGAACCCTGAGTACCTAGGCCTGGATGTACCTGTA (서열 번호 45).

[0066]

일 실시 양태에서, 래트/her2/neu EC1 분절을 코딩하는 핵산 서열은 하기이다:

[0067]

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCAAGTCTCACAGAGATCCTGAAGGGAGGATTTT
 GATCCGTGGGAACCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTGGAAGGACGTCTTCCGCAAGAATAACCAACT
 GGCTCTGTCGATATAGACACCAATCGTTCCCGGGCTGTCCACCTGTGCCCCCGCTGCAAAGACAATCACTG
 TTGGGGTGAAGTCCGGAAGACTGTCAGATCTTACTGACCATCTGTACCAGTGGTTGTCCCGGTGCAAGGG
 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGCA (서열 번호 46)

[0068]

다른 실시 양태에서, 래트 her2/neu EC2 분절을 코딩하는 핵산 서열은 하기이다:

[0069]

GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCTCGAGTGTGCTATGGTCTGGG
 CATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGACAATGTCCAGGAGTTTGTGGCTGCAAGAAGATCTT
 TGGGAGCCTGGCATTTTGTCCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCCTCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCTGAGCA
 GCTCCAAGTGTTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTCCGTGA
 CCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCGGGGACGGATTCTCCACGATGGCGGCTACTCATTGACTGCA
 AGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGGGAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAA
 CGCCATCTCTGCTTTGTACACTGTACCTTGGGACCAGCTTTCGGAAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAG
 TGGGAACCGCCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTGTTGTGCCACGGGCACTGCTG
 GGGGCCAGGGCCACCCA (서열 번호 47).

[0071]

[0072] 다른 실시 양태에서, 래트 her2/neu IC1 분절을 코딩하는 핵산 서열은 하기이다:

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGCTAAGGAAGGTGA
 AGGTGCTTGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCC
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAAACACATCTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTTAGATGAAGCGTATGTGA
 TGGCTGGTGTGGGTTCTCCGTATGTGTCCCGCCTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACAC
 AGCTTATGCCCTACGGTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACCCGAGGTGCGCTAGGCTCCCAGGACCTGCTCA
 ACTGGTGTGTTTCAAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGCGGCTTGACACAGGACCTGGCTGCC
 GGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCAGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATG
 AGACAGAGTACCATGCAGATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGT
 TCACCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACG
 ATGGAATCCCAGCCGGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAACGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCA
 TTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCAGATTCCGGGAGTTGGTGT
 CAGAATTTTACGTATGGCGAGGGACCCCGAGCTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTTGGGCCCATCCAGCC
 CCATGGACAGTACCTTCTACCGTTCACTGCTGGAA (서열 번호 48).

[0073] 일 실시 양태에서, 인간-Her2/neu 유전자의 핵산 서열은 하기이다:

ATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGCTCCTCCTCGCCCTTTGCCCCCGGAGCCGCGAGCACCCAAGTG
 TGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTAC
 CAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCCTGCAG
 GATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGG
 ATTTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAAT
 ACCACCCCTGTACAGGGGCTCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAA
 GGAGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCGACTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTCCACAAG
 AACAACCAGCTGGCTCTCACTGATAGACCAACCGCTCTCGGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAG

[0075]

GGCTCCCCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCC
 CGCTGCAAGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCT
 GACTGCCTGGCCTGCCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTACCTACAAC
 ACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCC
 TACAACCTACCTTCTACGGACGTGGGATCCTGCACCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAG
 GATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTG
 CGAGAGGTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCA
 TTTCTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTTT
 GAGACTCTGGAAGAGATCACAGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTC
 CAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATC
 AGCTGGCTGGGGTGCCTCACTGAGGGAAGTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGC
 TTCGTGCACACGGTGCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCA
 GAGGACGAGTGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGCGCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGGCCC
 ACCCAGTGTGCAACTGCAGCCAGTTCCTTCGGGGCCAGGAGTGCCTGGAGGAATGCCGAGTACTGCAGGGGCTC
 CCCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCTGCCACCCTGAGTGTGAGCCCGAATGGCTCAGTGACC
 TGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCACTATAAAGACCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGC
 CCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCT
 TGCCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCGAGCAGAGAGCCAGCCCT
 CTGACGTCCATCGTCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGTGGTCTGGTCTTGGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATC
 AAGCGACGGCAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTG
 ACACCTAGCGGAGCGATGCCAACAGGGCGCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTG
 CTTGGATCTGGCGCTTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATCCAGTG
 GCCATCAAAGTGTGAGGGAAAACACATCCCCAAAGCCAACAAGAAATCTTAGACGAAGCATACTGTATGGCT
 GGTGTGGGCTCCCCATATGTCTCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTGACACAGCTT
 ATGCCCTATGGTGCCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCTGGGCTCCCAGGACCTGCTGAACTGG
 TGTATGCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTACACAGGGACTTGGCCGCTCGGAAC
 GTGCTGGTCAAGAGTCCCAACCATGTCAAAATACAGACTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGACGAGACA
 GAGTACCATGCAGATGGGGCAAGGTGCCATCAAGTGGATGGCGCTGGAGTCCATTCTCCCGCGCGGTTACCC
 CACCAGAGTGATGTGTGGAGTTATGGTGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGGG
 ATCCAGCCCGGAGATCCCTGACCTGCTGAAAAAGGGGAGCGGCTGCCCCAGCCCCCATCTGCACCATTGAT
 GTCTACATGATCATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTCGGCCAAGATCCGGGAGTTGGTGTCTGAA

[0076]

TTCTCCCGCATGGCCAGGGACCCCGAGCGCTTTGTGGTCATCCAGAATGAGGACTTGGGCCAGCCAGTCCCTTG
 GACAGCACCTTCTACCGCTCACTGCTGGAGGACGATGACATGGGGGACCTGGTGGATGCTGAGGAGTATCTGGTA
 CCCCAGCAGGGCTTCTTCTGTCCAGACCCTGCCCCGGCGCTGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCA
 TCTACCAGGAGTGGCGTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGGCCCCAGGTCTCCACTG
 GCACCTCCGAAGGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGACGCAAGGGGCTGCAAAGC
 CTCCCCACACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCTGCCTCTGAGACTGAT
 GGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAGATGTTCCGGCCCAGCCCCCT
 TCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCGACCTGCTGGTGCCACTCTGAAAGGGCAAGACTCTCTCCCA
 GGAAGAATGGGGTCGTCAAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGTGCCGTGGAGAACCCCGAGTACTTGACACCCAG
 GGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCCTCCTCCTGCCTTCAGCCAGCCTTCGACAACCTCTATTACTGGGACCAG
 GACCCACAGAGCGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTACGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGT
 CTGGACGTGCCAGTGTGAACCAGAAGGCCAAGTCCGCAGAAGCCCTGA (서열 번호 49).

[0077]

다른 실시 양태에서, 키메라에 이용되는 인간 her2/neu EC1 분절을 코딩하는 핵산 서열은 인간 EC1 영역의 120 bp 내지 510 bp를 스팬(span)하며, (서열 번호: 50)에 나타나 있다.

GAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGAAACCTGGAACCTCACCTAC
 CTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAAC
 CAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTG
 GCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAG
 CTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGAAACCCAGCTCTGCTACCAG
 GACACGATTTTGTGGAAG (서열 번호 50).

[0079]

일 실시 양태에서, 완전한 EC1 인간 her2/neu 분절은 인간 her2/neu 유전자의 58 bp 내지 979 bp를 스팬하고, (서열 번호: 54)에 나타나 있다.

GCCGCGAGCACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGAC
 ATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCC
 AGCCTGTCTTCTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTC
 CCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAAT
 GGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGC

[0081]

CTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGG
 AAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCC
 TGTCTCCGATGTGTAAGGGTCCCGCTGCTGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTC
 TGTGCCGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGC
 ACGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCCA
 GCCCTGGTACCTACAACACAGACAGCTTTGAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCGGGCCAGC
 TGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTTTCTACGGACGTGGGATCCTGCACCCTCGTCTGCCCTGCACAAC
 CAAGAGGTGACAGCAGAGGAT (서열 번호 54).

[0082]

다른 실시 양태에서, 키메라에 이용되는 인간 her2/neu EC2 분절을 코딩하는 핵산 서열은 인간 her2/neu EC2 분 절의 1077 bp 내지 1554 bp를 스팬하고, 50 bp 연장부(extension)를 포함하며, (서열 번호: 51)에 나타나 있다.

[0083]

AATATCCAGGAGTTTGGCTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGACC
 CAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCT
 ATACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGACGAATT
 CTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAAC
 TGGGAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCTGGGACCAGCTCTT
 TCGGAACCCGCACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGCCAGAGGACGAGTGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCTGC
 CACCAGCTGTGCGCCCGAGGG (서열 번호 51).

[0084]

일 실시 양태에서, 완전한 EC2 인간 her2/neu 분절은 인간 her2/neu 유전자의 907 bp 내지 1504 bp를 스캔하고, (서열 번호: 55)에 나타나 있다.

[0085]

TACCTTTCTACGGACGTGGGATCCTGCACCCCTCGTCTGCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGA
 ACACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGCAGAG
 GTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTG
 CCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGAGACT
 CTGGAAGAGATCACAGTTACCTATAACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAAC
 CTGCAAGTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGG
 CTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAAGTGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTG
 CACACGGTGCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGCACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGCCAGAG
 (서열 번호 55).

[0086]

[0087]

다른 실시 양태에서, 키메라에 이용되는 인간 her2/neu IC1 분절을 코딩하는 핵산 서열은 (서열 번호: 52)에 나타나 있다.

[0088]

CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGC
 GGAGCGATGCCAACCAGGCGCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGTGAAGGTGCTTGGATCT
 GGGCCTTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATCCAGTGGCCATCAAA
 GTGTTGAGGAAAACACATCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTAGACGAAGCATACTGATGGCTGGTGTGGGC
 TCCCATATGTCTCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCAGGTGCAGCTGGTGCACAGCTTATGCCCTAT
 GGCTGCCTCTTAGACT (서열 번호: 52).

[0089]

다른 실시 양태에서, 완전한 인간 her2/neu IC1 분절을 코딩하는 핵산 서열은 인간 her2/neu 유전자의 2034 bp 내지 3243 bp를 스캔하고, (서열 번호: 56)에 나타나 있다.

[0090]

CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGC
 GGAGCGATGCCCAACCAGGCGCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCT
 GCGCCTTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATTCAGTGGCCATCAAA
 GTGTTGAGGGAAAACACATCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTAGACGAAGCATACTGATGGCTGGTGTGGGC
 TCCCCATATGTCTCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTGACACAGCTTATGCCCTAT
 GGCTGCCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCCTGGGCTCCCAGGACCTGTGAAGTGGTGTATGCAG
 ATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTACACAGGGACTTGGCCGCTCGGAACGTGTGGTC
 AAGAGTCCCAACCATGTCAAAATTACAGACTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGACGAGACAGAGTACCAT
 GCAGATGGGGCAAGGTGCCCATCAAGTGGATGGCGCTGGAGTCCATTCTCCGCCGGCGGTTACCCACCAGAGT
 GATGTGTGGAGTTATGGTGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGGGATCCCAGCC
 CGGGAGATCCCTGACCTGTGAAAAGGGGAGCGGCTGCCCCAGCCCCCATCTGCACCATTGATGTCTACATG
 ATCATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCAAGATTCCGGGAGTTGGTGTCTGAATTCTCCCGC
 ATGGCCAGGGACCCCCAGCGCTTTGTGGTCTCCAGAATGAGGACTTGGGCCAGCCAGTCCCTTGGACAGCACC
 TTCTACCGCTCACTGCTGGAGGACGATGACATGGGGACCTGGTGGATGCTGAGGAGTATCTGGTACCCCAGCAG

[0091]

GGCTTCTTCTGTCCAGACCCTGCCCCGGGCGCTGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGG
 AGTGGCGGTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCC

[0092]

GAAGGGGCT (서열 번호 56).

[0093]

일 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물에 이용되는 LLO는 *리스테리아* LLO이다. 일 실시 양태에
 서, LLO가 유래되는 *리스테리아*는 *리스테리아 모노사이토제네스(LM)*이다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아*는
*리스테리아 이바노비이(Listeria ivanovii)*이다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아*는 *리스테리아 벨쉬메리*
*(Listeria welshimeri)*이다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아*는 *리스테리아 세엘리게리(Listeria seeligeri)*
 이다. 다른 실시 양태에서, LLO 단백질은 비-*리스테리아* LLO 단백질이다. 다른 실시 양태에서, LLO 단백질은
 합성 LLO 단백질이다. 다른 실시 양태에서, 이는 재조합 LLO 단백질이다.

[0094] 일 실시 양태에서, LLO 단백질은 하기에 나타난 하기 핵산 서열(서열 번호: 3)에 의해 코딩된다:

```
atgaaaaaat aatgctag tttttatt tacctt atattag ttagtct accaat tgcgca caaaact gaagcaaagg
atgcatctgc attcaata aagaaaat tcaatt tcatcc atggcacc accagcat ctccgc ctgcaagt cctaaagac
gccaatcgaaa aagaacac gcggatgaa atcgata agtatata caaggatt ggattaca ataaaa caaatgtatta
gtataccac ggagatgc agtgacaa atgtgccg ccaagaaa aggttaca aagatg gaaatga atatattg ttgtgg
agaaaaaga agaaatcc atcaatc aaaaat aatgcag acattca agttgt gaatgca atttcg agcctaac ctatcc
aggtgctct cgtaaa agcgaatt cggaatt agtagaaa atcaacc agatgttct ccctgt aaaaacgt gattcatta
aactcagcat tgatttg ccaggtat gactaat caagaca ataaaat agttgt aaaaaat gccactaa atcaaagc
ttaacaac gcagtaaat acattag tggaaag atggaatg aaaaat atgctca agcttat ccaaatgt aagtgcaa
aattgatt atgatg acgaaat ggcttac agtgaat cacaat taat tgcgaa atttggt acagcat ttaagctgt a
aatatagct tgaatg taacttc ggcgca atcagt gaaggg aaaaat gcaaga agaagtc attagttt aaacaaa
tttactata acgtga atgtaat gaacct acaagac cttccag attttc ggcaaa agctgt tactaa agagcagt t
gcaagcgc ttggagt gaatgc agaaaat cctcct gcatat atctca agtggcgt atggcgc tcaagttt atttg
aaattatc aactaat tcccat agtact aaagta aagctg cttttg atgctgcc gt aagcgg aaaaat ctgtct cag
gtgatgtag aacta caaatat catcaaaa tttctc ctcaa agccgta atttac ggaggt tccgcaa aagatga
agttcaaat catcgac ggcacact cgagact tacgcgat atttt gaaaaa aggcgct actttt aatcgaga aaca
```

[0095] ccaggagt tccatttg ct tataca acaaact tccctaaa agacaat gaattag ctgttat taaaaa caactcaga at
atattgaa caactt caaaag cttatac agatgg aaaaat taacatcg atcactct ggaggat acgttgct caatt
caacattt cttgggat gaagta attatgat (서열 번호 3).

[0096] 다른 실시 양태에서, LLO 단백질은 하기 서열(서열 번호: 4)을 가진다:

```
M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K
D A S A F N K E N S I S S M A P P A S P P A S P K
T P I E K K H A D E I D K Y I Q G L D Y N K N N V
L V Y H G D A V T N V P P R K G Y K D G N E Y I V
V E K K K K S I N Q N N A D I Q V V N A I S S L T
Y P G A L V K A N S E L V E N Q P D V L P V K R D
S L T L S I D L P G M T N Q D N K I V V K N A T K
S N V N N A V N T L V E R W N E K Y A Q A Y P N V
S A K I D Y D D E M A Y S E S Q L I A K F G T A F
K A V N N S L N V N F G A I S E G K M Q E E V I S
F K Q I Y Y N V N V N E P T R P S R F F G K A V T
K E Q L Q A L G V N A E N P P A Y I S S V A Y G R
Q V Y L K L S T N S H S T K V K A A F D A A V S G
K S V S G D V E L T N I I K N S S F K A V I Y G G
S A K D E V Q I I D G N L G D L R D I L K K G A T
F N R E T P G V P I A Y T T N F L K D N E L A V I
K N N S E Y I E T T S K A Y T D G K I N I D H S G
G Y V A Q F N I S W D E V N Y D (서열 번호 4)
```

[0098] 이 서열에 상응하는 프로단백질의 처음 25개 아미노산은 신호 서열이며, 박테리아에 의해 분비될 때 LLO로부터 절단된다. 따라서, 이러한 실시 양태에서, 전장의 활성 LLO 단백질의 길이는 504개 잔기이다. 다른 실시 양태에서, LLO 단백질은 젠뱅크 부여 번호(GenBank Accession No.) DQ054588, DQ054589, AY878649, U25452, 또는 U25452에 나타난 서열을 가진다. 다른 실시 양태에서, LLO 단백질은 LLO 단백질의 변이체이다. 다른 실시 양태에서, LLO 단백질은 LLO 단백질의 호모로그이다.

- [0100] 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0101] 다른 실시 양태에서, "절단된 LLO" 또는 "tLLO"는 PEST-유사 도메인을 포함하는 LLO의 분절을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 아미노 말단에 활성화 도메인을 포함하지 않으며 시스틴 484를 포함하지 않는 LLO 분절을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 PEST 서열로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 PEST 서열을 포함한다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 529개 아미노산의 전장 LLO 단백질의 처음의 약 400개 내지 441개 아미노산으로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 LLO 단백질의 비-용혈성 형태이다.
- [0102] 본 발명의 방법 및 조성물의 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩타이드는 키메라 Her-2/neu 항원 및 부가적인 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질이며, 다른 실시 양태에서, 상기 융합 단백질은 특히, LM 비-용혈성 LLO 단백질을 포함한다(본원 실시예).
- [0103] 일 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 25개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 50개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 75개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 100개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 125개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 150개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 1175개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 200개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 225개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 250개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 275개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 300개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 325개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 350개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 375개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 400개의 잔기로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, LLO 분절은 약 1개 내지 약 425개의 잔기로 이루어진다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0104] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질은 LLO 단백질 또는 원핵생물 유기체와 같은 또 다른 유기체로부터의 PEST 서열을 포함한다.
- [0105] 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 서열 번호: 5-9로부터 선택되는 서열을 가진다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 LM ActA 단백질 유래의 PEST-유사 서열이다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 KTEEQPSEVNTGPR(서열 번호: 5), KASVTDTSEGDLSSMQSADESTPQPLK(서열 번호: 6), KNEEVNASDFPPPTDEELR(서열 번호: 7), 또는 RGGIPTSEEFSSLSNGDFTDDENSETTEEEIDR(서열 번호: 8)이다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 스트렙토코커스 종(*Streptococcus* sp.) 유래의 스트렙토라이신 O(*Streptolysin* O) 단백질이다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 스트렙토코커스 *파이오게네스* 스트렙토라이신 O(*Streptococcus pyogenes* *Streptolysin* O), 예를 들어, AA 35-51에서 KQNTASTETTTTNEQPK(서열 번호: 9)로부터 유래된다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 서열은 스트렙토코커스 *에퀴시밀리스* 스트렙토라이신 O(*Streptococcus equisimilis* *Streptolysin* O), 예를 들어, AA 38-54에서 KQNTANTETTTTNEQPK(서열 번호: 10)로부터 유래된다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 원핵생물 유기체로부터 유래되는 또 다른 PEST-유사 AA 서열이다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 당해 기술분야에 공지된 다른 PEST-유사 서열이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0106] 일 실시 양태에서, 항원이 LM의 PEST-유사 서열에 융합되면, 항원의, 세포 매개의 항-종양 면역성이 강화되었다. 따라서, 다른 원핵생물 유기체 유래의 다른 PEST-유사 서열에 항원이 융합되어도, 상기 항원의 면역원성이 강화될 것이다. 다른 원핵생물 유기체의 PEST-유사 서열은, LM에 대해 예를 들어, Rechsteiner 및 Rogers(1996, *Trends Biochem. Sci.* 21 :267-271)에 의해 기술된 것과 같은 방법에 따라 확인될 수 있다. 다르게는, 다른 원핵생물 유기체 유래의 PEST-유사 AA 서열 또한, 이 방법을 토대로 확인될 수 있다. PEST-유사 AA 서열이 예상되는 다른 원핵생물 유기체로는 다른 *리스테리아* 종이 포함되나, 이로 한정되지 않는다. 다른 실시 양태에서, PEST-유사 AA 서열은 항원 단백질에 병합(embedded)되어 있다. 따라서, 다른 실시 양태에서, "융합체"는, 항원, 및 상기 항원의 한쪽 말단에 연결되어 있거나, 또는 상기 항원 내부에 병합되어 있는 PEST-유사 아미노산 서열을 모두 포함하는 항원 단백질을 지칭한다.
- [0107] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 백신을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드로 이루어진 백신을 제공한다.

- [0108] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드 분자를 포함하는 백신을 제공한다.
- [0109] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 분자를 제공한다.
- [0110] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 뉴클레오타이드 분자에 의해 코딩되는 재조합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0111] 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드 분자 또는 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 백신을 제공한다.
- [0112] 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드 분자 또는 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다
- [0113] 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드 분자 또는 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0114] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 뉴클레오타이드 분자를 포함하는, 재조합 형태의 *리스테리아*를 제공한다.
- [0115] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 형태의 *리스테리아*를 포함하는 백신을 제공한다.
- [0116] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 형태의 *리스테리아*의 배양물을 제공한다.
- [0117] 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 백신은 본원에서 기술된 실시 양태 또는 형태의 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 포함한다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 백신은 본원에서 기술된 실시 양태 또는 형태의 본 발명의 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 백신은 본원에서 기술된 실시 양태 또는 형태의 본 발명의 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*로 본질적으로 이루어진다. 일 실시 양태에서, 용어 "~을 포함한다"는, 백신이 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 포함하고, 당해 기술분야에 공지될 수 있는 다른 백신 또는 치료를 포함하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 용어 "본질적으로 ~로 이루어진"은, 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*에 존재하지만, 백신의 치료 효과에 직접 관여하지 않는, 예를 들어, 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*의 효과 (예를 들어, 안정화, 보존 등)를 촉진하는 기능적인 구성분들일 수 있는, 백신의 다른 구성분들도 포함될 수 있는 백신을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "~로 이루어진"은, 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 포함하는 백신을 지칭한다.
- [0118] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기술된 실시 양태 또는 형태의 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기술된 실시 양태 또는 형태의 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 투여하는 단계로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기술된 실시 양태 또는 형태의 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 투여하는 단계로 본질적으로 이루어진다. 일 실시 양태에서, 용어 "~을 포함한다"는 상기 방법에서 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 투여하는 단계를 포함하는 것, 및 당해 기술분야에 공지될 수 있는 다른 방법 또는 치료법을 포함하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 용어 "본질적으로 ~로 이루어진"은, 기능적 구성분이 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*의 투여이지만, 상기 방법의 치료 효과에 직접적으로 관여하지 않으며, 예를 들어, 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*의 투여 효과를 촉진하는 단계를 지칭할 수 있는, 방법의 다른 단계들도 포함될 수 있는, 방법을 지칭한다. 일 실시 양태에서, 용어 "~로 이루어진"은, 부가적인 단계 없이, 재조합 *리스테리아 모노사이토제네스*를 투여하는 방법을 지칭한다.
- [0119] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 *리스테리아*는 *리스테리아 모노사이토제네스*이다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아*는 *리스테리아 이바노비*(*Listeria ivanovii*)이다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아*는 *리스테리아 벨쉬메리*(*Listeria welshimeri*)이다. 다른 실시 양태에서, *리스테리아*는 *리스테리아 세엘리게리*(*Listeria seeligeri*)이다. 각각의 유형의 *리스테리아*는 본 발명의 개별적인 실시 양태를 대표한다.
- [0120] 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 *리스테리아* 균주는 ADXS31-164 균주이다. 다른 실시 양태에서, ADXS31-164는 야생형 FVB/N 마우스의 비장세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 자극한다. 또한, 본원에서 제시되는 데이터는, ADXS31-164가, 표적화된 항원의 서로 다른 도메인에 위치하는 인간 에피토프에 대한 항-Her2/neu 특이적 면역 반응을 유도할 수 있음을 나타낸다.
- [0121] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 Her-2 키메라 단백질 또는 이의 분절을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자를 포함하는 재조합 형태의 *리스테리아*를 제공한다.
- [0122] 일 실시 양태에서, 본 발명은, Her-2 키메라 단백질 또는 이의 분절에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 분절을 포함하는 재조합 폴리펩타이드를 대상에게 투여하여, 상기 대상에서 항-Her-2 면역 반응을 유도하는 단계를 포함하

는, 대상에서 항-Her-2 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

- [0123] 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질은 LLO 유래의 LLO 신호 서열을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 단백질의 2개의 분자들(LLO 분절 및 항원)은 직접 결합된다. 다른 실시 양태에서, 2개의 분자들은 1개 이상의 아미노산으로 이루어진 짧은 스페이스 펩타이드에 의해 결합된다. 일 실시 양태에서, 상기 스페이스는, 단백질을 결합하거나 또는 이들 간의 어느 정도의 최소 거리 또는 다른 관계를 보존하는 것 외에는 다른 특이적인 생물학적 활성을 가지지 않는다. 다른 실시 양태에서, 스페이스의 구성(constituent) 아미노산은 접힘, 순전하(net charge), 또는 소수성과 같은, 분자의 일부 특성에 영향을 미치도록 선택된다. 다른 실시 양태에서, 단백질의 2개의 분자들(LLO 분절 및 항원)은 개별적으로 합성되거나 또는 비융합된다. 다른 실시 양태에서, 단백질의 2개의 분자들은 동일한 핵산으로부터 개별적으로 합성된다. 보다 다른 실시 양태에서, 2개의 분자들은 개별 핵산으로부터 개별적으로 합성된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0124] 다른 실시 양태에서, Her-2 키메라 단백질 또는 이의 분절에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 분절을 포함하는 재조합 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 뉴클레오타이드를 대상에게 투여하여, 상기 대상에서 항-Her-2 면역 반응을 유도하는 단계를 포함하는, 대상에서 항-Her-2 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0125] 일 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu-발현 종양에 대한 강화된 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 제공되는 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her-2 단백질의 아우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her-2 단백질의 몇가지 아우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her-2 단백질의 적어도 1개 내지 5개의 아우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her-2 단백질의 적어도 1개 내지 10개의 아우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her-2 단백질의 적어도 1개 내지 17개의 아우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her-2 단백질의 17개 이상의 아우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다.
- [0126] 종양 형성 단백질 Her2/neu에서의 점 돌연변이 또는 아미노산 결실은, 이들 종양이 소 분절 *리스테리아*-기체의 백신 또는 트라스투주마브(trastuzumab)(Her2/neu 항원의 세포외 도메인에 위치하는 에피토프에 대한 모노클로날 항체)에 의해 표적화된 경우, 내성인 종양 세포의 치료를 매개로 하는 것으로 보고된 바 있다. 종양 유전자 MHC-클래스 I 에피토프의 클러스터(cluster)를 나타내는 Her2/neu 항원의 2개의 세포외 분절 및 1개의 세포내 분절을 가지는, 키메라 Her2/neu를 기체로 하는 조성물을 기술한다. Her2/neu 항원의 매핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프 17개 이상 및 3 H2Dq를 가지는 이러한 키메라 단백질은 *리스테리아-모노사이토제네스* 리스테리오리신 0 단백질의 처음 441개 아미노산에 융합되고, *리스테리아 모노사이토제네스* 감쇠된 균주 *LmddA*에 의해 발현 및 분비되었다.
- [0127] 이전의 보고들은, Her2/neu 유전자도입 마우스가 Her2/neu 항원의 소 분절을 개별적으로 발현 및 분비하는 *리스테리아*-기체의 백신으로 면역화되는 경우(이의 각각은 Her2/neu 종양 유전자의 H2Dq 에피토프를 1개만 가짐), Her2/neu를 과발현하는 종양은 각각의 백신에 의해 표적화되는 Her2/neu 항원의 이들 에피토프의 돌연변이로 인해 회피될 수 있다고 나타낸 바 있다(Singh R, Paterson Y. Immunoediting sculpts tumor epitope during immunotherapy. *Cancer Res* 2007;67: 1887-92 참조). 본원은, Her2/neu 단백질의 3종 이상의 에피토프가 키메라 백신에 병합되어 있는 경우, 이는 회피 돌연변이에 의해 이들 종양의 선별 및 회피를 방지할 수 있다는 예상치 못한 결과를 기술한다. 새로운 Her2/neu 키메라 *리스테리아* 백신으로 면역화한다고 해서, Her2/neu 항원에서 점 돌연변이 또는 아미노산 결실과 관련 있을 수 있는 회피 돌연변이가 유도되지 않았다(본원 실시예 4 참조).
- [0128] 일 실시 양태에서, Her-2 키메라 단백질, 또는 상기 키메라 단백질을 발현하는 재조합 폴리펩타이드를 발현하도록 *리스테리아* 백신 균주를 조작하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 핵산 분자를 이용해 *리스테리아* 균주를 형질전환하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 핵산 분자는 폴리펩타이드를 코딩하는 제1 개방형 해독틀을 포함하며, 상기 폴리펩타이드는 Her2/neu 키메라 항원을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 핵산 분자는 대사 효소를 코딩하는 제2 개방형 해독틀을 추가로 포함하며, 상기 대사 효소는 재조합 *리스테리아* 균주의 염색체에 결합되어 있는 내인성 유전자를 보완하여, *리스테리아* 백신 균주가 Her-2 키메라 단백질을 발현하도록 조작한다.
- [0129] 일 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물은 아췌반트를 추가로 포함하며, 다른 실시 양태에서, 상

기 아췁반트는 과립구/대식 세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 리피드 A, 또는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0130] 일 실시 양태에서, LM 델타-actA 돌연변이체(Brundage et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 11890-11894), *리스테리아 모노사이토제네스* 델타-plcA(Camilli et al, 1991, J. Exp. Med., 173:751-754), 또는 델타-ActA, 델타 INL-b(Brockstedt et al, 2004, PNAS, 101 : 13832-13837)와 같은 감쇠된 *리스테리아* 균주가 본 발명에 사용된다. 다른 실시 양태에서, 감쇠된 *리스테리아* 균주는 1종 이상의 감쇠 돌연변이를 도입함으로써 구축되며, 이는 본원의 개시내용이 포함된 경우, 당해 기술분야의 당업자가 이해할 것이다. 이러한 균주의 예로는, 방향족 아미노산에 대한 영양요구성인 *리스테리아* 균주(Alexander et al, 1993, Infection and Immunity 10 61 :2245-2248) 및 리포테이코산(lipoteichoic acid)의 형성에 대한 돌연변이체(Abachin et al, 2002, Mol. Microbiol. 43: 1-14) 및 병원성 유전자의 결여에 의해 감쇠되는 것들(본원 실시예 참조)을 포함하나, 이로 한정되지 않는다.
- [0131] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 핵산 분자는 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 제1 개방형 해독들은 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 제2 개방형 해독들은 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된다. 다른 실시 양태에서, 개방형 해독들은 각각 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0132] 당업자는, 본 개시내용 및 본원의 방법이 제공되는 경우, 서로 다른 전사 프로모터, 종결자, 캐리어 벡터 또는 특이적 유전자 서열(예를 들어, 시판되는 클로닝 벡터의 서열)이 본 발명의 방법 및 조성물에서 성공적으로 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 본 발명에서 고려되는 바와 같이, 이들 작용기는 예를 들어, pUC 시리드로서 공지된 시판의 벡터에 제공된다. 다른 실시 양태에서, 비필수 DNA 서열(예를 들어, 항생제 내성 유전자)은 제거된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다. 다른 실시 양태에서, 시판의 플라스미드는 본 발명에 사용된다. 이러한 플라스미드는 Invitrogen(La Jolla, CA), Stratagene(La Jolla, CA), Clontech(Palo Alto, CA)과 같은 다양한 공급업체로부터 입수가 가능하거나, 또는 당해 기술분야에 잘 알려진 방법을 이용해 구축될 수 있다.
- [0133] 또 다른 실시 양태는, 원핵생물 유기체에서의 발현을 촉진하기 위한 프로모터/조절 요소 및 원핵생물 복제 기원을 갖춘 원핵생물 발현 벡터인 pCR2.1(Invitrogen, La Jolla, CA)과 같은 플라스미드이다. 다른 실시 양태에서, 외래의(extraneous) 뉴클레오타이드 서열이 제거되어, 플라스미드의 크기를 감소시키고, 위치할 수 있는 카세트의 크기를 증가시킨다.
- [0134] 이러한 방법들은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어, Sambrook 등(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 및 Ausubei 등(1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, New York)에 기술되어 있다.
- [0135] 항생제 내성 유전자는 분자생물학 및 백신 제조에 보편적으로 적용되는 종래의 선별 및 클로닝 과정에 사용된다. 본 발명에서 고려되는 항생제 내성 유전자로는, 앰피실린, 페니실린, 메시칠린(methicillin), 스트렙토마이신, 에리트로마이신, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜(CAT), 네오마이신, 하이그로마이신, 겐타마이신 및 당해 기술분야에 잘 공지된 다른 것들에 내성을 부여하는 유전자 산물을 포함하나, 이로 한정되지 않는다. 각각의 유전자는 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0136] 박테리아를 형질전환하는 방법은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있으며, 칼슘-클로라이드 컴피턴트(competent) 세포-기계의 방법, 전기천공 방법, 박테리오파지-매개의 형질도입, 화학적 형질전환 기술 및 물리적 형질전환 기술을 포함한다(de Boer et al, 1989, Cell 56:641-649; Miller et al, 1995, FASEB J., 9: 190-199; Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Ausubei et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Gerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). 다른 실시 양태에서, 본 발명의 *리스테리아* 백신 균주는 전기천공에 의해 형질전환된다. 각각의 방법은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0137] 다른 실시 양태에서, 공액은 유전적 물질 및/또는 플라스미드를 박테리아에 도입하는 데 사용된다. 공액 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Nikodinovic J 등(second generation snp-derived

Escherichia coli-*Streptomyces shuttle* expression vector that is generally transferable by conjugation. Plasmid. 2006 Nov;56(3):223-7) 및 Auchtung JM 등(Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug 30;102 (35): 12554-9)에 기술되어 있다. 각각의 방법은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0138] 일 실시 양태에서, "형질전환"은 용어 "형질감염"과 동일하게 사용되며, 플라스미드 또는 다른 이중성 DNA 분자를 취하도록 박테리아 세포를 조작하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "형질전환"은 플라스미드의 유전자 또는 다른 이중성 DNA 분자를 발현하도록 박테리아 세포를 조작하는 것을 지칭한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0139] 본 발명에 유용한 플라스미드 및 다른 발현 벡터는 본원에 기술되어 있으며, 프로모터/조절 서열, 그람 음성 박테리아 및 그람 양성 박테리아용 복제 기원, 융합 단백질을 코딩하는 분리된 핵산, 및 아미노산 대사 유전자를 코딩하는 분리된 핵산과 같은 특징부를 포함할 수 있다. 또한, 융합 단백질 및 아미노산 대사 유전자를 코딩하는 분리된 핵산은 이러한 분리된 핵산의 발현을 유도하는 데 적절한 프로모터를 가질 것이다. 박테리아 시스템에서 발현을 유도하는 데 유용한 프로모터는 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 이로는 박테리오파지 람다, pBR322의 베타-락타마제 유전자의 bla 프로모터, 및 pBR325의 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 유전자의 CAT 프로모터를 포함한다. 원핵생물 프로모터의 추가적인 예로는, 5 박테리오파지 람다의 주요 우측 프로모터 및 좌측 프로모터(PL 및 PR), *이. 콜라이(E. coli)*의 trp, recA, lacZ, lad, 및 gal 프로모터, 알파-아밀라제 (Ulmanen et al, 1985, J. Bacterid. 162: 176-182) 및 *비. 서브틸리스(B. subtilis)*의 S28-특이적 프로모터 (Oilman et al, 1984 Gene 32: 11-20), 바실러스의 박테리오파지의 프로모터(Gryczan, 1982, In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., New York), 및 스트렙토마이세스 프로모터(Ward et al, 1986, Mol. Gen. Genet. 203:468-478)를 포함한다. 본 발명에 고려되는 추가적인 원핵생물 프로모터는 예를 들어, Glick(1987, J. Ind. Microbiol. 1 :277-282); Cenatiempo(1986, Biochimie, 68:505-516); 및 Gottesman(1984, Ann. Rev. Genet. 18:415-442)에서 리뷰된다. 본 발명에 고려되는 프로모터/조절 요소에 대한 추가적인 예로는, *리스테리아* prfA 프로모터, *리스테리아* hly 프로모터, *리스테리아* p60 프로모터 및 *리스테리아* ActA 프로모터(젠뱅크 부여 번호 NC_003210) 또는 이들의 분절들을 포함하나, 이로 한정되지 않는다.

[0140] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 플라스미드는 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 부분서열은 클로닝되고, 적절한 부분서열은 적절한 제한 효소를 사용해 절단된다. 그런 다음, 다른 실시 양태에서, 상기 분절들은 연결되어, 원하는 DNA 서열이 생성된다. 다른 실시 양태에서, 항원을 코딩하는 DNA는 증합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 DNA 증폭 방법을 사용해 생성된다. 처음, 새로운 말단의 어느 한 면에 있는 본래의(native) DNA의 절편은 개별적으로 증폭된다. 하나의 증폭된 서열의 5' 말단은 펩타이드 링커를 코딩하며, 한편 다른 증폭된 서열의 3' 말단이 또한 펩타이드 링커를 코딩한다. 제1 분절의 5' 말단은 제2 분절의 3' 말단에 상보성이기 때문에, (예를 들어, LMP 아가로스 상에서의 부분적인 정제 후의) 2개의 분절들은 제3 PCR 반응에서 오버래핑 주형으로서 사용될 수 있다. 증폭된 서열은 코돈, (아미노 서열을 형성하는) 개방 부위의 카르복시 면의 절편, 링커, 및 (카르복시 서열을 형성하는) 개방 부위의 아미노 면의 서열을 포함할 것이다. 항원은 플라스미드에 연결된다. 각각의 방법은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0141] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 임상적 용도를 위한 파지-기체의 염색체 삽입 시스템을 추가로 포함한다. d-알라닌 라세마제를 포함하나 이로 한정되지 않는 필수 효소에 영양요구성인 숙주 균주, 예를 들어 Lmdal(-)dat(-)가 사용될 것이다. 다른 실시 양태에서, "파지 큐어링 단계(phage curing step)"를 피하기 위해, PSA를 기체로 하는 파지 삽입 시스템이 사용된다(Lauer, et al., 2002 J Bacteriol, 184:4177-4186). 다른 실시 양태에서, 이는, 삽입된 유전자를 유지하기 위해 항생제에 의한 지속적인 선별을 필요로 한다. 따라서, 다른 실시 양태에서, 본 발명은 항생제를 이용한 선별을 필요로 하지 않는 파지-기체의 염색체 삽입 시스템을 구축할 수 있게 한다. 대신에, 영양요구성 숙주 균주는 보완될 것이다.

[0142] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 단백질은 재조합 DNA 기술을 사용해 합성된다. 일 실시 양태에서, 이는, 융합 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 제조하는 단계, 본 발명의 플라스미드와 같은 발현 카세트에 DNA를 위치시키는 단계, 특정한 프로모터/조절 요소의 조절 하에, 상기 단백질을 발현시키는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 (예를 들어, 비-용혈성 LLO/항원)을 코딩하는 DNA는, 예를 들어, Narang 등 (1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99)의 포스포트리에스테르 방법; Brown 등의 포스포디에스테르 방법(1979, Meth. Enzymol 68: 109-151); Beaucage 등의 다이에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetra. Lett., 22: 15 1859-1862); 및 미국 특허 제4,458,066 호의 고품 지지체 방법과 같은 방법에 의한 직접적인 화학 합성 또는 적

절한 서열의 클로닝 및 제한을 비롯한 적절한 방법에 의해 제조된다.

- [0143] 다른 실시 양태에서, 화학적 합성이 이용되어, 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드가 생성된다. 다양한 실시 양태에서, 이러한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드는 상보성 서열과의 혼성화, 또는 상기 단일 가닥을 주형으로 사용하고 DNA 중합효소를 이용한 증합에 의해, 이중 가닥 DNA로 전환된다. 당해 기술분야의 당업자는, DNA의 화학적 합성은 약 100개의 염기로 된 서열로 한정되어 있으며, 보다 긴 서열은 짧은 서열들의 연결에 의해 수득될 수 있음을 인지할 것이다. 다른 실시 양태에서, 부분서열은 클로닝되고, 적절한 부분서열은 적절한 제한 효소를 사용해 절단된다. 그런 다음, 분절들이 연결되어, 원하는 DNA 서열이 생성된다.
- [0144] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 또는 재조합 단백질을 코딩하는 핵산은 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 DNA 증폭 방법을 사용해 클로닝된다. 따라서, 비-용혈성 LLO에 대한 유전자는, 적절한 제한 자리를 포함하는 센스 프라이머 및 또 다른 제한 자리, 예를 들어 클로닝을 촉진하기 위한 비-동일한 제한 자리를 포함하는 안티센스 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭된다. 항원을 코딩하는 분리된 핵산에서도 동일하게 반복된다. 비-용혈성 LLO 및 항원 서열의 연결, 및 플라스미드 또는 벡터에의 삽입으로, 항원의 말단에 결합된 비-용혈성 LLO를 코딩하는 벡터가 생성된다. 2개의 분자들은 제한 자리에 의해 도입된 짧은 스페이서에 의해 또는 직접 결합된다.
- [0145] 다른 실시 양태에서, 분자들은 1개 이상의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 스페이서에 의해 분리되며, 일반적으로 상기 스페이서는, 단백질을 결합하거나 또는 이들 간의 어느 정도의 최소 거리 또는 다른 공간적인 관계를 보존하는 것 외에는 다른 특이적인 생물학적 활성을 가지지 않을 것이다. 다른 실시 양태에서, 스페이서의 구성 아미노산은 접힘, 순전하, 또는 소수성과 같은, 분자의 일부 특성에 영향을 미치도록 선택된다. 다른 실시 양태에서, 융합 또는 재조합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 *이. 콜라이*, 다른 박테리아 속주, 예컨대 *리스테리아*, 효모, 및 COS, CHO 및 HeLa 세포주 및 골수종 세포주와 같은 다양한 고급 진핵생물 세포를 비롯하여, 여러 가지 속주 세포로 형질전환된다. 재조합 융합 단백질 유전자는 각각의 속주에 대한 적절한 발현 조절 서열에 작동적으로 연결될 것이다. 프로모터/ 조절 서열은 본원에 상세히 기술되어 있다. 다른 실시 양태에서, 플라스미드는 부가적인 프로모터 조절 요소, 뿐만 아니라 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 신호를 추가로 포함한다. 진핵생물 세포의 경우, 조절 서열은 프로모터, 및 번역글로불린 유전자, SV40, 사이토메갈로바이러스 등으로부터 유래되는 인핸서, 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 것이다. 다른 실시 양태에서, 상기 서열은 스플라이스 공여체 및 수용체 서열을 포함한다.
- [0146] 일 실시 양태에서, 용어 "작동적으로 연결된"은, 기술된 구성요소들이 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 병치 상태를 지칭한다. 코딩 서열에 "작동적으로 연결된" 조절 서열은, 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 상용성인 조건 하에 달성되도록 연결된다.
- [0147] 다른 실시 양태에서, 플라스미드를 포함하는 영양요구성 박테리아의 선별을 위해, 형질전환된 영양요구성 박테리아는 아미노산 대사 유전자의 발현에 대해 선별할 배지 상에서 성장된다. 다른 실시 양태에서, D-글루탐산 합성에 대해 영양요구성인 박테리아는 D-글루탐산 합성을 위한 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질전환되고, 영양요구성 박테리아는 D-글루탐산의 부재 하에 성장할 것이며, 반면, 플라스미드로 형질전환되지 않았거나, 또는 D-글루탐산 합성을 위한 단백질을 코딩하는 플라스미드를 발현하지 않는 영양요구성 박테리아는 성장하지 않을 것이다. 다른 실시 양태에서, D-알라닌 합성을 위한 영양요구성 박테리아는, 플라스미드가 D-알라닌 합성을 위한 아미노산 대사 효소를 코딩하는 분리된 핵산을 포함하는 경우, 본 발명의 플라스미드로 형질전환되어 이를 발현하는 경우, D-알라닌의 부재 하에 성장할 것이다. 필수 성장 인자, 보충제, 아미노산, 비타민, 항생제 등을 포함하거나 또는 포함하지 않는 적절한 배지를 제조하는 이러한 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 시판된다(Becton- Dickinson, Franklin Lakes, NJ). 각각의 방법은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0148] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 플라스미드를 포함하는 영양요구성 박테리아가 일단 적절한 배지 상에서 선별된다면, 상기 박테리아는 선택 압력 상에서 전파된다. 이러한 전파(propagation)는 영양요구성 인자를 포함하지 않는 배지에서 성장하는 박테리아를 포함한다. 영양요구성 박테리아에서 아미노산 대사 효소를 발현하는 플라스미드가 존재하면, 상기 플라스미드는 박테리아와 함께 복제될 것이며, 따라서, 플라스미드를 가지는 박테리아가 계속 선별될 것이다. 본 개시내용 및 방법이 갖추어지는 경우, 당해 기술분야의 당업자는, 플라스미드를 포함하는 영양요구성 박테리아가 성장하는 배지의 부피를 조정함으로써, 리스테리아 백신 벡터의 제조의 규모를 쉽게 증가시킬 것이다.
- [0149] 다른 실시 양태에서, 당해 기술분야의 당업자는, 다른 영양요구체 균주 및 보완 시스템이 본 발명의 사용을 위

해 조정됨을 알 것이다.

- [0150] 일 실시 양태에서, 대상에서 Her-2-발현 종양의 성장을 지연시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0151] 다른 실시 양태에서, 대상에서 Her-2-발현 종양의 성장을 지연시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0152] 다른 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu-발현 종양에 대한 강화된 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 보다 다른 실시 양태에서, Her2/neu-발현 종양에 대한 면역 반응은 Her2/neu 단백질의 아우성 에피토프 1종 이상에 대한 면역 반응을 포함한다.
- [0153] 일 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu를 과발현하는 종양의 치료에서 회피 돌연변이를 예방하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0154] 다른 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu 항원-발현 종양의 발병을 예방하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0155] 일 실시 양태에서, 종양내 T 조절 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0156] 다른 실시 양태에서, 종양내 T 조절 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0157] 일 실시 양태에서, 종양내 골수종 유래의 억제자 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0158] 다른 실시 양태에서, 골수종 유래의 억제자 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0159] 일 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu-발현 종양의 형성을 예방하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0160] 다른 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu-발현 종양의 형성을 예방하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0161] 일 실시 양태에서, 대상에서 Her2/neu-발현 종양의 형성을 치료하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본원에서 기술된 재조합 *리스테리아* 백신 균주를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0162] 일 실시 양태에서, 본 발명의 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 백신을 투여하는 방법을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드 또는 재조합 뉴클레오타이드를 투여하는 방법을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 조성물, 백신, 재조합 폴리펩타이드 또는 재조합 뉴클레오타이드를 투여하는 단계는 조성물, 백신, 재조합 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 재조합 폴리펩타이드를 발현하는 감쇠된 재조합 형태의 *리스테리아*를 이용해 수행되며, 각각은 그 자체의 개별적인 실시 양태에서 수행된다. 다른 실시 양태에서, 상기 투여는 서로 다른 감쇠된 박테리아 벡터로 수행된다. 다른 실시 양태에서, 상기 투여는 DNA 백신(예를 들어, 네이키드(naked) DNA 백신)으로 수행된다. 다른 실시 양태에서, 본 발명

의 재조합 폴리펩타이드의 투여는 단백질을 재조합적으로 생성하고, 그런 다음 상기 재조합 단백질을 대상에게 투여함으로써 수행된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

- [0163] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 유도되는 면역 반응은 CD8⁺ T 세포-매개의 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응은 CD8⁺ T 세포-매개의 반응으로 주로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응의 유일한 검출가능한 구성분은 CD8⁺ T 세포-매개의 반응이다.
- [0164] 다른 실시 양태에서, 본원에 제공되는 방법 및 조성물에 의해 유도되는 면역 반응은 CD4⁺ T 세포-매개의 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응은 CD4⁺ T 세포-매개의 반응으로 주로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응의 유일한 검출가능한 구성분은 CD4⁺ T 세포-매개의 반응이다. 다른 실시 양태에서, CD4⁺ T 세포-매개의 반응은 항원에 대한 측정가능한 항체 반응을 수반한다. 다른 실시 양태에서, CD4⁺ T 세포-매개의 반응은 항원에 대한 측정가능한 항체 반응을 수반하지 않는다.
- [0165] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 (a) Her2-neu 키메라 항원 또는 이의 분절을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자를, LLO 단백질의 N-말단 분절을 코딩하는 뉴클레오타이드 분자에 융합하여, LLO-항원 융합 단백질을 코딩하는 재조합 뉴클레오타이드를 제조하는 단계; 및 (b) 재조합 뉴클레오타이드 또는 LLO-항원 융합체를 대상에게 투여하여, 항원의 아우성 CD8⁺ T 세포 에피토프에 대한 CD8⁺ T 세포-매개의 면역 반응을 유도하는 단계를 포함하는, 대상에서 항원의 아우성 CD8⁺ T 세포 에피토프에 대한 CD8⁺ T 세포-매개의 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0166] 일 실시 양태에서, CD8⁺/T 조절 세포의 종양내 비율을 증가시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본 발명의 재조합 폴리펩타이드, 재조합 리스테리아, 또는 재조합 벡터를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0167] 다른 실시 양태에서, CD8⁺/T 조절 세포의 종양내 비율을 증가시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본 발명의 재조합 폴리펩타이드, 재조합 리스테리아, 또는 재조합 벡터를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0168] 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물에 의해 유도되는 면역 반응은 항원의 아우성 에피토프 1종 이상에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응은 우성 에피토프 1종 이상에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응은 아우성 에피토프 1종 이상에 대한 면역 반응으로 주로 이루어진다. 다른 실시 양태에서, 면역 반응의 유일한 측정가능한 구성분은 아우성 에피토프 1종 이상에 대한 면역 반응이다. 각각의 유형의 면역 반응은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0169] 면역 반응의 측정 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 이로는 예를 들어, 종양 성장의 억제의 측정, 유세포분석, 표적 세포 용해 분석법(예를 들어, 크롬 방출 분석법), 테트라머의 이용 등이 포함된다. 각각의 방법은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0170] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 대상에서 Her-2-발현 종양의 성장을 지연시키는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 Her-2 키메라 단백질 또는 이의 분절에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 분절을 포함하는 재조합 폴리펩타이드, 또는 상기 재조합 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 뉴클레오타이드를 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 대상은 Her-2-발현 종양에 대한 면역 반응을 측정하며, 상기 대상에서 Her-2-발현 종양을 지연시킨다.
- [0171] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 Her-2 키메라 단백질의 항원성을 개선하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 LLO 단백질의 N-말단 분절을 코딩하는 뉴클레오타이드를, Her-2 단백질 또는 이의 분절을 코딩하는 뉴클레오타이드에 융합하여, 재조합 뉴클레오타이드를 제조하여, Her-2 키메라 단백질의 항원성을 개선하는 단계를 포함한다.
- [0172] 다른 실시 양태에서, Her-2 키메라 단백질의 항원성을 개선하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 리스테리아 균주가 재조합 뉴클레오타이드를 발현하도록 조작하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 서로 다른 박테리아 벡터가 사용되어 재조합 뉴클레오타이드를 발현한다. 다른 실시 양태에서, 박테리아 벡터는 감쇠된다. 다른 실시 양태에서, DNA 백신(예를 들어, 네이키드 DNA 백신)이 사용되어, 재조합 뉴클레오타이드

드를 발현한다. 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 LLO-Her-2 키메라 융합 펩타이드의 투여는, 단백질을 재조합적으로 제조한 다음, 상기 재조합 단백질을 대상에게 투여함으로써 수행된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0173] 일 실시 양태에서, 본 발명은 종양의 "에피토프 확산" 방법을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 조성물 및 방법을 사용하는 면역화는, 본 발명의 백신에서 수행되는 항원 이외의 항원을 가지는 다른 종양으로 에피토프가 확산되는 것을 유도한다.

[0174] 다른 실시 양태에서, 우성 에피토프 또는 아우성 에피토프는 각각 치료를 받는 대상에서 우성 또는 아우성이다. 다른 실시 양태에서, 우성 에피토프 또는 아우성 에피토프는 치료를 받는 집단에서 우성 또는 아우성이다.

[0175] 일 실시 양태에서, 대상에서 에피토프 확산에 의해 암 또는 종양의 성장을 치료, 억제, 또는 저해하는 방법을 제공하며, 다른 실시 양태에서, 상기 암은 본 발명의 조성물에 포함되는 항원 또는 이의 분질의 발현과 관련이 있다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 본 발명의 재조합 폴리펩타이드, 재조합 리스테리아, 또는 재조합 박테리를 포함하는 조성물을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 보다 다른 실시 양태에서, 상기 대상은 항원-발현 암 또는 항원-발현 종양에 대한 면역 반응을 촉진하여, 종양의 성장을 대상에서 치료, 억제 또는 저해한다.

[0176] 일 실시 양태에서, "우성 CD8⁺ T 세포 에피토프"는, 단백질, 또는 상기 단백질을 포함하는 병원체 또는 암 세포를 이용한 백신화, 감염, 또는 악성 성장에 의해 유도되는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 30% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 이로 인해 유도되는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 35% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 40% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 45% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 50% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 55% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 60% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 65% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 70% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 75% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 80% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 85% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 90% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 95% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 96% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 97% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 98% 이상에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다.

[0177] 일 실시 양태에서, "아우성 CD8⁺ T 세포 에피토프"는, 단백질, 또는 상기 단백질을 포함하는 병원체 또는 암 세포를 이용한 백신화, 감염, 또는 악성 성장에 의해 유도되는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 30% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 28% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 26% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 24% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 22% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 20% 미만

에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 18% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 16% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 14% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 12% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 10% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 8% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 6% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 5% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 4% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 3% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 2% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 1% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 중 0.5% 미만에 의해 인지되는 에피토프를 지칭한다.

[0178] 각각의 유형의 우성 에피토프 및 아우성 에피토프는 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0179] 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물에서 항원은 대상의 비-종양 세포에서 검출가능한 수준으로 발현된다. 다른 실시 양태에서, 항원은 대상의 비-종양 세포에서 적어도 소정의 %(예를 들어, 0.01%, 0.03%, 0.1%, 0.3%, 1%, 2%, 3%, 또는 5%)의 검출가능한 수준으로 발현된다. 일 실시 양태에서, "비-종양 세포"는 상기 종양의 덩어리(body) 외부에 있는 세포를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "비-종양 세포"는 비-악성 세포를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "비-종양 세포"는 비-형질전환된 세포를 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 비-종양 세포는 체세포이다. 다른 실시 양태에서, 비-종양 세포는 생식세포이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0180] 일 실시 양태에서, "검출가능한 수준"은 표준 분석법에 의해 검출가능한 수준을 지칭한다. 일 실시 양태에서, 상기 분석법은 면역학적 분석법이다. 일 실시 양태에서, 상기 분석법은 효소-결합 면역분석법(ELISA)이다. 다른 실시 양태에서, 상기 분석법은 웨스턴 블롯이다. 다른 실시 양태에서, 상기 분석법은 FACS이다. 당해 기술 분야의 당업자는, 당해 기술분야에 이용가능한 다른 분석법이 본원에서 제공되는 방법에 이용될 수 있음을 이해한다. 다른 실시 양태에서, 검출가능한 수준은 특정한 분석법의 배경 수준에 대해 측정된다. 이들 기술을 각각 수행하기 위한 방법은 당해 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있으며, 각각의 기술은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0181] 일 실시 양태에서, 재조합 항원-발현 LM을 이용한 백신화는 에피토프 확산을 유도한다. 다른 실시 양태에서, LLO-항원 융합체를 이용한 백신화는 Her2의 문맥에서 벗어나더라도, 에피토프 확산을 또한 유도한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0182] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 Her-2 키메라 항원에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 분절을 포함하는 재조합 폴리펩타이드를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 Her-2-발현 종양의 성장을 지연시키는 방법을 제공하며, 항원은 아우성 CD8⁺ T 세포 에피토프를 1종 이상 포함하며, 상기 대상은 항원-발현 종양에 대한 면역 반응을 촉진하여, 대상에서 Her-2-발현 종양의 성장을 지연시킨다. 다른 실시 양태에서, 상기 항원은 우성 CD8⁺ T 세포 에피토프를 포함하지 않는다. 다른 실시 양태에서, 본원에서 제공되는 재조합 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 형태의 리스테리아를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 Her-2-발현 종양의 성장을 지연시키는 방법을 제공한다.

[0183] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 숙주에게 투여하여, 암을 가진 숙주에서 세포독성 T 세포의 형성을 유도하는 단계를 포함하는, 암을 가진 숙주에서 세포독성 T 세포의 형성을 유도하는 방법을 제공한다.

- [0184] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암의 발병률을 저하시키는 방법을 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 완화시키는 방법을 제공한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0185] 일 실시 양태에서, 상기 조성물은 생체외에서 대상의 세포에 투여되며; 다른 실시 양태에서, 상기 조성물은 생체외에서 공여자의 세포에 투여되며; 다른 실시 양태에서, 상기 조성물은 생체내에서 공여자의 세포에 투여된 다음, 상기 대상에게 전달된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0186] 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 치료되는 암은 유방암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 Her2를 함유하는 암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 흑색종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 췌장암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 난소암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 위암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 췌장의 암성 병변이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 폐선암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 결장직장선암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 폐편평선암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 위선암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 난소 표면 상피 신생물(예를 들어, 이의 양성, 증식성 또는 악성 변형물)이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 경구 편평세포암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 비소세포폐암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 CNS 암종이며, 다른 실시 양태에서, 상기 암은 자궁내막암종이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 방광암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 두경부암이다. 다른 실시 양태에서, 상기 암은 전립선암종이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0187] 본 발명의 방법의 다른 실시 양태에서, 상기 대상은 항원-발현 종양 또는 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하여, 항-종양 효과를 매개한다.
- [0188] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 암 치료용 면역원성 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 절단된 LL0를 Her-2 키메라 단백질에 융합한 것을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 면역원성 조성물은 융합체를 발현하는 *리스테리아* 균주를 추가로 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 암 치료용 면역원성 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 Her-2 키메라 단백질을 발현하는 *리스테리아* 균주를 포함한다.
- [0189] 일 실시 양태에서, 본 발명의 치료 프로토콜은 치료용이다. 다른 실시 양태에서, 상기 프로토콜은 예방용이다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 백신은, 가족 유전적으로 또는 당해 기술분야의 당업자가 이해하는 바와 같이 이들 유형의 질병에 걸리게 할 만한 다른 환경적인 이유로 인해, 유방암과 같은 암, 또는 다른 유형의 Her2-함유 종양에 걸릴 위험이 있는 사람을 보호하는 데 사용된다. 다른 실시 양태에서, 백신은, 수술, 종래의 화학치료법 또는 방사선 치료에 의해 종양의 성장을 일부 제거한 후, 암의 면역치료법에 사용된다. 이러한 치료 후, 본 발명의 백신은, 백신의 종양 항원에 대한 CTL 반응이, 잔존하는 전이를 파괴하고 암의 차도를 연장시키도록, 투여된다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 백신은 이미 구축된 종양의 성장에 영향을 미치고, 기존의 종양 세포를 살해하는 데 사용된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0190] 다른 실시 양태에서, 전술한 방법에 이용되는 백신 및 면역원성 조성물은 본 발명의 백신 및 면역원성 조성물의 특징을 가진다. 각각의 특징은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.
- [0191] 투여량 범위에 관한 여러 가지 실시 양태는 본 발명에 의해 고려된다. 일 실시 양태에서, 백신 벡터의 경우, 투여량의 범위는 약 0.4 LD₅₀/투여이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 0.4-4.9 LD₅₀/투여이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 0.5-0.59 LD₅₀/투여이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 0.6-0.69 LD₅₀/투여이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 0.7-0.79 LD₅₀/투여이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 0.8 LD₅₀/투여이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 0.4 LD₅₀/투여 내지 0.8 LD₅₀/투여이다.
- [0192] 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1.5 x 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 2 x 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 3 x 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 4 x 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 6 x 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 8 x 10⁷ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1 x 10⁸ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1.5 x 10⁸ 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 2 x 10⁸ 박테리아/투여량이다. 다른 실

시 양태에서, 투여량은 약 3×10^8 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 4×10^8 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 6×10^8 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 8×10^8 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1.5×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 2×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 3×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 5×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 6×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 8×10^9 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1.5×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 2×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 3×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 5×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 6×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 8×10^{10} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1×10^{11} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 1.5×10^{11} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 2×10^{11} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 3×10^{11} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 5×10^{11} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 6×10^{11} 박테리아/투여량이다. 다른 실시 양태에서, 투여량은 약 8×10^{11} 박테리아/투여량이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0193] 일 실시 양태에서, 본 발명의 백신 및 면역원성 조성물은 대상에게 단독으로 투여된다. 다른 실시 양태에서, 백신 또는 면역원성 조성물은 또 다른 암 치료법과 함께 투여된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0194] 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 제조합 리스테리아는 Her-2 키메라 항원 또는 LLO-Her-2 키메라 항원 융합체를 코딩하는 구축물로 안정하게 형질전환된다. 일 실시 양태에서, 상기 구축물은 서브클로닝을 추가로 촉진하기 위해 폴리링커를 포함한다. 제조합 리스테리아를 제조하는 몇몇 기술들이 알려져 있다.

[0195] 일 실시 양태에서, 구축물 또는 핵산 분자는 상동 제조합을 이용해 리스테리아 염색체에 삽입된다. 상동 제조합 기술은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Baloglu S, Boyle SM 등(Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial Listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet Microbiol* 2005, 109(1-2): 11-7); 및 Jiang LL, Song HH, 등(Characterization of a mutant *Listeria monocytogenes* strain expressing green fluorescent protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005, 37(1): 19-24)에 기술되어 있다. 다른 실시 양태에서, 상동 제조합은 미국 특허 제6,855,320 호에 제공된 상세한 설명에 따라 수행된다. 이 경우, E7을 발현하는 제조합 LM 균주는 유전자 산물의 분비를 보장하기 위해 hly 프로모터의 조절 하에 hly 신호 서열을 포함한 조건에서, E7 유전자의 염색체 삽입에 의해 제조되어, Lm-AZ/E7으로 지칭되는 제조합을 수득한다. 다른 실시 양태에서, 온도 민감성 플라스미드가 사용되어, 제조합을 선별한다. 각각의 기술은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0196] 다른 실시 양태에서, 구축물 또는 핵산 분자는 트랜스포존 삽입을 이용해 리스테리아 염색체에 삽입된다. 트랜스포존 삽입 기술은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 즉, DP-L967의 구축에서 Sun 등(*Infection and Immunity* 1990, 58: 3770-3778)에 의해 기술되어 있다. 다른 실시 양태에서, 트랜스포존 돌연변이화는, 안정한 계놈 삽입 돌연변이체가 형성될 수 있다는 이점이 있지만, 외래 유전자가 삽입된 계놈의 위치가 알려지지 않는 단점이 있다.

[0197] 다른 실시 양태에서, 구축물 또는 핵산 분자는 파지 삽입 부위를 이용하여 리스테리아 염색체에 삽입된다(Lauer P, Chow MY et al, Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vector. *J Bacteriol* 2002;184(15): 4177-86). 이러한 방법의 소정의 실시 양태에서, 박테리오파지(예를 들어, U153 또는 PSA 리스테리오파지)의 결합 부위 및 인테그라제 유전자가 사용되어, 이중성 유전자는 계놈에서 적절한 부위(예를 들어, arg tRNA 유전자의 3' 말단 또는 comK)일 수 있는 상용하는 결합 부위

에 삽입된다. 다른 실시 양태에서, 내인성 프로파지는, 구축물 또는 이중성 유전자의 삽입 전에 이용되는 결합 부위로부터 큐어링(curing)된다. 다른 실시 양태에서, 이러한 방법으로 단일-카피 인테그란트(integrant)가 생성된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0198] 다른 실시 양태에서, 여러 가지 프로모터 중 하나가 사용되어, 항원, 또는 항원을 포함하는 융합 단백질이 발현된다. 일 실시 양태에서, *리스테리아* 단백질 헤모리신, actA, 포스포티딜이노시톨-특이적 포스포리파제, 포스포리파제 C, 및 메탈로프로테아제를 각각 코딩하는, hly, actA, plca, plcB 및 mpl 유전자에 대한 프로모터와 같은 LM 프로모터가 사용된다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0199] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 본 발명의 Her-2 키메라 단백질 또는 LL0 서열의 호모로그를 이용한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 인간이 아닌 포유류 유래의 Her-2 키메라 단백질을 이용한다. 일 실시 양태에서, 단백질 또는 펩타이드에 관하여 언급할 경우, 용어 "상동성", "상동성인" 등은, 서열 동일성의 부분으로서 보존적 치환을 고려하지 않으면서, 서열의 정렬, 및 필요한 경우 최대의 상동성%를 달성하기 위한 갭의 도입 이후, 상응하는 본래의 폴리펩타이드의 잔기와 동일한 후보(candidate) 서열의 아미노산 잔기의 %를 지칭한다. 정렬 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0200] 다른 실시 양태에서, 핵산 서열에 관하여 언급할 경우, 용어 "상동성"은 마찬가지로, 상응하는 본래의 핵산 서열의 뉴클레오타이드와 동일한, 후보 서열의 뉴클레오타이드의 %를 나타낸다.

[0201] 일 실시 양태에서, 상동성은 당해 기술분야에 기술된 방법에 의해 서열 정렬에 대한 컴퓨터 알고리즘에 의해 측정된다. 예를 들어, 핵산 서열 상동성의 컴퓨터 알고리즘 분석은 예를 들어, BLAST, DOMAIN, BEAUTY(BLAST Enhanced Alignment Utility), GENPEPT 및 TREMBL 패키지와 같은 많은 시판의 소프트웨어 패키지를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[0202] 다른 실시 양태에서, "상동성"은 서열 번호: 1-4로부터 선택되는 서열에 대한 동일성이 70%가 넘는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "상동성"은 서열 번호: 1-4로부터 선택되는 서열에 대한 동일성이 72% 초과임을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 75% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 78% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 80% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 82% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 83% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 85% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 87% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 88% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 90% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 92% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 93% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 95% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 96% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 97% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 98% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 99% 초과이다. 다른 실시 양태에서, 동일성은 100%이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0203] 다른 실시 양태에서, 상동성은 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 방법인 후보 서열 혼성화의 측정을 통해 측정된다(예를 들어, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; 및 Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y 참조). 예를 들어, 혼성화 방법은 본래의 카스파제 펩타이드를 코딩하는 DNA의 상보성에 대한 중간 정도 내지 엄격한 조건 하에 수행될 수 있다. 혼성화 조건은, 예를 들어, 10-20% 폼아미드, 5 X SSC(150 mM NaCl, 15 mM 트리소듐 시트레이트), 50 mM 소듐 포스페이트(pH 7.6), 5 X Denhardt's 용액, 10% 텍스트란 설페이트, 및 20 µg/ml 변성된, 웨어드 살몬 스펀(sheared salmon sperm) DNA를 포함하는 용액에서 42°C에서 밤새 인큐베이션하는 것이다.

[0204] 본 발명의 일 실시 양태에서, "핵산"은 염기-당-포스페이트 조합 2개 이상으로 이루어진 스트링(string)을 지칭한다. 일 실시 양태에서, 상기 용어는 DNA 및 RNA를 포함한다. 일 실시 양태에서, "뉴클레오타이드"는 핵산 중합체의 단량체 단위를 지칭한다. 일 실시 양태에서, RNA는 tRNA(트랜스퍼 RNA), snRNA(작은 핵 RNA(small nuclear RNA)), rRNA(리보솜 RNA), mRNA(메신저 RNA), 안티-센스 RNA, 작은 저해 RNA(small inhibitory RNA, siRNA), 마이크로 RNA(miRNA) 및 리보솜 형태일 수 있다. siRNA 및 miRNA의 사용은 기술된 바 있다(Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 및 이에 기술된 문헌 참조). DNA는 플라스미드 DNA, 바이러스 DNA, 선형 DNA, 또는 염색체 DNA 또는 이들 그룹의 유도체 형태일 수 있다. 또한, 이들 형태의 DNA 및 RNA는 단일 가닥, 이중 가닥, 삼중 가닥, 또는 사중 가닥일 수 있다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 또한, 염기는 동일하지만 다른 유형의 백본을 포함할 수 있는 인공 핵산을 포함한다. 일 실시 양태에서, 인공 핵산은 PNA(펩타이드 핵산)이다. PNA는 펩타이드 백본 및 뉴클레오타이드 염기를 포함하며, 일 실시 양태에서, DNA 및 RNA 분자 모

두에 결합할 수 있다. 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드는 옥세탄으로 개질된다. 다른 실시 양태에서, 뉴클레오타이드는 하나 이상의 포스포다이에스테르 결합을 포스포티오에이트 결합으로 대체함으로써 개질된다. 다른 실시 양태에서, 인공 핵산은 당해 기술분야에 알려진 본래의 핵산의 포스페이트 백본의 다른 변이체를 포함한다. 포스포티오에이트 핵산 및 PNA의 사용은 당해 기술분야의 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어, Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; 및 Raz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297: 1075-84에 기술되어 있다. 핵산의 제조 및 사용은 당해 기술분야의 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어, Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. and Methods in Enzymology: Methods for molecular Cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio and G. C. Fareed에 기술되어 있다. 각각의 핵산 유도체는 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0205] 일 실시 양태에서, 본원에서 열거되는 아미노산 서열에 상동성인 단백질 및/또는 펩타이드는 면역블롯 분석, 또는 아미노산 서열의 컴퓨터 알고리즘 분석을 통해, 많은 시판되는 소프트웨어 패키지를 이용하여 구축된 방법을 통해 당해 기술분야에 잘 기술된 방법에 의해 측정된다. 이들 패키지 중 일부는 FASTA, BLAST, MPsrch 또는 Scanps 패키지를 포함할 수 있으며, 예를 들어, Smith 및 Waterman 알고리즘, 및/또는 분석용 글로벌/로컬 또는 BLOCKS 정렬의 사용을 적용할 수 있다. 상동성을 측정하는 방법은 각각 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0206] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 수행하는 데 이용되는 시약을 포함하는 키트를 제공한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물, 튜브, 또는 장비를 포함하는 키트를 제공한다.

[0207] 일 실시 양태에서, 용어 "접촉시키는" 또는 "투여하는"은, 암 세포 또는 종양을 본 발명의 조성물과 직접 접촉시키는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 상기 용어는 암 세포 또는 종양을 본 발명의 조성물과 간접적으로 접촉시키는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은, 본 발명의 조성물을 암 세포 또는 종양과 접촉시킨 후, 화합물이 체내에서 순환하는, 당해 기술분야에 알려진 기타 능동 수송 또는 수동 수송 방법 또는 확산에 의해, 상기 조성물을 암 세포 또는 종양과 접촉시키는 방법을 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

[0208] 다른 실시 양태에서, 용어 "유전자" 및 "재조합 유전자"는 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 개방형 해독틀을 포함하는 핵산 분자를 지칭한다. 이러한 천연적인 대립유전자 변이체는 전형적으로, 해당 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 1% 내지 5% 정도 변형시킨다. 대안적인 대립유전자는 많은 서로 다른 개체 또는 유기체에서 흥미 있는 유전자를 서열분석함으로써 확인될 수 있다. 이는 혼성화 프로브를 사용하여 쉽게 수행되어, 다양한 개체 또는 유기체에서 동일한 유전자를 확인할 수 있다. 이러한 뉴클레오타이드 변이체 및 생성되는 아미노산 다형체, 또는 천연적인 대립유전자 변이의 결과인 변이체 및 기능적인 활성을 변경하지 않는 변이체는 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

[0209] **약학 조성물**

[0210] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 백신 및 조성물을 포함하는 약학 조성물은 당해 기술분야의 당업자에게 알려진 방법, 예컨대 비경구, 암주변, 경점막, 경피, 근육내, 정맥내, 피내, 피하, 복강내, 뇌실내, 두개내, 질내 또는 종양내로 대상에게 투여된다.

[0211] 본원에서 제공되는 방법 및 조성물의 다른 실시 양태에서, 백신 또는 조성물은 경구 투여되며, 따라서, 경구 투여에 적절한 형태, 즉, 고체 또는 액체 제제로 제형된다. 적절한 고체 경구 제형은 정제, 캡슐, 알약, 파립, 펠렛 등을 포함한다. 적절한 액체 경구 제형은 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전, 오일 등을 포함한다. 본 발명의 다른 실시 양태에서, 활성 성분은 캡슐에서 제형된다. 이러한 실시 양태에 따르면, 본 발명의 조성물은 활성 화합물 및 불활성 담체 또는 희석제 외에도 경성 젤화 캡슐을 포함한다.

[0212] 다른 실시 양태에서, 백신 또는 조성물은 액체 제제의 정맥내, 동맥내, 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 적절한 액체 제형은 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전, 오일 등을 포함한다. 일 실시 양태에서, 약학 조성물은 정맥내로 투여되므로, 따라서 정맥내 투여에 적절한 형태로 제형된다. 다른 실시 양태에서, 약학 조성물은 동맥내로 투여되므로, 따라서 동맥내 투여에 적절한 형태로 제형된다. 다른 실시 양태에서, 약학 조성물은 근육내로 투여되므로, 따라서 근육내 투여에 적절한 형태로 제형된다.

[0213] 일 실시 양태에서, 용어 "치료하는"은 질병을 치유하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은 질병을 예방하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은 질병의 발병률을 저하시키는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은 질병의 증상을 완화하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은

환자의 무-거동 생존율(performance free survival) 또는 전반적인 생존율을 증가시키는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은 질병의 진행을 안정화시키는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은 차도(remission)를 유도하는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, "치료하는"은 질병의 진행을 서행시키는 것을 지칭한다. 다른 실시 양태에서, 용어 "감소시키는", "억제하는" 및 "저해하는"은 저하시키거나 또는 감소시키는 것을 지칭한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 실시 양태를 나타낸다.

- [0214] 본원에서, 용어 "약"은 정량적인 면에서 $\pm 5\%$ 를 의미하거나, 또는 다른 실시 양태에서 $\pm 10\%$, 또는 다른 실시 양태에서 $\pm 15\%$, 또는 다른 실시 양태에서 $\pm 20\%$ 를 의미한다.
- [0215] 일 실시 양태에서, 용어 "대상"은 증상 또는 이의 후유증에 대한 치료를 필요로 하거나 또는 치료를 받을 만한, 개를 포함한 포유류를 지칭한다. 상기 대상은 다양한 품종의 개, 늑대, 고양이, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 래트, 및 마우스를 비롯한 동물, 및 인간을 포함할 수 있다. 용어 "대상"은 모든 면에서 정상적인 개체를 배제하지 않는다.
- [0216] 일 실시 양태에서, 치료 목적에서 용어 "포유류"는, 인간, 가축 및 농장용 가축, 동물원 동물, 스포츠 동물 또는 애완 동물, 예컨대 개를 비롯한 개과, 및 말, 고양이, 소, 돼지, 양 등을 비롯한 동물로서 분류되는 동물을 지칭한다.
- [0217] 일 실시 양태에서, 개과는 성인 개 또는 새끼 개일 수 있다.
- [0218] 종양의 치료와 관련하여, "치료적 유효량"은 하기 효과들 중 하나 이상을 초래할 수 있는 양을 지칭한다: (1) 종양의 성장의 지연 및 성장의 완전한 억제를 비롯하여, 종양 성장의 어느 정도의 저해; (2) 종양 세포 수의 감소; (3) 종양 크기의 감소; (4) 종양 세포가 주변 기관으로 침윤되는 것의 저해 (즉, 감소, 서행 또는 완전한 중지); (5) 전이의 저해(즉, 감소, 서행 또는 완전한 중지); (6) 종양의 억제 또는 거부를 초래할 수 있지만 요구되지 않는, 항-종양 면역 반응의 강화; 및/또는 (7) 장애와 관련된 1종 이상의 증상의 어느 정도의 완화. 종양 치료를 목적으로 하는 본원에서 제공되는 백신의 "치료적 유효량"은 경험적으로, 일반적인 방식으로 측정될 수 있다.
- [0219] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시 양태를 보다 완전히 예시하고자 제시된 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 광범위한 범위를 어떤 식으로 한정하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0220] **실시예**

[0221] 재료 및 방법

[0222] 올리고뉴클레오타이드는 Invitrogen (Carlsbad, CA)에 의해 합성하였으며, DNA 서열분석은 Genewiz Inc, South Plainfield, NJ에 의해 수행하였다. 유세포분석 시약은 Becton Dickinson Biosciences(BD, San Diego, CA)로부터 구입하였다. 세포 배양 배지, 보충제 및 다른 모든 시약들은 지시되지 않는 한, Sigma(St. Louise, MO)로부터 구입하였다. Her2/neu HLA-A2 펩타이드는 EZbiolabs(Westfield, IN)에 의해 합성하였다. 완전한 RPMI 1640(C-RPMI) 배지는 2 mM 글루타민, 0.1 mM 비필수 아미노산, 및 1 mM 소듐 피루베이트, 10% 태아 소 혈청, 페니실린/스트렙토마이신, HEPES(25mM)을 포함하였다. 폴리클로날 항-LL0 항체는 이전에 기술되었으며, 항-Her2/neu 항체는 Sigma로부터 구입하였다.

[0223] **마우스 및 세포주**

[0224] 모든 동물 실험들은 펜실베이니아 대학 또는 루트거 대학에서 IACUC에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다. FVB/N 마우스 잭슨 실험실(Jackson laboratories)(Bar Harbor, ME)에서 구입하였다. 래트 Her2/neu 종양단백질을 과발현하는 FVB/N Her2/neu 유전자도입 마우스는 펜실베이니아 대학에서 동물 핵심 시설에서 관리하고 양육하였다. 래트 Her2/neu 단백질을 높은 수준으로 발현하는 NT-2 종양 세포주는 이들 마우스에서 자발적인 유방 종양으로부터 유래되었으며, 전술한 바와 같이 성장시켰다. DHFR-G8(3T3/neu) 세포는 ATCC로부터 입수하였으며, ATCC 권고사항에 따라 성장시켰다. EMT6-Luc 세포주는 Dr. John Ohlfest(University of Minnesota, MN)로부터 기여받았으며, 완전한 C-RPMI 배지에서 성장시켰다. 생물발광 작업은 펜실베이니아 대학교(Philadelphia, PA)에서 소동물 영상 시설(Small Animal Imaging Facility, SAIF)에 의한 지침 하에 수행하였다.

[0225] **리스테리아 구축물 및 항원 발현**

[0226] Her2/neu-pGEM7Z은 감사하게도 펜실베이니아 대학교의 Dr. Mark Greene으로부터 제공받았으며, pGEM7Z 플라스미드

(Promega, Madison WI)에 클로닝된 전장 인간 Her2/neu(hHer2) 유전자를 포함하고 있었다. 이 플라스미드를 주형으로 사용하여, 표 1의 pfx DNA 중합효소(Invitrogen) 및 올리고를 사용하여 PCR에 의해 hHer-2/neu의 3개의 절편, 즉 EC1, EC2, 및 IC1을 증폭시켰다.

[0227] 표 1: 인간 her-2-키메라의 클로닝을 위한 프라이머

표 1

	DNA 서열	염기쌍 영역	아미노산 영역 또는 접합부 (junction)
Her-2-키메라(F)	TGATCTCGAGACCCACCTGGACATGCTC (SEQ ID NO: 57)	120-510	40-170
HerEC1-EC2F (접합부)	CTACCAGGACACGATTTTGTGGAAG-AATATCCA GGAGTTTGTCTGGCTGC (SEQ ID NO: 58)	510/1077	170/359
HerEC1-EC2R (접합부)	GCAGCCAGCAAACCTCCTGGATATT-CTCCACAA AATCGTGTCC'GGTAG (SEQ ID NO: 59)		
HerEC2-IC1F (접합부)	CTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGG-CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGA (SEQ ID NO: 60)	1554/2034	518/679
HerEC2-IC1R (접합부)	TCGTGTACTTCCGGATCTTCTGCTG CCCTCGGGC GCACAGCTGGTGGCAG (SEQ ID NO: 61)		
Her-2-키메라 (R)	GTGGCCCGGGTCTAGATTAGTCTAAGAGGCAGCCATAGG (SEQ ID NO: 62)	2034-2424	679-808

[0228]

[0229] Her-2/neu 키메라 구축물은 SOEing PCR 방법에 의한 직접 융합에 의해 제조하였으며, 각각은 hHer-2/neu 절편을 주형으로서 분리한다. 프라이머는 표 2에 나타나 있다.

표 2

	DNA 서열	염기쌍 영역	아미노산 영역
Her-2-EC1(F)	CCGCCTCGAGGCCGCGAGCACCCAAGTG (SEQ ID NO: 63)	58-979	20-326
Her-2-EC1(R)	CGCGACTAGTTTAATCCTCTGCTGTCACCTC (SEQ ID NO: 64)		
Her-2-EC2(F)	CCGCCTCGAGTACCTTTCTACGGACGTTG (SEQ ID NO: 65)	907-1504	303-501
Her-2-EC2(R)	CGCGACTAGTTTACTCTGGCCGGTTGGCAG (SEQ ID NO: 66)		
Her-2-Her-2-IC1(F)	CCGCCTCGAGCAGCAGAAGATCCGGAAGTAC (SEQ ID NO: 67)	2034-3243	679-1081
Her-2-IC1(R)	CGCGACTAGTTTAAGCCCTTCGGAGGGTG (SEQ ID NO: 68)		

[0230]

[0231] ChHer2 유전자는 XhoI 및 SpeI 제한 효소를 사용하여 pAdv138로부터 절단하였으며, 이를 *Lmdd* 서플 벡터인 pAdv134의 LL0의 절단된, 비-용혈성 분절과 프레임에서 클로닝하였다. 흥미있는 서열, LL0 및 hly 프로모터는 DNA 서열 분석으로 확인하였다. 이 플라스미드는 전기-컴피턴트 *actA*, *dal*, *dat* 돌연변이체 *리스테리아 모노사이토제네스* 균주, *LmddA*에 전기천공하고, 스트렙토마이신(250 µg/ml)을 포함하는 뇌 심장 침출(BHI) 한천 플레이트 상에서 양성 클론들을 선별하였다. 일부 실험에서, 비교를 위해 hHer2/neu(Lm-hHer2) 분절을 발현하는 유사한 *리스테리아* 균주를 사용하였다. 이들은 전술한 바 있다. 모든 연구에서, 관련이 없는 *리스테리아* 구축물 (Lm-대조군)을 포함하여, 면역계에 대한 *리스테리아*의 항원 독립적인 효과를 설명하였다. Lm-대조군은 ADXS31-

164와 동일한 *리스테리아* 플랫폼을 기제로 하였으나, HPV16-E7 또는 NY-ESO-1과 같은 서로 다른 항원을 발현하였다. *리스테리아*로부터의 융합 단백질의 발현 및 분비를 시험하였다. 구축물은 각각 생체내에서 2회 계대배양하였다.

[0232] **세포독성 분석법**

[0233] 3-5 FVB/N 마우스의 군들에게 1주 간격으로, 1×10^8 콜로니 형성 단위(CFU)의 Lm-LLO-ChHer2, ADXS31-164, Lm-hHer2 ICI 또는(관련이 없는 항원을 발현하는) Lm-대조군으로 3회 면역화하였으며, 또는 네이브한 상태로 놔두었다. NT-2 세포를 시험관내에서 성장시켰으며, 트립신을 이용해 떼어낸 후, 37°C에서 45분 동안 미토마이신 C(혈청-무함유 C-RPMI 배지 중 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. 5회 세정한 후, 이들을 면역화된 동물 또는 네이브 동물로부터 수집한 비장세포와 함께 1 : 5(자극물질: 반응물질)의 비율로 37°C, 5% CO₂에서 5일 동안 함께 인큐베이션하였다. 표준 세포독성 분석법은 유로퓸(europium)으로 표지된 3T3/neu(DHFR-G8) 세포를 표적으로 사용하여, 전술한 방법에 따라 수행하였다. 살해된 표적 세포로부터 방출되는 유로퓸은 4시간 동안 인큐베이션한 후 590 nm에서 분광계(Perkin Elmer, Victor2)를 사용해 측정하였다. 특이적인 용해%는 (실험군에서의 용해 - 자발적인 용해)/(최대 용해 - 자발적인 용해)로 정의하였다.

[0234] **면역화된 마우스로부터 비장세포에 의한 인터페론- γ 분비**

[0235] 3-5 FVB/N 또는 HLA-A2 유전자도입 마우스의 군들은 1주 간격으로, 1×10^8 CFU의 ADXS31-164, (관련이 없는 항원을 발현하는) 음성 *리스테리아* 대조군으로 3회 면역화하였으며, 또는 네이브한 상태로 놔두었다. 마지막으로 면역화한 후 1주째에 FVB/N 마우스의 비장세포를 분리한 다음, C-RPMI 배지 중 미토마이신 C로 처리된 NT-2 세포의 존재 하에 5×10^6 세포/웰로 24웰 플레이트에서 함께 배양하였다. HLA-A2 유전자도입 마우스의 비장 세포는 1 μM 의 HLA-A2 특이적 펩타이드 또는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 재조합 His-태깅된 ChHer2 단백질의 존재 하에 인큐베이션하였으며, 이. 콜라이에서 제조하고, 니켈 기체의 친화성 크로마토그래피 시스템으로 정제하였다. 상층액의 샘플을 24시간 또는 72시간 이후에 수득하였으며, 마우스 IFN- γ 효소-결합된 면역흡착 분석법(ELISA) 키트를 제조업체의 권고사항에 따라 사용해 인터페론- γ (IFN- γ)의 존재 하에 시험하였다.

[0236] **Her2 유전자도입 동물에서의 종양 연구**

[0237] 6주령의 FVB/N 래트 Her2/neu 유전자도입 마우스(9-14마리/군)를 5×10^8 CFU의 Lm-LLO-ChHer2, ADXS31-164 또는 Lm-대조군으로 6회 면역화하였다. 이들은 자발적인 유방 종양의 출현에 대해 1주에 2회 관찰하였으며, 종양은 52주까지 전자 칼리퍼를 사용해 측정하였다. 회피된(escaped) 종양은, 그 크기가 평균 직경이 1 cm가 되었을 때 절제하고, -20°C에서 RNAlater에서 보존하였다. Her2/neu 단백질의 돌연변이가 이들 종양의 회피에 미치는 영향을 알아보기 위해, 게놈 DNA는 게놈 DNA 분리 키트를 사용해 추출하고, 서열분석하였다.

[0238] **비장 및 종양에서 조절 T 세포에 대한 ADXS31-164의 효과**

[0239] 마우스에, 1×10^6 NT-2 세포를 피하(s.c.) 이식하였다. 7일, 14일 및 21일째에, 이들을 1×10^8 CFU의 ADXS31-164, LmddA-대조군으로 면역화하거나, 또는 네이브한 상태로 두었다. 28일째에 종양 및 비장을 추출하고, FACS 분석에 의해 CD3⁺/CD4⁺/FoxP3⁺ Treg가 존재하는지 시험하였다. 간단히 말하자면, C-RPMI 배지에서 2개의 유리 슬라이드 사이에 비장을 넣어 균질화함으로써, 비장세포를 분리하였다. 종양은 멸균 레이저 블레이드를 사용해 조각내고, PBS에 DNase(12U/ml), 및 콜라게나제(2mg/ml)를 포함하는 완충액으로 분해하였다. 실온에서 교반하면서 60분 동안 인큐베이션한 후, 격렬히 파이펫팅하여 세포를 분리하였다. RBC 용해 완충액으로 적혈구를 용해한 다음, 10% FBS를 포함하는 완전 RPMI-1640 배지로 여러 번 세정하였다. 나일론 메시에 통과시켜 여과한 다음, 종양 세포 및 비장세포를 FACS 완충액(2% FBS/PBS)에 재현탁하고, 항-CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-FITC, CD25-APC 항체로 염색한 다음, 투과시키고, 항-Foxp3-PE로 염색하였다. 유세포분석 분석은 4-컬러 FACS 칼리버(BD)를 사용해 수행하였으며, 데이터는 셀 퀘스트 소프트웨어(cell quest software)(BD)를 사용해 분석하였다.

[0240] **통계학적 분석**

[0241] 로그-랭크 키-스퀘어드 테스트(log-rank Chi-Squared test)는 CTL 및 ELISA 분석법에 대한 생존 데이터 및 스튜던트 t-테스트에 사용하였으며, 이는 삼중으로 수행하였다. 0.05(*로 표시) 미만의 p-값은 이들 분석에서 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 통계학적 분석은 Prism 소프트웨어, V.4.0a(2006) 또는 SPSS 소프트웨어, V.15.0(2006)를 사용해 수행하였다. 모든 FVB/N 래트 Her2/neu 유전자도입 연구를 위해, 본 발명자들은

군 당 8마리 내지 14마리의 마우스를 사용하였으며, 모든 야생형 FVB/N 연구를 위해, 본 발명자들은 다르게 지시되지 않는 한, 군 당 8마리 이상의 마우스를 사용하였다. Her2/neu 유전자도입 마우스 모델에서 장기 중앙 연구를 제외하고는, 모든 연구들은 1회 이상 반복하였다.

[0242] **실시예 1**

[0243] **Her-2 분절에 융합된 LLP 분절을 분비하는 리스테리아 모노사이토제네스 균주의 생성: ADXS31-164의 구축.**

[0244] 키메라 Her2/neu 유전자(ChHer2)의 구축은 전술하였다. 간단히 말하자면, ChHer2 유전자는 SOEing PCR 방법에 의해, Her2/neu 단백질의 2개의 세포외 분절(aa 40-170 및 aa 359-433) 및 하나의 세포내 분절(aa 678-808)을 직접 융합하여 제조하였다. 키메라 단백질은, 상기 단백질의 공지된 인간 MHC 클래스 I 에피토프 중 대부분을 가진다. ChHer2 유전자를 플라스미드, pAdv138(Lm-LLO-ChHer2를 구축하는 데 사용됨)로부터 절제하고, 이를 *LmddA* 서열 플라스미드로 클로닝하여, 플라스미드 pAdv164를 제조하였다(도 1A). 이들 2개의 플라스미드 백본 간에는 2가지 주요 차이점이 존재한다. 1) pAdv138은 재조합 박테리아의 시험관내 선별을 위해 클로람페니콜 내성 마커(*cat*)를 가지는 반면, pAdv164는 *바실러스 서브틸리스* 유래의 D-알라닌 라세마제 유전자(*dal*)를 가지며, 이는 시험관내 선별 및 *dal-dat* 유전자가 결여된 *LmddA* 균주에서의 생체내 플라스미드 체류를 위해 대사 보완 경로를 이용한다. 이러한 백신 플랫폼은, 조작된 *리스테리아* 백신 균주의 항생제 내성에 대한 FDA의 염려를 해결하기 위해 연구 및 개발되었다. 2) pAdv138과는 달리, pAdv164는 플라스미드에 *prfA* 유전자의 카피를 가지지 않으며(하기 서열 및 도 1A 참조), 이는 *Lmdd* 균주의 생체내 상보화에 필수적이지 않다. *LmddA* 백신 균주에는 (리스테리아의 세포내 이동 및 세포-대-세포 분포에 관여하는) *actA* 유전자가 또한 결여되어 있어서, 이러한 백본 유래의 재조합 백신 균주는 이의 모 균주인 *Lmdd* 유래의 것보다 병원성이 100배 더 작다. *LmddA*-기체의 백신은 또한, *Lmdd*-기체의 백신보다 훨씬 더 신속하게(48시간 이내에) 면역화된 마우스의 비장으로부터 제거된다. 이러한 균주 유래의 융합 단백질 tLLO-ChHer2의 발현 및 분비는, 시험관내에서 생장시킨 지 48시간 후에 TCA 침전된 세포 배양 상층액에서 Lm-LLO-ChHer2의 것과 유사하였으며(도 1B), 약 104 KD의 밴드는 웨스턴 블롯 분석을 사용해 항-LLO 항체에 의해 검출하였다. tLLO만 발현하는 *리스테리아* 백본 균주를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0245] **pAdv164 서열(7075개 염기쌍)(도 1 참조):**

```

cggagtgtatactggcttactatgttggcactgatgagggtgtcagtgaaagtgcctcatgtggcaggagaaaaa
ggctgcaccggtgcgtcagcagaatatgtgatacaggatataatccgcttcctcgctcactgactcgctacgctc
ggtcgttcgactgctggcgagcggaaatggcttacgaacggggcggagatttcctggaagatgccaggaagatact
taacagggaagtgagagggccgcgcaaaagccgtttttccataggctcgccccctgacaagcatcacgaaatc
tgacgctcaaatcagtggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggcgctccctc
gtgcgctctcctgttcctgcctttcggtttaccggtgtcatccgctgttatggccgctttgtctcatccacg
cctgacactcagttccggtaggcagttcgctccaagctggactgtatgcacgaaccccccttcagtcgaccg
ctgcgcttatccgtaactatcgtcttgagtccaacccggaaagacatgcaaaagcaccactggcagcagccac
tggtaatgattagaggagttagtcttgaagtcagcgggttaaggctaaactgaaaggacaagttttggtg
actgcgctcctccaagccagttacctcggttcaaagagttggtagctcagagaaccttcgaaaaaccgcccctgca
aggcggtttttcgttttcagagcaagagattacgcgcagacaaaacgatctcaagaagatcatcttattaatc
agataaaaatatttctagccctcctttgatagtagtatatcctatcttaaagttactttatgtggaggcattaaac
tttgttaatgacgtcaaaaggatagcaagactagaataaagctataaagcaagcatataaatatgctttcatct
ttagaagcgaatttcgccaatattataattatcaaaagagaggggtggcaaacggtatttggcattattaggtta
aaaaatgtagaaggagagtgaacccatgaaaaaataatgctagttttattacacttatattagttagttctac
caattgcgcaacaactgaagcaaaagatgcatctgcatcaataaagaaaattcaatttcacatccatggcaccac
cagcatctccgctgcaagtcctaaagacccaatcgaaaagaacacgcggatgaaatcgataagtatatacaag
    
```

[0246]

gat tggattacaataaaaacaatgtat tagt at accacggagatgcagtgacaaatgtgccgccaagaaaaggtt
 acaagatggaatgaat at at tgt tgtggagaaaagaagaaatccat caat caaaat aatgcagacattcaag
 ttgtgaatgcaat ttcgagcctaacct at ccaggtgctctcgtaaaagcgaat tccggaat tagtagaaaat caac
 cagatgttctccctgtaaaacgtgattcattaacactcagcat t gatttgccaggtatgactaatcaagacaata
 aatagttgtaaaaatgccactaatcaaacgttaacaacgcagtaaatacattagtggaagatggaatgaaa
 aat atgctcaagctt at ccaaatgt aagt gcaaaaaat t gattatgatgacgaaatggcttacagtgaatcacaat
 taattgcgaaat t tggtagcagcat taaagctgtaataat agcttgaatgtaaacttcggcgcaatcagtgaa
 ggaaaaatgcaagaagaagtcattagttttaaacaat t t actataacgtgaatgttaatgaacctacaagacct
 ccagat t t t t cggcaaagctgttactaaagagcagttgcaagcgttggagtgaaatgcagaaaatcctcctgcat
 at at ctcaagtggtgctatggccgtcaagtt at t t gaaat t at caactaat t cccat agt actaaagtaaaag
 ctgct t t t gatgctgccgt aagcggaaaaatctgtctcaggtgatgtagaactaacaat at catcaaaaat t ctt
 ccttcaaagccgt aat t t acggaggt t ccgcaaaagatgaagttcaaatcatcgacggcaacctcggagacttac
 gcgat t t t t gaaaaaaggcgtact t t t aatcgagaaacaccaggagt t cccat t gct t atacaacaaact t cc
 taaaagacaatgaat tagctgt t at taaaacaactcagaat at at t gaaacaact t caaaagct t at acagatg
 gaaaaat taacatcgatcactctggaggat acgt t gctcaat t caacat t t ct tgggatgaagtaaat t at gatc
 t cgagaccacctggacat gctccgccacctctaccaggctgccaggtggtgcagggaaacctggaactcacct
 acctgccaccaatgccagcctgtcct t cctgcaggat at ccaggaggtgcagggt acgtgctcatcgctcaca
 accaagt gaggcaggtcccactgcagaggctgcggat t gtcgaggcaccagctct t t gaggacaact at gcc
 tggccgtgctagacaatggagaccgctgaacaat accaccctgtcacagggcctcccaggaggcctgcggg
 agctgcagct t cgaagcctcacagagatct t gaaaggaggggtct t gatccagcggaaacccccagctctgctacc
 aggacacgat t t t t ggaagaat at ccaggagt t t gctggctgcaagaagatct t t gggagcctggcat t t t gc
 cggagagct t t gatggggaccagcctccaactgcccccgtccagccagagcagctccaagtgt t t gtagactc
 t ggaagagatcacaggttacct at acatctcagcatggccggacagcctgctgacctcagcgtct t ccagaacc
 t gcaagt aatccggggacgaat t t t gcacaatggcgcctactcgctgacctgcaagggtgggcatcagctggc
 tggggctgcgctcactgagggaaactgggcagtgactggcctcatccaccataacacccacctctgcttctgctgc
 acacggtgcctgggaccagctct t t cggaaaccgcaccaagctctgctccacactgccaaccggccagaggacg
 agtgtgtgggcgagggcctggcctgccaccagctgtgcgccgagggcagcagaagatccggaagtacacgatgc
 ggagactgctgcaggaacggagctggtggagccgctgacacctagcggagcagatgcccaaccaggcgcagatgc
 ggatcctgaaagagacggagctgaggaaggtgaaggtgct t ggatctggcgt t t tggcacagtctacaaggga
 tctggatcctgatggggagaatgtgaaaat tccagtgccatcaaagtgt t gagggaaaacacatccccaaag
 ccaacaaagaaatcttagacgaagcat acgtgatggctggtgtgggctccccat atgtctcccgcct t t tgggca

[0247]

tctgcctgacatccacggtgcagctggtgacacagcttatgccctatggctgcctcttagactaatctagaccg
ggcactaactcaacgctagtgtggatttaatcccaaatgagccaacagaaccagaaccagaacagaacaagt
aacattggagttagaatggaagaagaaaaagcaatgatttcgtgtgaataatgcacgaaatcattgcttatt
tttataaaagcgatatactagatataacgaaacaacgaactgaataaagaatacaaaaaagagccacgaccagt
taaagcctgagaaactttaactgcgagccttaattgattaccaccaatcaattaaagaagtcgagaccctaaatt
tggtaaaglatttaattactttattaatcagatacttaaatatctgtaaacccattatcgggttttgagggg
atccaagctttaagaagataccaggcaatcaattaagaaaaacttagttgattgcctttttgttgtgattca
actttgatcgtagcttctaactaattaatttcgtagaagaggagaacagctgaatgaatccctttgttgt
gaaactgtgcttcatgacggcttgttaaagtaaaaatataaaaatagtaaaatcgcctcaatcactaccaagcca
ggtaaaagtaaggggctattttgcgtatcgctcaaaaaagcatgattggcggacgtggcgttgttctgact
tccgaagaagcgattcacgaaatcaagatacatttacgattggacaccaaacgtttatcgttatggtacgtat
gcagacgaaaaccgttatacactaaaggacattctgaaaacaatataagacaaatcaataccttctttatgat
tttgatattcacacggaaaaagaaactatccagcaagcgatatttaacaacagctattgattaggtttatg
cctacgttaattatcaaatctgataaaggttatcaagcatattttgttttagaaacccagctctatgtgacttca
aaatcagaatttaaatctgtcaaagcagccaaaataatctcgcaaaatccgagaatattttgaaagctttg
ccagttgatctaactgcaatcattttgggattgctcgtataccaagaacggacaatgtagaatttttgatccc
aattaccgttattctttcaaagaatggcaagattggtctttcaacaaacagataataagggtttactcgttca
agctaacggttttaagcggtaacagaaggcaaaaaacaagtagatgaaccctggtttaatctcttatgcacgaa
acgaaatttcaggagaaaagggttagtagggcgaatagcgttatgtttaccctctctttagcctactttagt
tcaggctatccaatcgaaactgcaatataatagttgagtttaataatcgattagatcaacccttagaagaa
aaagaagtaatacaaatgttagaagtgctatccagaaaactatcaagggttaataagggaatcattaccatt
ctttgcaaagcttgggtatcaagtgatttaaccagtaagatttatgtccgtcaagggtggtttaattcaag
aaaaaagaagcgaacgtcaactgttcatttgtcagaatggaaagaagatttaattggcttatatagcgaaaa
agcgatgtatacaagccttattagcgacgacaaaaagagattagagaagtgctaggcattcctgaacggaca
ttagataaattgctgaaggtactgaaggcgaatcaggaattttctttaagattaaccaggaagaaatggtggc
atccaacttgctagtgttaaatcattgttgctatcgatcattaaatataaaaaagaagaacgagaaagctata
aaggcgtgacagcttcgtttaatttagaacgtacatttatcaagaaactcaacaaatggcagaacgcccc
aaaacggaccacaactcgatttgtttagctacgatacaggctgaaaataaaaccgcactatgccattacattt
atatctatgatcgtgtttgttttctttgctggctagcttaattgcttatattacctgcaataaggatttct
tacttccattatactccattttccaaaaacatcggggaacacgggaacttatgtacaggccacctcatagtt
aatggtttcgagccttctgcaatctcatccatggaaatataatcatccccctgccggcctataatgtgacttt

[0248]

tgtgcccgcgcatattcctgatccagctccaccaaatttggccatgcaaatcgcccgcaat tttcaggcg
 tttcccttcacaaggatgtcggtccctttcaat tttcgagccagccgtccgcatagcctacaggcaccgtccc
 gatccatgtgtcttttccgctgtgtactcggtccgtagctgacgctctcgcttttctgatcagtttgacatg
 tgacagtgtcgaatgcagggtaatgccggacgcagctgaaacggatctcgtccgacatgtcagcagacgggcg
 aaggccatacatgccgatgccgaatctgactgattaaaaaacctttttcagccggagtccagcggcgctgtt
 cgcgcagtgaccat tagattctttaacggcagcggagcaatcagctctttaagcgctcaaactgattaaгаа
 atagcctctttcttttcatccgctgtcgcaaaatgggtaaat acccctttgcactttaaacgagggttgcggtc
 aagaattgccatcacgttctgaacttcttctctgtttttacaccaagtctgttcatccccgtatcgacctcag
 atgaaaatgaagagaacctttttcgtgtggcgggctgcctcctgaagccattcaacagaataacctgttaagg
 cagctcatactcagcagcagtgccacat actccgggggaaccgcgccaagcaccaat ataggcgcttcaatcc
 ct ttttgcgcagt gaaatcgcttcatccaaaatggccacggccaagcatgaagcacctgcgtcaagagcagcctt
 t gctgtttctgcatcaccatgcccgtaggcgtttgctttcacaactgccatcaagtgacatgttaccgatatg
 ttttttcatattgctgacattttctttatcgcggaagaagcaatttccgcccagctatctctgtaaaaaggttt
 t gctcatggaaaactcctctctttttcagaaaatcccagtagtaattaaagtatttgagaat taat tttata
 ttgattaactaagtttaccagttttcacctaaaaaacaatgatgagataatagctccaaaggctaaagagg
 actataccaactatttgtaattaa (서열 번호 53)

[0249]

[0250]

실시예 2: ADXS31-164는 LM-LLO-ChHER2와 마찬가지로 면역원성이다.

[0251]

항-Her2/neu 특이적 세포독성 T 세포를 생성하는 데 있어서 ADXS31-164의 면역원성 특성을, 표준 CTL 분석법에서 Lm-LLO-ChHer2 백신에서의 면역원성 특성과 비교하였다. 두 백신 모두, 3T3/neu 표적 세포에 의해 발현되는 Her2/neu 항원에 대해 강하면서도 유사한 세포독성 T 세포 반응을 유도하였다. 즉, LLO에 융합된 Her2의 세포 내 분절만 발현하는 *리스테리아*로 면역화한 마우스는, MHC 클래스 I 에피토프를 보다 많이 포함하는 키메라보다 낮은 용해 활성을 나타내었다. 네이브 동물, 또는 관련이 없는 *리스테리아* 백신을 주사한 마우스에서는 CTL 활성이 검출되지 않았다(도 2A). ADXS31-164는 또한, 야생형 FVB/N 마우스의 비장세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 자극할 수 있었다(도 2B). 이는, Her2/neu 항원을 높은 수준으로 발현하는, 미토마이신 C로 처리한 NT-2 세포와 함께 배양한 이들 세포의 배양 상층액에서 검출하였다(도 5C).

[0252]

ADXS31-164로 면역화한 후, 인간 MHC 클래스 I 에피토프의 적절한 가공 및 제시를 HLA-A2 마우스에서 시험하였다. 면역화된 HLA-A2 유전자도입한 비장세포는, Her2/neu 분자의 세포외(HLYQGCQVV 서열 번호: 11 또는 KIFGSLAFL 서열 번호: 12) 또는 세포내(RLLQETELV 서열 번호: 13) 도메인에 위치하는 매핑된 HLA-A2 제한된 에피토프에 상응하는 펩타이드와 함께 72시간 동안 코-인큐베이션하였다(도 2C). 제조합 ChHer2 단백질을 양성 대조군으로 사용하였으며, 관련이 없는 펩타이드 또는 펩타이드-무함유는 음성 대조군으로 사용하였다. 이 실험의 데이터에서, ADXS31-164는, 표적화된 항원의 서로 다른 도메인에 위치하는 인간 에피토프에 대해 항-Her2/neu 특이적 면역 반응을 유도할 수 있는 것으로 나타나 있다.

[0253]

실시예 3: ADXS31-164는 자발적 유방 종양의 발병을 예방하는 데 있어서, LM-LLO-ChHER2보다 효과적이었다.

[0254]

ADXS31-164의 항-종양 효과를, 20주령 내지 25주령의, 자발적인 유방 종양이 발병되어 느리게 성장시키는 Her2/neu 유전자도입 동물의 Lm-LLO-ChHer2의 항-종양 효과와 비교하였다. 관련이 없는 *리스테리아*-대조군 백신으로 면역화한 동물들은 모두, 21주 내지 25주 내에 유방 종양을 발병시켰으며, 33주 전에 안락사시켰다. 대조적으로, *리스테리아*-Her2/neu 제조합 백신은 유방 종양의 형성을 상당히 지연시켰다. 45주째에, ADXS31-164로 백신화한 마우스 중 50%가 넘는 마우스(9마리 중 5마리)는 여전히 종양을 가지고 있지 않았으며, Lm-LLO-ChHer2로 면역화한 마우스에서는 25%에서 종양이 나타나지 않았다. 52주째에, ADXS31-164로 면역화한 마우스 8마리 중 2마리는 여전히 종양을 가지지 않았으며, 반면 다른 실험군들의 마우스들은 모두 이미 유방 종양을 발병시켰다(도 3). 이들 결과는, ADXS31-164는 보다 감소되어 있음에도, Her2/neu 유전자도입 동물에서 자발적 유방 종양의 발병을 예방하는 데 있어서 Lm-LLO-ChHer2보다 더 효과가 있음을 나타낸다.

[0255] **실시예 4: ADXS31-164로 면역화한 경우, HER2/NEU 유전자에서의 돌연변이.**

[0256] Her2/neu의 MHC 클래스 I 에피토프의 돌연변이는, 소 분절 백신 또는 트라스투주마브(허셉틴(Herceptin)), Her2/neu의 세포의 도메인의 에피토프를 표적으로 하는 모노클로날 항체로 면역화한 경우, 종양 회피에 관여하는 것으로 여겨진 바 있다. 이를 평가하기 위해, 유전자도입 동물에 있는 회피된 종양으로부터 유전 물질을 추출하고, 키메라 또는 대조군 백신으로 면역화한 종양에서의 neu 유전자의 상응하는 분절을 서열 분석하였다. 백신처리된 종양 샘플의 Her-2/neu 유전자에서는 돌연변이가 관찰되지 않았으며, 이는 대안적인 회피 메커니즘(데이터는 제시하지 않음)을 제안한다.

[0257] **실시예 5: ADXS31-164는 종양내 T 조절 세포에서 상당한 감소를 야기한다.**

[0258] 비장 및 종양에서 조절 T 세포의 빈도에 대한 ADXS31-164의 효과를 평가하기 위해, 마우스에 NT-2 종양 세포를 이식하였다. 3회의 면역화 후, 비장세포 및 종양내 림프구를 분리하고, CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ 세포로서 정의되는 Treg의 여부에 대해 염색하였으며, 그렇지만 따로 분석한 경우, FoxP3 또는 CD25 마커를 이용하면 유사한 결과를 획득하였다. 이러한 결과들은, 관련이 없는 리스테리아 백신 또는 네이브 동물과 비교해, ADXS31-164로 면역화하는 것은 비장에서 Treg의 빈도에 아무런 영향을 미치지 않았음을 나타내었다(도 4 참조). 대조적으로, 리스테리아 백신으로 면역화하면, 종양에서 Treg의 존재에 상당한 영향을 미쳤다(도 5A). 미처리 종양에서의 모든 CD3⁺ T 세포 중 평균 19.0%는 Treg였으며, 반면 이러한 빈도는 관련이 없는 백신의 경우 4.2%로, 종양내 Treg의 빈도가 5배 감소한 ADXS31-164의 경우 3.4%로 감소하였다(도 5B). LmddA 백신으로 처리한 마우스에서 종양내 Treg의 빈도의 감소는 상기 종양의 크기의 차이에 영향을 미치지 않았다. 대표적인 실험에서, ADXS31-164로 면역화한 마우스의 종양의 크기는 [평균 직경(mm) ±SD, 6.71±0.43, n=5]로, 미처리 마우스의 종양의 크기(8.69±0.98, n=5, p<0.01), 또는 관련이 없는 백신으로 처리한 마우스의 종양의 크기(8.41±1.47, n=5, p=0.04)보다 상당히 더 작았으며, 반면, 이들 마지막 2개의 군을 비교하면 종양 크기에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(p=0.73). LmddA 백신으로 처리한 종양에서 더 낮은 Treg 빈도로 인해, 종양내 CD8/Treg 비율이 증가하였으며, 이는 LmddA 백신으로 면역화한 후, 보다 선호할만한 종양 미세환경이 획득될 수 있음을 제안한다. 그러나, 표적 항원 HER2/neu를 발현하는 백신(ADXS31-164)만이 종양의 성장을 감소시킬 수 있었으며, 이는 Treg의 감소가, 상기 종양에서 항원- 특이적 반응의 존재에서만 효과를 가짐을 나타낸다.

[0259] **실시예 6: HER-2 키메라를 발현하는 리스테리아 백신에 의해서는 어떠한 회피 돌연변이도 도입되지 않았다.**

[0260] Lm-LLO-138, LmddA164 및 관련이 없는 백신 Lm-LLO-NY와 같은 서로 다른 백신으로 면역화한 마우스의 종양 샘플을 수집하였다. 이들 샘플로부터 DNA를 정제하고, Her-2/neu 영역 IC1, EC1 및 EC2에 상응하는 DNA 분절을 증폭하고, 서열 분석하여, 면역 회피 돌연변이가 존재하는 지 확인하였다. 각각의 DNA의 서열 정렬은, CLUSTALW를 이용해 수행하였다. 분석 결과는, 종양으로부터 수집한 DNA 서열에 돌연변이가 존재하지 않았음을 나타내었다. 이들 서열에 관한 상세한 분석은 하기에 나타나 있다.

[0261] **EC2(Her-2-neu의 975 bp 내지 1029 bp)의 정렬**

[0262] **참조**

[0263] **GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT(서열 번호: 14)**

Lm-LLO-138-2 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

Lm-LLO-138-3 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

Lm-ddA-164-1 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LmddA164-2 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

Lm-ddA-164-3 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LmddA164-4 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

Lm-ddA-164-5 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LmddA-164-6 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTCTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

[0264]

[0265] **참조**

[0266] **CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC(서열 번호: 15)**
 Lm-LLO-138-2 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-LLO-138-3 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-ddA-164-1 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 LmddA164-2 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-ddA-164-3 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 LmddA164-4 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-ddA-164-5 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 LmddA-164-6 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC

[0267]

[0268] **참조**

[0269] **AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG(서열 번호:16)**
 Lm-LLO-138-2 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 Lm-LLO-138-3 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 Lm-ddA-164-1 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 LmddA164-2 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 Lm-ddA-164-3 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 LmddA164-4 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 Lm-ddA-164-5 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG
 LmddA-164-6 AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTMTTGCCGGAG

[0270]

[0271]

[0272] **참조**

[0273] **AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG(서열 번호:17)**
 Lm-LLO-138-2 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 Lm-LLO-138-3 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 Lm-ddA-164-1 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 LmddA164-2 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 Lm-ddA-164-3 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 LmddA164-4 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 Lm-ddA-164-5 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
 LmddA-164-6 AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

[0274]

[0275] **참조**

- [0276] **TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC(서열 번호: 18)**
 Lm-LL0-138-2 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
 Lm-LL0-138-3 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
 Lm-ddA-164-1 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
 LmddA164-2 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
 Lm-ddA-164-3 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
 LmddA164-4 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
 Lm-ddA-164-5 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCANACAGTCTC
 LmddA-164-6 TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC
- [0277] 참조
- [0278] 참조
- [0279] **CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC(서열 번호: 19)**
 Lm-LL0-138-2 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 Lm-LL0-138-3 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 Lm-ddA-164-1 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 LmddA164-2 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 Lm-ddA-164-3 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 LmddA164-4 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAAAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 Lm-ddA-164-5 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAAAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
 LmddA-164-6 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAAAACCTTCGAATCATTCCGGGACGGATTCTCCACGATGGC
- [0280] 참조
- [0281] 참조
- [0282] **GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG(서열 번호: 20)**
 Lm-LL0-138-2 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG
 Lm-LL0-138-3 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG
 Lm-ddA-164-1 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG
 LmddA164-3 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG
 Lm-ddA-164-5 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG
 Lm-ddA-164-6 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG
- [0283] 참조
- [0284] 참조
- [0285] 참조
- [0286] **GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT(서열 번호: 21)**
 Lm-LL0-138-2 GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT
 Lm-LL0-138-3 GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT
 Lm-ddA-164-1 GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT
 LmddA164-3 GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT
 Lm-ddA-164-5 GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT
 Lm-ddA-164-6 GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACT
- [0287] 참조
- [0288] 참조

[0289] **GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG(서열 번호: 22)**
 Lm-LLO-138-2 GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
 Lm-LLO-138-3 GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
 Lm-ddA-164-1 GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
 LmddA164-3 GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
 Lm-ddA-164-5 GTACCTTGGGACCANCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
 Lm-ddA-164-6 GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

[0290]

[0291] 참조

[0292] **CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCCACGGGCAC(서열 번호: 23)**
 Lm-LLO-138-2 CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCCACGGGCAC
 Lm-LLO-138-3 CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCCACGGGCAC
 Lm-ddA-164-1 CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCCACGGGCAC
 LmddA164-3 CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCCACGGGCAC
 Lm-ddA-164-6 CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACACTACTGTGTGCCACGGGCAC

[0293]

[0294] 참조

[0295] **TGCTGGGGGCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCCCTTCGGGGCCAGGAG(서열 번호: 24)**
 Lm-LLO-138-2 TGCTGGGGGCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCCCTTCGGGGCCAGGAG
 Lm-LLO-138-3 TGCTGGGGGCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCCCTTCGGGGCCAGGAG
 Lm-ddA-164-1 TGCTGGGGGCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCCCTTCGGGGCCAGGAG
 LmddA164-3 TGCTGGGGGCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCCCTTCGGGGCCAGGAG
 Lm-ddA-164-6 TGCTGGGGGCCAGGGCCACCCA-----

[0296]

[0297] IC1(Her-2-neu의 2114 bp 내지 3042 bp)의 정렬

[0298] 참조

[0299] **CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC(서열 번호: 25)**
 Lm-LLO-NY-2 CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
 Lm-LLO-138-4 CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
 Lm-ddA-164-2 CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
 Lm-ddA-164-3 CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
 Lm-ddA164-6 CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC

[0301]

[0302] 참조

[0303] **TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA(서열 번호: 26)**

- Lm-LLO-NY-1 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-LLO-NY-2 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-LLO-138-1 TAAGGAAGGTGAACGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-LLO-138-2 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-LLO-138-3 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-LLO-138-4 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-ddA-164-1 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-ddA-164-2 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-ddA-164-3 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-ddA-164-4 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-ddA-164-5 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- Lm-ddA164-6 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

[0304]

[0305] **참조**

[0306] **TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT(서열 번호: 27)**

- Lm-LLO-NY-1 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-LLO-NY-2 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-LLO-138-1 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-LLO-138-2 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-LLO-138-3 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-LLO-138-4 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-ddA-164-1 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-ddA-164-2 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-ddA-164-3 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-ddA-164-4 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-ddA-164-5 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- Lm-ddA164-6 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0307]

[0308] **참조**

[0309] **CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC(서열 번호: 28)**

- Lm-LLO-NY-1 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
- Lm-LLO-NY-2 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
- Lm-LLO-138-1 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

[0310]

Lm-LLO-138-2 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-LLO-138-3 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-LLO-138-4 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-ddA-164-1 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-ddA-164-2 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-ddA-164-3 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-ddA-164-4 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-ddA-164-5 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
 Lm-ddA164-6 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

[0311]

[0312]

참조

[0313]

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC(서열 번호: 29)

Lm-LLO-NY-1 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-LLO-NY-2 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-LLO-138-1 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-LLO-138-2 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-LLO-138-3 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-LLO-138-4 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-ddA-164-1 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-ddA-164-2 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-ddA-164-3 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-ddA-164-4 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-ddA-164-5 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC
 Lm-ddA164-6 CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

[0314]

[0315]

참조

[0316]

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC(서열 번호: 30)

Lm-LLO-NY-1 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-LLO-NY-2 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-LLO-138-1 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-LLO-138-2 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-LLO-138-3 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-LLO-138-4 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-ddA-164-1 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-ddA-164-2 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-ddA-164-3 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-ddA-164-4 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-ddA-164-5 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC
 Lm-ddA164-6 TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

[0317]

[0318] 참조

[0319] **AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC(서열 번호: 31)**

- Lm-LLO-NY-1 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-LLO-NY-2 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-LLO-138-1 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-LLO-138-2 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-LLO-138-3 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-LLO-138-4 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-ddA-164-1 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-ddA-164-2 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-ddA-164-3 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-ddA-164-4 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-ddA-164-5 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- Lm-ddA164-6 AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

[0320]

[0321] 참조

[0322] **GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA(서열 번호: 32)**

- Lm-LLO-NY-1 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-LLO-NY-2 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-LLO-138-1 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-LLO-138-2 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-LLO-138-3 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-LLO-138-4 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-ddA-164-1 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-ddA-164-2 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-ddA-164-4 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-ddA-164-3 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-ddA-164-5 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA
- Lm-ddA164-6 GGCTTGCTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

[0323]

[0324] 참조

[0325] **AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG(서열 번호: 33)**

- Lm-LLO-NY-1 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
- Lm-LLO-NY-2 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
- Lm-LLO-138-1 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
- Lm-LLO-138-2 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
- Lm-LLO-138-3 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
- Lm-LLO-138-4 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
- Lm-ddA-164-1 AGATTACAGATTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0326]

Lm-ddA-164-2 AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
 Lm-ddA-164-3 AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
 Lm-ddA-164-4 AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
 Lm-ddA-164-5 AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
 Lm-ddA164-6 AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0327]

[0328]

참조

[0329]

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA(서열 번호: 34)

Lm-LLO-NY-1 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-LLO-NY-2 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-LLO-138-1 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-LLO-138-2 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-LLO-138-3 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-LLO-138-4 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-ddA-164-1 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-ddA-164-2 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-ddA-164-3 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-ddA-164-4 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-ddA-164-5 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA
 Lm-ddA-164-6 ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0330]

[0331]

참조

[0332]

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG(서열 번호: 35)

Lm-LLO-NY-1 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-LLO-NY-2 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-LLO-138-1 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-LLO-138-2 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-LLO-138-3 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-LLO-138-4 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-ddA-164-1 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-ddA-164-2 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-ddA-164-3 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-ddA-164-4 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-ddA-164-5 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG
 Lm-ddA164-6 CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

[0333]

[0334]

참조

[0335]

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA(서열 번호: 36)

Lm-LLO-NY-1 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-LLO-NY-2 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA

[0336]

Lm-LLO-138-1 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-LLO-138-3 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-LLO-138-4 CCAAACCTTACGATGNAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-ddA164-6 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-ddA-164-2 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-LLO-138-2 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-ddA-164-3 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-ddA-164-5 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-ddA-164-1 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA
 Lm-ddA-164-4 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCAGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA

[0337]

[0338]

참조

[0339]

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT(서열 번호: 37)

Lm-LLO-NY-1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-LLO-NY-2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-LLO-138-1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-LLO-138-2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-LLO-138-3 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-LLO-138-4 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-ddA-164-1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-ddA-164-2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-ddA-164-3 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-ddA-164-4 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-ddA-164-5 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
 Lm-ddA164-6 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

[0340]

[0341]

참조

[0342]

GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT(서열 번호: 38)

Lm-LLO-NY-1 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-LLO-NY-2 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-LLO-138-2 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAAAATTTT
 Lm-LLO-138-3 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-LLO-138-4 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-ddA-164-1 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-ddA-164-2 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-ddA-164-3 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-ddA-164-5 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-ddA-164-4 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT
 Lm-ddA164-6 GGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTT

[0343]

- [0344] **참조**
- [0345] **CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT(서열 번호: 39)**
 Lm-LLO-NY-1 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-LLO-NY-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-LLO-138-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-LLO-138-3 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-LLO-138-4 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-ddA-164-1 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-ddA-164-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-ddA-164-3 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-ddA-164-5 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
 Lm-ddA-164-6 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0346]
- [0347] **EC1(Her-2-neu의 399 bp 내지 758 bp)의 정렬**
- [0348] **참조**
- [0349] **CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT(서열 번호: 40)**
 Lm-LLO-138-1 CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT
 Lm-LLO-138-2 CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT
 Lm-ddA-164-1 CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT
 LmddA-164-2 CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT
 LmddA-164-3 CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT
 LmddA164-4 CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT
- [0350]
- [0351] **참조**
- [0352] **GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG(서열 번호: 41)**
 Lm-LLO-138-1 GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG
 Lm-LLO-138-2 GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG
 Lm-ddA-164-1 GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG
 LmddA-164-2 GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG
 LmddA-164-3 GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG
 LmddA164-4 GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG
- [0353]
- [0354] **참조**
- [0355] **CCGGGCCTGTCCACCTTGTCACCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC(서열 번호: 42)**
 Lm-LLO-138-1 CCGGGCCTGTCCACCTTGTCACCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC
 Lm-LLO-138-2 CCGGGCCTGTCCACCTTGTCACCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC
 Lm-ddA-164-1 CCGGGCCTGTCCACCTTGTCACCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC
 LmddA-164-2 CCGGGCCTGTCCACCTTGTCACCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC
 LmddA-164-3 CCGGGCCTGTCCACCTTGTCACCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC
- [0356]

[0357] LmddA164-4 CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

[0358] 참조

[0359] **GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG(서열 번호: 43)**

Lm-LLO-138-1 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

Lm-LLO-138-2 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

Lm-ddA-164-1 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

LmddA-164-2 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

LmddA-164-3 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

LmddA164-4 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0360]

[0361] 참조

[0362] **CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGCA(서열 번호: 44)**

Lm-LLO-138-1 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGCA

Lm-LLO-138-2 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGCA

Lm-ddA-164-1 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGCA

LmddA-164-2 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGTA

LmddA-164-3 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGTA

LmddA164-4 CCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCAAGTA

[0363]

[0364] **실시예 7: 주변부 면역화 WITH ADXS31-164로 주변부를 면역화하면, 뇌에서 전이성 유방암 세포주의 성장을 지연시킬 수 있다.**

[0365] ADXS31-164 또는 관련이 없는 Lm-대조군 백신으로 마우스에 복강내 면역화하였으며, 그런 다음, 루시페라제 및 낮은 수준의 Her2/neu를 발현하는 EMT6-Luc 종양 세포 5,000개를 두개내로 이식하였다(도 6C). 마취한 마우스를 생체의 촬영하여, 접종 후 서로 다른 시점에서 종양을 모니터링하였다. 종양 접종 후 8일째에, 모든 대조군 동물에서 종양이 검출되었으나, ADXS31-164 군의 마우스에서는 검출가능한 종양이 나타나지 않았다(도 6A 및 B). 종양 접종 후 11일째에 음성 대조군 마우스 모두에서는 이미 종양이 나타났지만, ADXS31-164 군의 마우스는 모두 살아 있었으며, 종양의 성장에 관한 증상을 단지 미미하게 나타내었으므로, ADXS31-164는 이들 종양의 발병을 확실히 지연시킬 수 있었다. 이들 결과는, ADXS31-164를 주변부에 투여한 경우 수득되는 면역 반응이 중추 신경계에 도달할 수 있었으며, LmddA-기재의 백신이 CNS 종양의 치료에 있어 잠재적인 이용가능성을 가짐을 제안한다.

[0366] **실시예 8: ADXS31-164의 면역화에 의한, 개 골육종의 치료.**

[0367] 개 골육종은 10살이 넘는 큰 개의 주된 죽음의 원인으로, 긴 (다리) 뼈에 생기는 암이다. 표준 치료는 진단 직후 절단한 다음, 화학치료법을 수행하는 것이다. 그러나, 불가피하게도, 이 암은 폐에 전이된다. 치료를 받지 않은 개의 경우 생존기간이 6개월 내지 12개월인데 비해, 화학치료법을 이용하면, 개는 약 18개월간 생존한다. HER2 항원은 골육종 중 50% 이하에서 존재하는 것으로 생각된다. ADXS31-164는 이러한 항원을 발현하는 세포를 면역학적으로 공격하여, 인간 유방암을 치료한다.

[0368] 조직학적 검사에 의해 골육종을 진단받고, 악성 세포에 의한 HER2/neu이 발현되는 증거를 가진 개들을 등록시킬 수 있다.

[0369] **개 골육종 실험**

[0370] 제1 실험에서, 사지를 절단하고, 화학치료법으로 치료하였다. 이어서, Her-2 백신으로 3회 투여하되, 6개월 간격으로 부스터를 병행하거나 또는 병행하지 않았다.

[0371] 모든 개에게 카르보플라틴 치료법을 4주간 시행한다. 카르보플라틴을 마지막으로 투여한 후 4주째에, 개에게 ADXS-HER2를 3주에 한번씩 총 3회 투여한다. 1군(3마리의 개)에는 투여 당 1×10^8 CFU로 투여하고, 2군(3마리의

개)에는 투여 당 5×10^8 CFU로 투여하며, 3군(3마리의 개)에는 투여 당 1×10^9 CFU로 투여한다. 잠재적으로 투여량을 한정하는 독성에 관해 보다 많은 데이터를 수집하기 위해, 임의의 별도의 군에 개들을 추가하였다. 따라서, 초기 연구에서 9마리 내지 18마리의 개를 취급하였다.

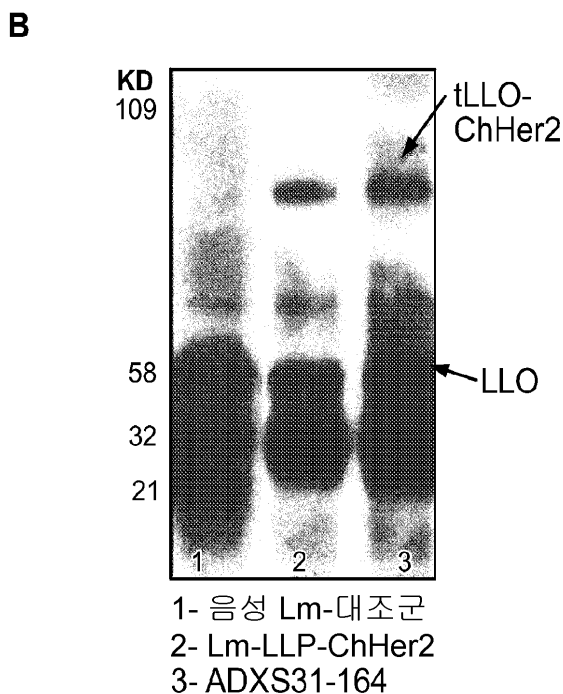
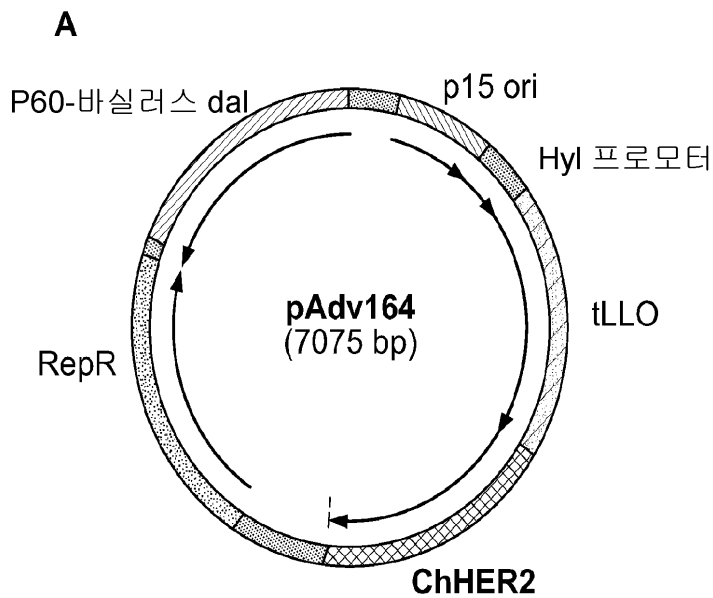
[0372] 제2 실험에서, 화학치료법을 시행하기 전에(1달 전에) 백신을 1회 투여하여, 총 4회 투여하는 점을 제외하고는, 제1 실험과 동일하게 반복한다.

[0373] 또한, 두 실험 모두에서, 화학치료법 후 1달째에 단일 투여량을 투여한다.

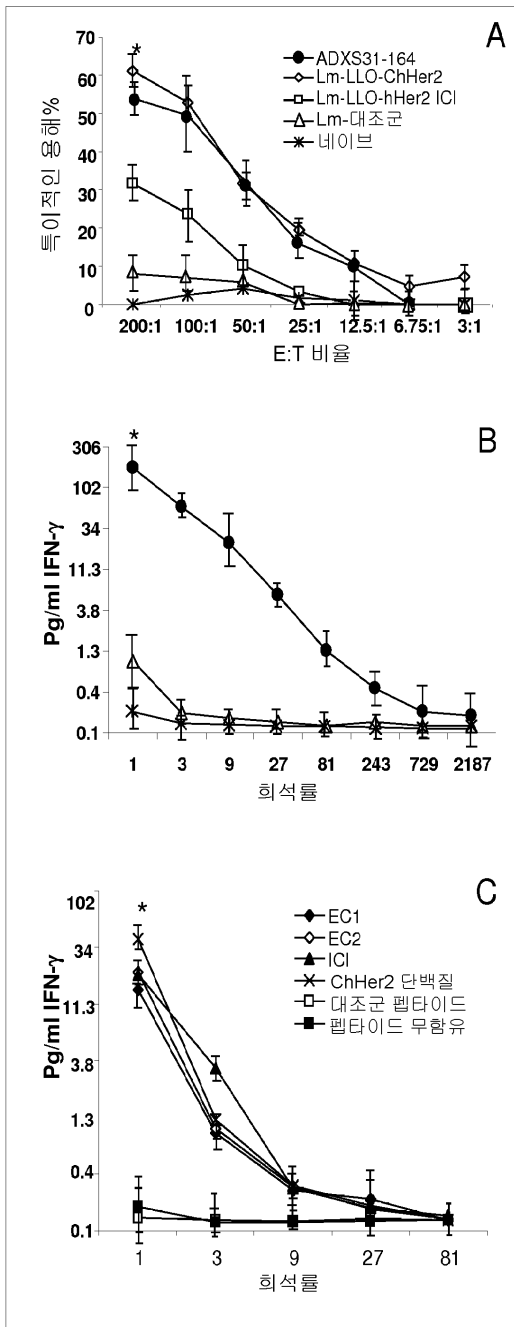
[0374] 본 발명의 소정의 특징들이 본원에 예시 및 기술된 한편, 당해 기술분야의 당업자는 변형, 치환, 변화, 및 등가의 작업을 많이 수행할 것이다. 따라서, 첨부된 청구항은 본 발명의 참인 범위 내에서 이러한 모든 변형 및 변화를 망라하는 것으로 의도됨을 이해해야 한다.

도면

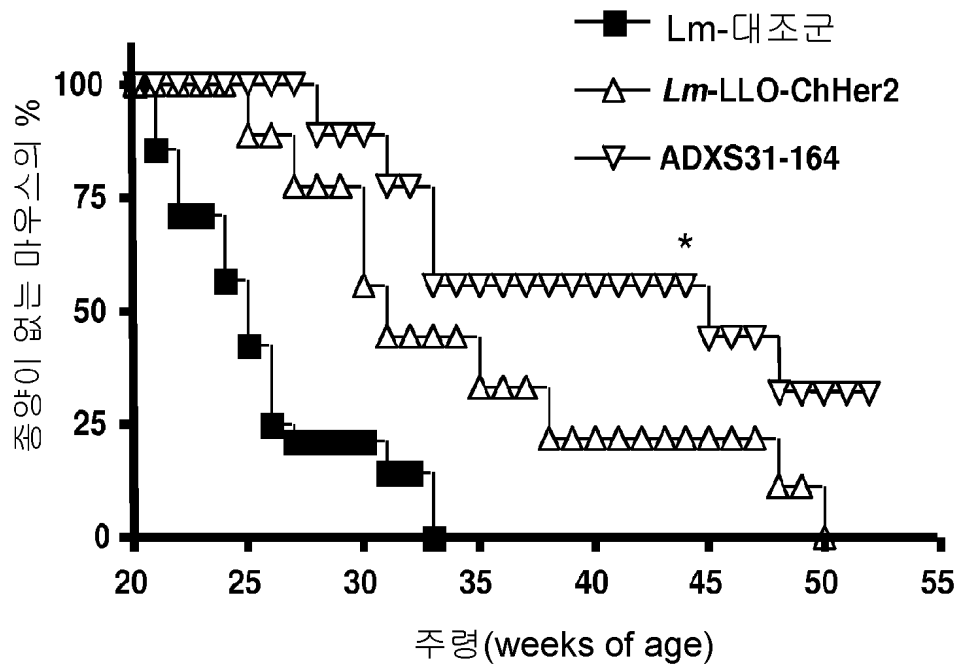
도면1



도면2



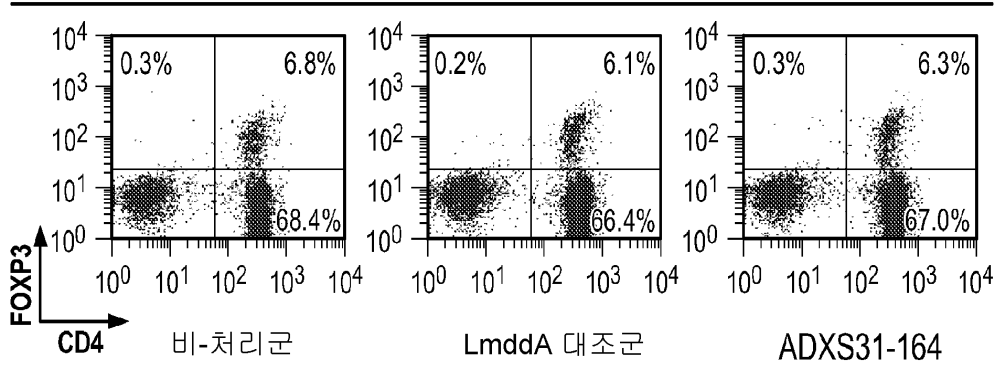
도면3



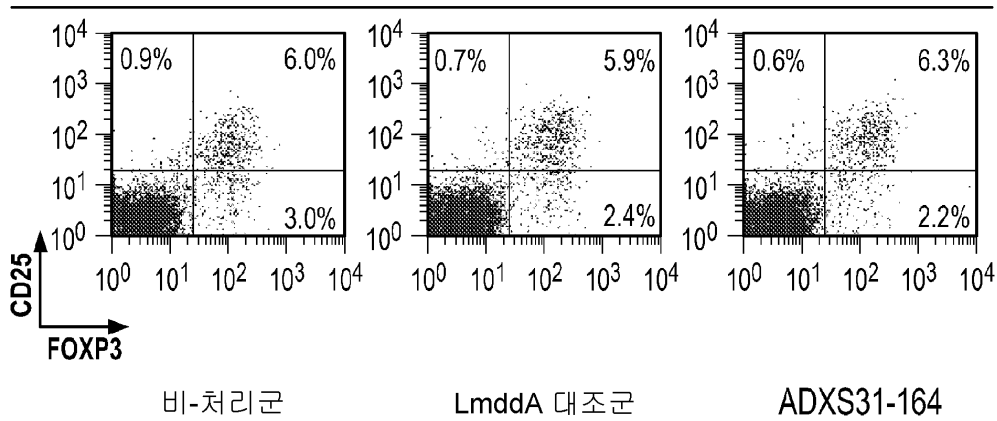
도면4

비장

CD3+ T 세포에 대한 게이팅(gating)



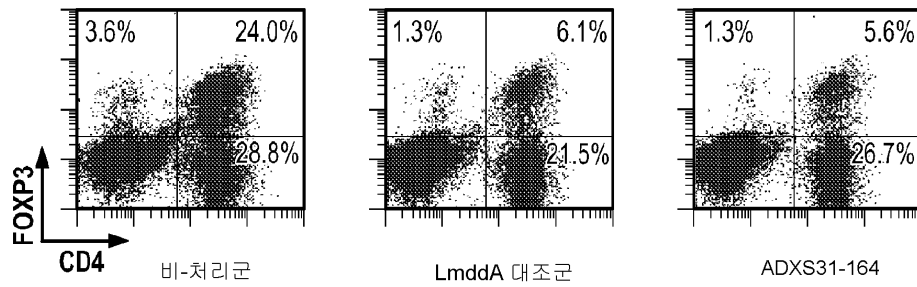
CD3+ CD4+ T 세포에 대한 게이팅



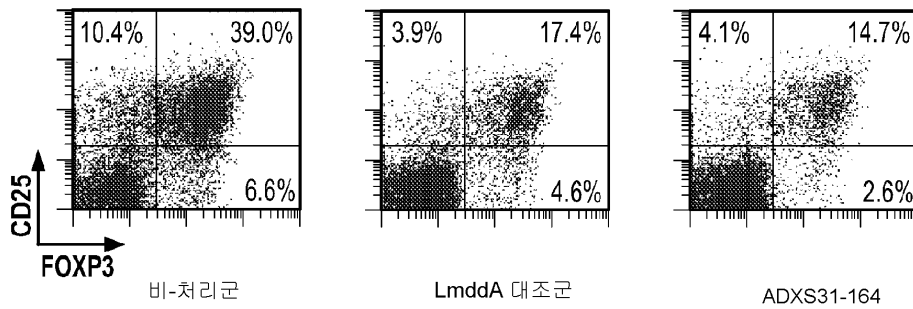
도면5

A

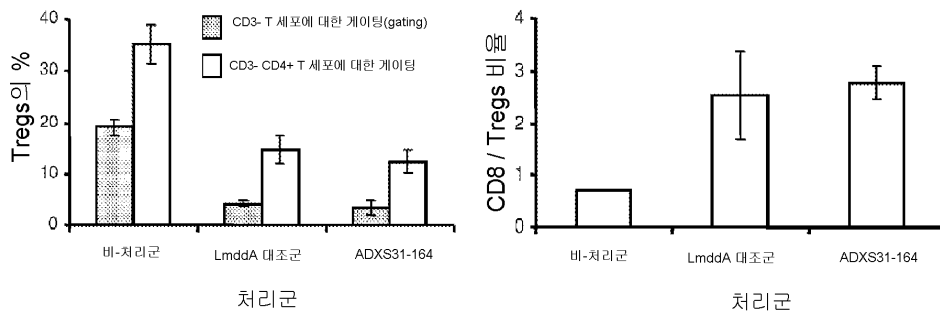
CD3+ T 세포에 대한 게이팅



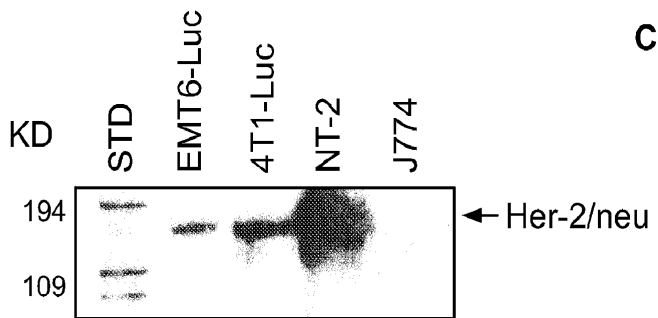
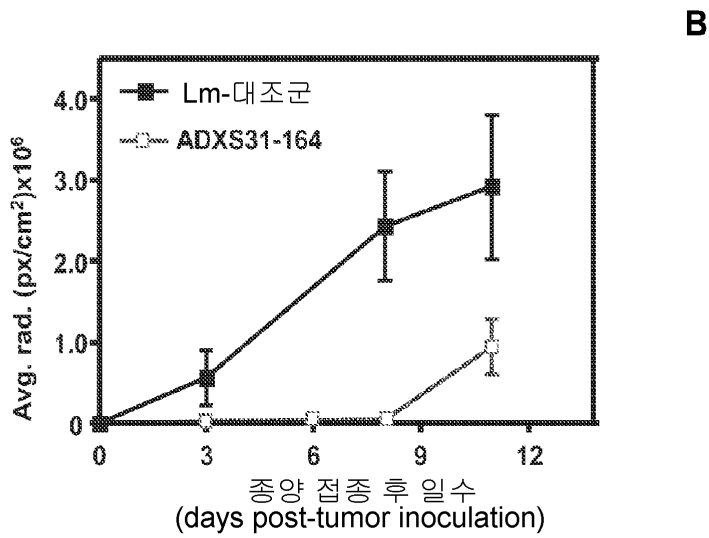
CD3+ CD4+ T 세포에 대한 게이팅



B



도면6



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Advaxis

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTION OF ESCAPE MUTATION IN THE TREATMENT OF HER2/NEU OVER-EXPRESSING TUMORS

<130> P-73423-PC1

<140> PCT/US12/999,999
 <141> 2012-08-16
 <150> 12/945,386
 <151> 2010-11-12
 <150> 13/210,696
 <151> 2011-08-16
 <150> 61/260,277
 <151> 2009-11-11
 <160> 68
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Her-2 chimeric protein

<400> 1

```

gagaccacc tggacatgct cgccaccctc taccagggt gccaggtgt gcagggaaac      60
ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tcctgcagga tatccaggag    120
gtgcagggt acgtgctcat cgctcacaac caagttaggc aggtcccact gcagaggctg    180
cggattgtgc gaggcacca gctctttgag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat    240
ggagaccgc tgaacaatac caccctgtc acaggggcct ccccaggagg cctgcgggag    300
ctgcagcttc gaagcctcac agagatcttg aaaggagggg tcttgatcca gcggaacccc   360
cagctctgct accaggacac gatcttggg aagaatatcc aggagtttgc tggctgcaag   420

aagatctttg ggagcctggc atttctgccg gagagctttg atggggacce agcctccaac   480
actgccccgc tccagccaga gcagctccaa gtgtttgaga ctctggaaga gatcacaggt   540
tacctataca tctcagcatg gccggacagc ctgctgacc tcagcgtctt ccagaacctg   600
caagtaatcc ggggacgaat tctgcacaat ggcgcctact cgctgaccct gcaagggtg   660
ggcatcagct ggctggggct gcgctcactg agggaactgg gcagtgact ggccctcatc   720
caccataaca cccacctctg ctctgtgac acggtgcct gggaccagct ctttcggaac   780
ccgcaccaag ctctgctcca cactgccaac cggccagagg acgagtgtgt gggcgagggc   840

ctggcctgcc accagctgtg cgcccagggg cagcagaaga tccggaagta cacgatgagg   900
agactgtgac aggaacgga gctggtggag ccgctgacac ctacgggagc gatgccaac   960
    
```

caggcgcaga tgcggatcct gaaagagacg gagctgagga aggtgaaggt gcttggatct 1020
 ggcgcttttg gcacagtcta caagggcatc tggatccctg atggggagaa tgtgaaaatt 1080
 ccagtggcca tcaaagtgtt gagggaaaac acatcccca aagccaaca agaaatctta 1140
 gacgaagcat acgtgatggc tgggtgtggc tccccatg tctcccgcct tctgggcatc 1200
 tcctgacat ccacggtgca gctggtgaca cagcttatgc cctatggctg cctcttagac 1260

taa 1263

<210> 2

<211> 420

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her-2 chimeric protein

<400> 2

Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val

1 5 10 15

Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu

20 25 30

Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala

35 40 45

His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg

50 55 60

Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn

65 70 75 80

Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly

85 90 95

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

100 105 110

Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile

115 120 125

Leu Trp Lys Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly

130 135 140

Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn

145 150 155 160

Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu
 165 170 175
 Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro
 180 185 190
 Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu
 195 200 205
 His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp
 210 215 220
 Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile
 225 230 235 240
 His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln
 245 250 255
 Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro
 260 265 270
 Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala
 275 280 285
 Arg Gly Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln
 290 295 300
 Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn
 305 310 315 320
 Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys
 325 330 335
 Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile
 340 345 350
 Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg
 355 360 365
 Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr
 370 375 380
 Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
 385 390 395 400
 Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly

<210> 4

<211> 441

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 4

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu

1 5 10 15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys

 20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser

 35 40 45

Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr

 50 55 60

Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly

65 70 75 80

Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn

 85 90 95

Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn

 100 105 110

Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly

 115 120 125

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

 130 135 140

Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly

145 150 155 160

Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser

 165 170 175

Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys

 180 185 190

Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp

 195 200 205

Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 5

Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu Val Asn Thr Gly Pro Arg

1 5 10

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 6

Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met

1 5 10 15

Gln Ser Ala Asp Glu Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys

 20 25

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 7

Lys Asn Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp

1 5 10 15

Glu Glu Leu Arg

 20

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 8

Arg Gly Gly Ile Pro Thr Ser Glu Glu Phe Ser Ser Leu Asn Ser Gly

1 5 10 15

Asp Phe Thr Asp Asp Glu Asn Ser Glu Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp

 20 25 30

Arg

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 9

Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro

1 5 10 15

Lys

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Streptococcus equisimilis

<400>

> 10

Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro

1 5 10 15

Lys

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 13

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val

1 5

<210> 14

<211> 55

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gly Gly Thr Cys Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys

1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Gly Thr Gly

20 25 30

Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys Cys

35 40 45

Cys Thr Gly Thr Gly Cys Thr

50 55

<210> 15

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Cys Gly Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Cys

1 5 10 15

Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr

20 25 30

Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys

35 40 45

Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys

50 55 60

<210> 16
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 Ala Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr
 20 25 30
 Cys Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala
 35 40 45

 Thr Thr Thr Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 50 55 60

<210> 17
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 Ala Gly Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys
 20 25 30
 Thr Cys Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly
 35 40 45

 Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly
 50 55 60

<210> 18
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Thr Thr Cys Gly Ala Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Thr
 20 25 30

Gly Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly
 35 40 45

Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys
 50 55 60

<210> 19

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Cys Thr
 1 5 10 15

Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Ala Ala Thr
 20 25 30

Cys Ala Thr Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Thr
 35 40 45

Cys Thr Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys
 50 55 60

<210> 20

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Gly Cys Gly Thr Ala Cys Thr Cys Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
 1 5 10 15

Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr
 20 25 30

Cys Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly
 35 40 45

Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly
 50 55 60

<210> 21

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Gly
 20 25 30
 Cys Ala Ala Cys Gly Cys Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Gly Cys
 35 40 45

Thr Thr Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Ala Cys Thr
 50 55 60

<210> 22

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Gly Thr Ala Cys Cys Thr Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys
 1 5 10 15
 Thr Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Ala Cys Ala
 20 25 30
 Thr Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Cys
 35 40 45

Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly
 50 55 60

<210> 23

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Cys Cys Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr
 20 25 30

Cys Thr Gly Thr Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr
 35 40 45

Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys Ala Cys
 50 55 60

<210> 24

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys
 1 5 10 15

Cys Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Thr Cys Ala Ala
 20 25 30

Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr
 35 40 45

Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly
 50 55 60

<210> 25

<211> 57

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Cys Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Cys Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly
 20 25 30

Ala Thr Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Ala Gly
 35 40 45

Ala Gly Ala Cys Gly Gly Ala Gly Cys
 50 55

<210> 26

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Thr Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala Gly Cys Thr
 20 25 30
 Thr Thr Thr Gly Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala
 35 40 45

Ala Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala
 50 55 60

<210> 27

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Thr Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Cys Cys Cys Cys Gly Thr Gly
 20 25 30
 Gly Cys Thr Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala
 35 40 45

Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Ala Thr
 50 55 60

<210> 28

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Cys Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala
 20 25 30

Gly Cys Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Thr Gly
 35 40 45

Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Cys
 50 55 60

<210> 29

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Cys Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Gly Cys Cys Thr
 1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly
 20 25 30

Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys
 35 40 45

Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys
 50 55 60

<210> 30

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Cys Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys
 20 25 30

Cys Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys
 35 40 45

Gly Cys Cys Thr Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys
 50 55 60

<210> 31
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 31
 Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys
 20 25 30
 Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Ala Cys Cys
 35 40 45

Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Thr Gly Cys
 50 55 60

<210> 32
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 32
 Gly Gly Cys Thr Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr
 20 25 30
 Gly Thr Gly Cys Thr Ala Gly Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Thr Cys
 35 40 45

Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Gly Thr Cys Ala
 50 55 60

<210> 33
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 33
 Ala Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly
 20 25 30

Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly
 35 40 45

Ala Gly Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly
 50 55 60

<210> 34

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Cys Ala Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Gly Gly Cys Ala
 20 25 30

Thr Thr Gly Gly Ala Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala
 35 40 45

Gly Ala Cys Gly Cys Cys Gly Gly Thr Thr Cys Ala
 50 55 60

<210> 35

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Cys Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly
 20 25 30

Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala
 35 40 45

Thr Gly Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

<210> 36

<211> 59

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Cys Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Gly
 20 25 30
 Ala Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Gly Cys Thr Gly Gly
 35 40 45

Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala
 50 55

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Cys Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys
 1 5 10 15
 Cys Ala Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Thr Thr Gly Ala
 20 25 30
 Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Gly
 35 40 45

Gly Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr
 50 55

<210> 38

<211> 54

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Thr Gly Thr Cys Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys
 20 25 30

Cys Gly Gly Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Ala Gly
 35 40 45

Ala Ala Thr Thr Thr Thr
 50

<210> 39

<211> 52

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Cys Ala Cys Gly Thr Ala Thr Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly
 20 25 30

Gly Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Gly Ala Gly Gly
 35 40 45

Ala Cys Thr Thr
 50

<210> 40

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Cys
 20 25 30

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Gly Ala Ala Gly Thr Cys Thr
 35 40 45

Cys Ala Cys Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Thr

50

55

60

<210> 41
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 41
 Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Thr Cys Cys Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Cys
 20 25 30
 Ala Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala
 35 40 45

Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

<210> 42
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 42
 Cys Cys Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Thr Cys Cys Ala Cys Cys Thr
 1 5 10 15
 Thr Gly Thr Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala
 20 25 30
 Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Thr Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Thr Cys Cys
 50 55 60

<210> 43
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 43
 Gly Gly Ala Ala Gly Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Ala Thr Cys
 1 5 10 15

Thr Thr Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr
 20 25 30

Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys
 35 40 45

Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly
 50 55 60

<210> 44

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Cys Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys
 1 5 10 15

Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr
 20 25 30

Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys
 35 40 45

Gly Gly Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Ala
 50 55 60

<210> 45

<211> 3716

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 45

ccggaatcgc gggcacccaa gtgtgtaccg gcacagacat gaagttgcgg ctccctgcca 60
 gtcttgagac ccacctggac atgctccgcc acctgtacca gggctgtcag gtagtgcagg 120
 gcaacttgga gcttacctac gtgcctgcca atgccagcct ctcatctctg caggacatcc 180
 aggaagttea gggttacatg ctcatcgctc acaaccaggt gaagcgcgtc ccaactgcaaa 240
 ggctgcgcat cgtgagaggg acccagctct ttgaggacaa gtatgccctg gctgtgctag 300

acaaccgaga tctcaggac aatgtcgccg cctccacccc aggcagaacc ccagaggggc 360
 tgcgggagct gcagcttcca agtctcacag agatcctgaa gggaggagtt ttgatccgtg 420
 ggaaccctca gctctgctac caggacatgg ttttgtggaa ggacgtcttc cgcaagaata 480

accaactggc tctgtc gat atagacacca atcgttcccg ggcctgtcca cttgtgccc 540
 ccgcctgcaa agacaatcac tgttgggggtg agagtccgga agactgtcag atcttgactg 600
 gcaccatctg taccagtgg tgtgcccgt gcaagggccg gctgcccact gactgctgcc 660
 atgagcagtg tgccgcaggc tgcacgggccc ccaagcattc tgactgcctg gcctgcctcc 720

 acttcaatca tagtggatc tgtgagctgc actgccccagc cctcgtcacc tacaacacag 780
 acacctttga gtccatgcac aacctgagg gtcgctacac ctttgggtgcc agctgcgtga 840
 ccacctgccc ctacaactac ctgtctacgg aagtgggatac ctgcactctg gtgtgtcccc 900
 cgaataacca agaggtcaca gctgaggacg gaacacagcg ttgtgagaaa tgcagcaagc 960
 cctgtgctcg agtgtgctat ggtctgggca tggagcacct tcgagggcg agggccatca 1020
 ccagtgaaa tgtccaggag tttgatggct gcaagaagat ctttgggagc ctggcatttt 1080
 tgccggagag ctttggatggg gaccctcct ccggcattgc tccgctgagg cctgagcagc 1140

 tccaagtgtt cgaaacctg gaggagatca caggttacct gtacatctca gcatggccag 1200
 acagtctccg tgacctcagt gtctccaga accttcgaat cattcgggga cggattctcc 1260
 acgatggcgc gtactcattg acactgcaag gcctggggat ccaactcgtg gggctgcgct 1320
 cactgcggga gctgggcagt ggattggctc tgattaccg caaccccat ctctgctttg 1380
 tacacactgt accttgggac cagctcttc ggaaccaca tcaggccctg ctccacagtg 1440
 ggaaccggcc ggaagaggat tgtgtctcg agggcttggg ctgtaactca ctgtgtgccc 1500
 acgggcactg ctgggggcca gggcccacc agtgtgtcaa ctgcagtcattt ccttcggg 1560

 gccaggagtg tgtggaggag tgccgagtat ggaaggggct cccccgggag tatgtgagtg 1620
 acaagcgtg tctgccgtgt caccocagat gtcagcctca aaacagctca gagacctgct 1680
 ttggatcgga ggctgatcag tgtgcagcct gcgccacta caaggactcg tctcctgtg 1740
 tggctcgtg cccagtggt gtgaaaccgg acctctcta catgccatc tggagtaacc 1800
 cggatgagga gggcatatgc cagccgtgcc ccatcaactg caccactcc tgtgtggatc 1860
 tggatgaacg aggtgcccga gcagagcaga gagccagccc ggtgacattc atcattgcaa 1920
 ctgtagtggg cgtcctgctg ttctgatct tagtgggtgt cgttggatc ctaatcaaac 1980

 gaaggagaca gaagatccgg aagtatacga tgcgtaggct gctgcaggaa actgagttag 2040
 tggagccgct gacgccagc ggagcaatgc ccaaccagge tcagatgcgg atcctaaaag 2100
 agaccggact aaggaagggtg aagggtcttg gatcaggagc ttttggcact gtctacaagg 2160
 gcatctggat cccagatggg gagaatgtga aaatccccgt ggctatcaag gtgttgagag 2220
 aaaacacatc tctaaaagg aacaaagaaa ttctagatga agcgtatgtg atggctgggtg 2280
 tgggttctcc gtatgtgtcc cgcctcctgg gcatctgcct gacatccaca gtacagctgg 2340

tgacacagct tatgccctac ggctgccttc tggacatgt ccgagaacac cgaggtcgcc 2400

 taggctccca ggacctgctc aactggtgtg ttcagattgc caaggggatg agctacctgg 2460
 aggacgtgcg gcttgtacac agggacctgg ctgcccggaa tgtgctagtc aagagtccca 2520
 accacgtcaa gattacagat ttcgggctgg ctcggtgct ggacattgat gagacagagt 2580
 accatgcaga tgggggcaag gtgcccatca aatggatggc attggaatct attctcagac 2640
 gccggttac ccatcagagt gatgtgtgga gctatggagt gactgtgtgg gagctgatga 2700
 cttttggggc caaaccttac gatggaatcc cagccccgga gatccctgat ttgctggaga 2760
 agggagaacg cctacctcag cctccaatct gcaccattga tgtctacatg attatggtca 2820

 aatgttggat gattgactct gaatgctgcc cgagattccg ggagtgtgtg tcagaatfff 2880
 cacgtatggc gagggacccc cagcgttttg tggcatcca gaacgaggac ttgggcccac 2940
 ccagcccacat ggacagtacc ttctaccgtt cactgctgga agatgatgac atgggtgacc 3000
 tggtagacgc tgaagaglat ctggtgcccc agcagggatt cttctccccg gaccctacce 3060
 caggcactgg gagcacagcc catagaaggc accgcagctc gtccaccagg agtggaggtg 3120
 gtgagctgac actgggctg gagecctcgg aagaagggcc ccccagatct ccaactggctc 3180
 cctcggaagg ggctggctcc gatgtgtttg atggtgacct ggcaatgggg gtaaccaaag 3240

 ggctgcagag cctctctcca catgacctca gccctctaca gcggtacagc gaggacccca 3300
 cattacctct gcccccgag actgatggct atgttgctcc cctggcctgc agccccagc 3360
 ccgagtatgt gaaccaatca gaggttcagc ctgacctcc ttaacceca gaggtcctc 3420
 tgctcctgt ccggcctgct ggtgctactc tagaaagacc caagactctc tctcctggga 3480
 agaatggggt tgcmaaagac gtttttgctc tcgggggtgc tgtggagaac cctgaatact 3540
 tagtaccgag agaaggcact gcctctccgc cccaccttc tctgcttc agcccagcct 3600
 ttgacaacct ctatactgg gaccagaact catcggagca ggggcctcca ccaagtaact 3660

 ttgaaggac cccactgca gagaacctg agtacctagg cctggatgta cctgta 3716
 <210> 46
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 46
 cccaggcaga accccagagg ggctgcggga gctgcagctt cgaagtctca cagagatcct 60
 gaagggagga gttttgatcc gtgggaacce tcagctctgc taccaggaca tggttttgtg 120
 gaaggacgtc ttccgcaaga ataaccaact ggctcctgctc gatatagaca ccaatcgttc 180

ccgggcctgt ccaccttgtg cccccgcctg caaagacaat cactgttggg gtgagagtcc 240
 ggaagactgt cagatcttga ctggcaccaat ctgtaccagt ggttgtgccc ggtgcaaggg 300

 ccggtgcccc actgactgct gccatgagca gtgtgcccga ggctgcacgg gecccaagca 360
 <210> 47
 <211> 618
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 47
 ggtcacagct gaggacggaa cacagcgttg tgagaaatgc agcaagccct gtgctcgagt 60
 gtgctatggt ctgggcatgg agcaccttcg aggggcgagg gccatcacca gtgacaatgt 120
 ccaggagttt gatggctgca agaagatctt tgggagcctg gcatttttgc cggagagctt 180
 tgatggggac cctcctccg gcattgctcc gctgaggcct gagcagctcc aagtgttcga 240
 aacctggag gagatcacag gttacctgta catctcagca tggccagaca gtctccgtga 300

 cctcagtgtc ttccagaacc tttegaateat tcggggacgg attctccacg atggcgcgta 360
 ctcatgaca ctgcaagccc tgggatcca ctgctgggg ctgctctcac tgcgggagct 420
 gggcagtgga ttggctctga ttcaccgcaa cgcccatctc tgctttgtac aactgtacc 480
 ttgggaccag ctcttcgga acccacatca ggccctgctc cacagtggga accggccgga 540
 agaggattgt ggtctcaggg gcttggctctg taactcactg tgtgcccacg ggcactgctg 600
 ggggccaggg cccacca 618
 <210> 48
 <211> 929
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

 <400> 48
 cgcccagcgg agcaatgcc aaccaggctc agatgcggat cctaaaagag acggagctaa 60
 ggaagtgaa ggtgcttggg tcaggagctt ttggcactgt ctacaaggc atctggatcc 120
 cagatgggga gaatgtgaaa atccccgtgg ctatcaaggt gttgagagaa aacacatctc 180
 ctaaagccaa caaagaaatt ctagatgaag cgtatgtgat ggctgggtg gttctccgt 240
 atgtgtccc cctcctgggc atctgcctga catccacagt acagctggtg acacagctta 300
 tgcctacgg ctgcctctg gaccatgtcc gagaacaccg aggtcgctta ggctcccagg 360
 acctgctcaa ctggtgtgtt cagattgcca aggggatgag ctacctggag gacgtgcggc 420

ttgtacacag ggacctggct gcccggaatg tgctagtcaa gagtcccaac cacgtcaaga 480
 ttacagatth cgggctggct cggctgctgg acattgatga gacagagtac catgcagatg 540
 ggggcaaggt gcccataaaa tggatggcat tggaaatctat tctcagacgc cggttcacc 600
 atcagagtga tigtgggagc tatggagtga ctgtgtggga gctgatgact tttggggcca 660
 aaccttacga tggaaatccca gcccgggaga tccttgattt gctggagaag ggagaacgcc 720
 tacctcagcc tccaatctgc accattgatg tctacatgat tatggtcaaa tgttgatga 780
 ttgactctga atgtcgcgag agattccggg agttgggtgc agaattttca cgtatggcga 840

gggaccccca gcgttttggt gtcacccaga acgaggactt gggcccatcc agcccatgg 900
 acagtacctt ctaccgttca ctgctggaa 929

<210> 49

<211> 3798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctctctctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60
 gcgagcacc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccag 120
 acccactgg acatgctccg ccacctctac cagggtctgc aggtggtgca gggaaacctg 180
 gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240

cagggtctag tctcatcgc tcacaacaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctcgg 300
 attgtgcgag gacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360
 gaccctgta acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
 cagcttcgaa gctcaccaga gatcttgaaa ggagggtct tcatccagcg gaacccccag 480
 ctctgtacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
 ctcaactga tagacaccaa ccgctctcgg gctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600
 ggctcccgt gctggggaga gatttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660

gccggtggct gtcccctg caaggggcca ctgccactg actgctgcca tgagcagtgt 720
 gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca ctcaaccac 780
 agtggcatct gtgagctgca ctgccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840
 tccatgcca atcccaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgctgtccc 900
 tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcacctcg tctgcccct gcacaacaa 960
 gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgccga 1020

gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080

atccaggagt ttcttggtcg caagaagatc ttggggagcc tggcatttct gccggagagc 1140

tttgatgggg acccagcctc caaactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200

gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260

gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

tactcgctga cctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380

ctgggcagtg gactggcctt catccacat aacaccacc tctgcttctg gcacacggtg 1440

ccctgggacc agctctttcg gaaccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500

gaggacgagt gtgtggcgga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560

tgggtccag ggcccacca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620

gtggaggaat gccagtact gcaggggctc cccaggaggt atgtaatgc caggcactgt 1680

ttgccgtgcc acctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740

gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctcgct ggcccctgc 1800

cccagcggtg tgaacctga cctctcctac atgccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860

ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920

ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcgtctctgc ggtggttggc 1980

attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc ttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040

aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100

acacctagcg gagcgtgcc caaccaggcg cagatgcgga tctgaaaga gacggagctg 2160

aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct ttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220

cctgatgggg agaattgtaa aattccagtg gccatcaaag tgttgagga aacacatcc 2280

cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggtggtgt gggctcccca 2340

tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400

atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460

gacctgctga actggtgat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtcgcg 2520

ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580

attacagact tcgggtggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640

gggggcaagg tgccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccc gcggttcacc 2700

caccagagtg atgigtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760

aaaccttacg atgggatccc agccccggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820
 ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtaa atgttgatg 2880
 attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940
 agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggccagc cagtcccttg 3000
 gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggaatgct 3060
 gaggagtatc tggtaaccca gcagggttc tctgtccag acctgcccc gggcgtggg 3120
 ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcgtgg ggacctgaca 3180

ctagggtctg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaagg 3240
 gctggctccg atgtattga tggtagacct ggaatggggg cagccaagg gctgcaaagc 3300
 ctccccacac atgacccag ccctctacag cgttacagtg aggacccac agtaccctg 3360
 ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctgacctgca gccccagcc tgaatatgtg 3420
 aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480
 cgacctgctg gtgccactct ggaaagggcc aagactctct ccccaggaa gaatggggtc 3540
 gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacacccag 3600

ggaggagctg cccctcagcc ccacctcct cctgccttca gccagcctt cgacaacctc 3660
 tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720
 cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtgaac cagaaggcca 3780
 agtccgcaga agccctga 3798

<210> 50

<211> 393

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

gagaccacc tggacatgct ccgccacctc taccaggct gccaggtgt gcagggaaac 60
 ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tctgcagga tatccaggag 120

gtgcaggct acgtgctcat cgctcacaac caagtgggc aggtcccact gcagaggctg 180
 cggattgtgc gaggcaccca gctctttgag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat 240
 ggagaccgc tgaacaatac caccctgtc acagggcct ccccaggagg cctgcgggag 300
 ctgcagcttc gaagcctcac agagatcttg aaaggaggg tcttgatcca gcggaacccc 360
 cagctctgct accaggacac gatcttggg aag 393

<210> 51

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Ala Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly

1 5 10 15

Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr

20 25 30

Cys Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala

35 40 45

Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Thr

50 55 60

Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys

65 70 75 80

Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly

85 90 95

Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys

100 105 110

Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly Thr Thr Thr Gly Ala Gly Ala Cys

115 120 125

Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala

130 135 140

Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr

145 150 155 160

Cys Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Ala Gly

165 170 175

Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys

180 185 190

Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Cys

195 200 205

Ala Ala Gly Thr Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly

210 215 220

ttacgcgcag accaaaaacga tctcaagaag atcatcttat taatcagata aaatatttct 840
agccctcctt tgattagtat attcctatct taaagtact tttatgtgga ggcattaaca 900
tttgftaatg acgtcaaaag gatagcaaga ctagaataaa gctataaagc aagcatataa 960
tattgcgttt catctttaga agcgaatttc gccaatatta taattatcaa aagagagggg 1020

tggcaaacgg tatttggcat tattaggtta aaaaatgtag aaggagagtg aaacctatga 1080
aaaaataat gctagttttt attacactta tattagttag tctaccaatt gcgcaacaaa 1140
ctgaagcaaa ggatgcatct gcattcaata aagaaaattc aatttcatcc atggcaccac 1200
cagcatctcc gcctgcaagt cctaagacgc caatcgaaaa gaaacacgcg gatgaaatcg 1260
ataagtatat acaaggattg gattacaata aaaacaatgt attagtatac cacggagatg 1320
cagtgacaaa tgtgcccca agaaaaggtt acaaatgatg aatgaatat attgttgg 1380
agaaaaagaa gaaatccatc aatcaaaata atgcagacat tcaagttgtg aatgcaattt 1440

cgagcctaac ctatccaggt gctctcgtaa aagcgaattc ggaattagta gaaaatcaac 1500
cagatgttct cctgtaaaa cgtgattcat taacactcag cattgatttg ccaggtatga 1560
ctaatcaaga caataaaata gttgtaaaaa atgccactaa atcaaacgtt aacaacgcag 1620
taaatacatt agtggaaaga tggaaatgaaa aatatgctca agcttatcca aatgtaagtg 1680
caaaaattga ttatgatgac gaaatggctt acagtgaatc acaattaatt gcgaaatttg 1740
gtacagcatt taaagctgta aataatagct tgaatgtaaa cttcggcgca atcagtgaag 1800
ggaaaatgca agaagaagtc attagtttta acaaattta ctataacgtg aatgttaatg 1860

aacctacaag accttcaga ttttcggca aagctgttac taaagagcag ttgcaagcgc 1920
ttggagtga tgcagaaaat cctcctgcat atatctcaag tgtggcgtat ggccgtcaag 1980
tttatttgaa attatcaact aattccata gtactaaagt aaaagctgct tttgatgctg 2040
ccgtaagcgg aaaatctgtc tcaggtgatg tagaactaac aaatatac ccaaaaattctt 2100
ccttcaaagc cglattttac ggaggttccg caaaagatga agttcaaatc atcgacggca 2160
acctcggaga cttacgcgat attttgaaaa aaggcgtac ttttaacga gaaacaccag 2220
gagttcccat tgcttataca acaaacttcc taaaagacaa tgaattagct gttattaaaa 2280

acaactcaga atatattgaa acaacttcaa aagcttatac agatggaaaa attaacatcg 2340
atcactctgg aggatacgtt gctcaattca acatttcttg ggatgaagta aattatgac 2400
tcgagacca cctggacatg ctccgccacc tctaccaggg ctgccaggtg gtgcagggaa 2460
acctggaact cacctacctg cccaccaatg ccagcctgtc cttcctgcag gatatccagg 2520
aggtgcaggg ctacgtgtc atcgtcaca accaagtgag gcaggtccca ctgcagaggc 2580
tgcggattgt gcgagccacc cagctctttg aggacaacta tgccttgcc gtgctagaca 2640

atggagacc gctgaacaat accaccctg tcacaggggc ctccccagga gcctgcggg 2700

agctgcagct tcgaagcctc acagagatct tgaaggagg ggtcttgatc cagcgaacc 2760

cccagctctg ctaccaggac acgattttgt ggaagaatat ccaggagttt getggetgca 2820

agaagatctt tgggagcctg gcatttctgc cggagagctt tgatggggac ccagcctcca 2880

acactgcccc gctccagcca gagcagctcc aagtgtttga gactctggaa gagatcacag 2940

gttacctata catctcagca tggccggaca gcctgcctga cctcagcgtc ttccagaacc 3000

tgcaagtaat ccggggacga attctgcaca atggcgcta ctcgctgacc ctgcaagggc 3060

tgggcatcag ctggctgggg ctgctctcac tgagggaact gggcagtgga ctggccctca 3120

tccaccataa caccacctc tgcttcgtgc acacggtgcc ctgggaccag ctcttcgga 3180

accgcacca agctctgctc cacactgcca accggccaga ggacgagtgt gtgggcgagg 3240

gcctggcctg ccaccagctg tgcgccgag ggcagcagaa gatccggaag tacacgatgc 3300

ggagactgct gcaggaaacg gagctggtgg agccgctgac acctagcgga gcgatgcca 3360

accaggcgca gatgcggatc ctgaaagaga cggagctgag gaaggtgaag gtgcttggat 3420

ctggcgcttt tggcacagtc tacaagggca tctggatccc tgatggggag aatgtgaaaa 3480

ttccagtggc catcaaagtg ttgagggaaa acacatcccc caaagccaac aaagaaatct 3540

tagacgaagc atacgtgatg gctggtgtgg gctccccata tgtctcccgc ctctctggca 3600

tctgcctgac atccacggtg cagctggtga cacagcttat gccctatggc tgcccttag 3660

actaatctag acccgggcca ctaactcaac gctagtagtg gatttaatcc caaatgagcc 3720

aacagaacca gaaccagaaa cagaacaagt aacattggag ttagaaatgg aagaagaaaa 3780

aagcaatgat ttcgtgtgaa taatgcacga aatcattgct tatttttta aaaagcgata 3840

tactagatat aacgaaaca cgaactgaat aaagaatata aaaaagagc cagcaccagt 3900

taaagcctga gaaacttta ctgagcct taattgatta ccaccaatca attaaagaag 3960

tcgagacca aaatttgta aagtattta ttactttatt aatcagatac ttaaatatct 4020

gtaaaccat tatatcgggt ttttagggg atttcaagtc ttaagaaga taccaggcaa 4080

tcaattaaga aaaacttagt tgattgcctt tttgtgtg attcaacttt gatcgtagct 4140

tctaactaat taatttcgt aagaaggag aacagctgaa tgaatatccc tttgtgtgta 4200

gaaactgtgc ttcatgacgg ctgtttaaag tacaattta aaaatagtaa aattcgtca 4260

atcactacca agccaggtaa aagtaaagg gctatTTTTG cgtatcgctc aaaaaaagc 4320

atgattggcg gacgtggcgt tgttctgact tccgaagaag cgattcacga aatcaagat 4380

acatttacgc attggacacc aaacgtttat cgttatggta cgtatgcaga cgaaaaccgt 4440
 tcatacacta aaggacattc tgaaaacaat ttaagacaaa tcaatacctt ctttattgat 4500
 ttgatattc acacgaaaaa agaaactatt tcagcaagcg atattttaac aacagctatt 4560
 gatttaggtt ttatgcctac gtttaattatc aaatctgata aaggttatca agcatatfff 4620
 gttttagaaa cgccagtcta tgtgacttca aaatcagaat ttaaatctgt caaagcagcc 4680
 aaaataatct cgcaaaat at cggagaatat ttggaaaagt ctttgccagt tgatctaacg 4740
 tgcaatcatt ttgggattgc tegtatacca agaacggaca atgtagaatt ttttgatccc 4800

aattaccgtt attctttcaa agaatggcaa gattggfctt tcaaacaac agataataag 4860
 ggctttactc gttcaagctt aacggtttta agcggtagag aaggcaaaaa acaagtagat 4920
 gaaccctggt ttaatctctt attgcacgaa acgaaatfff caggagaaaa gggtttagta 4980
 gggcgcaata gcggtatggt taccctctct ttagcctact ttagttcagg ctattcaatc 5040
 gaaacgtgcg aatataatat gtttgagttt aataatcgat tagatcaacc cttagaagaa 5100
 aaagaagtaa tcaaaattgt tagaagtgcc tattcagaaa actatcaagg ggctaatagg 5160
 gaatacatta ccattctttg caaagcttgg gtatcaagtg atttaaccag taaagattta 5220

ttgtccgtc aagggtggtt taaattcaag aaaaaaagaa gcgaacgtca acgtgttcat 5280
 ttgtcagaat gaaagaaga tttaatggct tatattagcg aaaaaagcga tgtatacaag 5340
 ccttatttag cgacgaccaa aaaagagatt agagaagtgc taggcattcc tgaacggaca 5400
 ttagataaat tgctgaaggt actgaaggcg aatcaggaaa ttttctttaa gattaacca 5460
 ggaagaaatg gtggcattca acttgctagt gttaaatcat tgttgctatc gatcattaaa 5520
 ttaaaaaaag aagaacgaga aagctatata aaggcgtga cagcttcggt taatttagaa 5580
 cgtacattta ttcaagaac tctaacaaca ttggcagaac gccccaaac ggaccacaa 5640

ctcgatttgt ttagctacga tacaggctga aaataaaacc cgcaactatgc cattacattt 5700
 atatctatga tacgtgtttg ttttctttg ctggctagct taattgctta tatttacctg 5760
 caataaagga tttcttactt ccattatact cccattttcc aaaaacatac ggggaacacg 5820
 ggaacttatt gtacaggcca cctcatagtt aatggtttcg agccttctg caatctcatc 5880
 catggaata tattcatccc cctgccggcc tattaatgtg acttttgtgc ccggcggata 5940
 ttctgatcc agctccacca taaattggtc catgcaaatt cggccggcaa ttttcaggcg 6000
 ttttcccttc acaaggatgt cggteccctt caattttcgg agccagccgt ccgcatagcc 6060

tacaggcacc gtcccgatcc atgtgtcttt ttccgctgtg tactcggctc cgtagctgac 6120
 gctctcgctt tttctgatca gtttgacatg tgacagtgc gaatgcaggg taaatgccgg 6180
 acgcagctga aacggtatct cgtccgacat gtcagcagac gggcgaaggc catacatgcc 6240

gatgccgaat ctgactgcat taaaaaagcc ttttttcagc cggagtccag cggcgcgtgtt 6300
 cgcgcagtgg accattagat tctttaacgg cagcggagca atcagctctt taaagcgtc 6360
 aaactgcatt aagaaatagc ctctttcttt ttcacccgct gtcgcaaaat gggtaaatac 6420
 ccctttgcac tttaaacgag ggttgcggtc aagaattgcc atcacgttct gaacttcttc 6480

ctctgttttt acaccaagtc tgttcatccc cgtatcgacc ttcagatgaa aatgaagaga 6540
 accttttttc gtgtggcggg ctgectctcg aagccattca acagaataac ctgttaaggt 6600
 cacgtcatac tcagcagcga ttgccacata ctccggggga accgcgcaa gcaccaatat 6660
 aggcgccttc aatccctttt tgcgcagtga aatcgcttca tccaaaatgg ccacggccaa 6720
 gcatgaagca cctgcgtcaa gagcagcctt tgcgttttct gcatcacat gcccgtaggc 6780
 gtttgctttc acaactgcca tcaagtggac atgttcaccg atatgttttt tcatattgct 6840
 gacattttcc tttatcgcg gacaagtcaat ttcgccccac gtatctctgt aaaaaggttt 6900

tgtgctcatg gaaaactcct ctcttttttc agaaaatccc agtacgtaat taagtatttg 6960
 agaattaatt ttatattgat taatactaag tttaccaggt tttcacctaa aaaacaaatg 7020
 atgagataat agctccaaag gctaaagagg actataccaa ctatttgta attaa 7075

<210> 54
 <211> 921
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

gccgcgagca cccaagtgtg caccggcaca gacatgaagc tgcggctccc tgccagtccc 60
 gagaccacc tggacatgct cgcaccctc taccagggt gccaggtgt gcagggaaac 120
 ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tctgcagga tatccaggag 180

gtgcagggt acgtgctcat cgctcacaac caagtgaggc aggtcccact gcagaggctg 240
 cggattgtgc gaggcacca gctctttgag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat 300
 ggagaccgc tgaacaatac caccctgtc acagggcct ccccaggagg cctgcgggag 360
 ctgcagcttc gaagcctcac agagatcttg aaaggagggg tcttgatcca gcggaacccc 420
 cagctctgct accaggacac gattttgtgg aaggacatct tccacaagaa caaccagctg 480
 gctctcacac tgatagacac caaccgctct cgggcctgcc accctgttc tccgatgtgt 540
 aagggtccc gctgctgggg agagagtctt gaggattgtc agagcctgac gcgcactgtc 600

tgtgccggtg gctgtgcccc ctgcaagggg ccaactgcca ctgactgtg ccatgagcag 660
 tgtgtgctccg gctgcacggg cccaagcac tctgactgcc tggcctgcct ccaactcaac 720

cacagtggca tctgtgagct gcactgccca gccctgggtca cctacaacac agacacgttt 780
 gactccatgc ccaatcccga gggccgggtat acattcggcg ccagctgtgt gactgcctgt 840
 ccctacaact acctttctac ggacgtggga tcctgcaccc tcgtctgccc cctgcacaac 900
 caagaggtga cagcagagga t 921

<210> 55

<211> 597

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

tacctttcta cggacgtggg atcctgcacc ctctctgccc ccctgcacaa ccaagaggtg 60
 acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc ccgagtgtgc 120
 tatggctctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc caatatccag 180
 gagtttgctg gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgccgga gagctttgat 240
 ggggaccag cctccaacac tgccccctc cagccagagc agtccaagt gtttgagact 300
 ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct gcctgacctc 360
 agcgtcttcc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg cgctactc 420

ctgaccctgc aagggtctgg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag ggaactgggc 480
 agtggactgg ccctcatcca ccataacacc cacctctgct tcgtgcacac ggtgccctgg 540
 gaccagctct ttcggaacct gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg gccagag 597

<210> 56

<211> 1209

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

cagcagaaga tccggaagta cacgatgcgg agactgctgc aggaaacgga gctggtggag 60
 ccgctgacac ctagcggagc gatgcccaac caggcgcaga tgcggatcct gaaagagacg 120
 gagctgagga aggtgaaggt gcttggatct ggcgcttttg gcacagtcta caagggcacc 180

tggatccctg atggggagaa tgtgaaaatt ccagtggcca tcaaagtgtt gagggaaaac 240
 acatcccca aagccaacaa agaaatctta gacgaagcat acgtgatggc tgggtgggc 300
 tccccatag tctcccctc tctgggcacc tgctgacat ccacgggtgca gctggtgaca 360
 cagcttatgc cctatggctg cctcttagac catgtccggg aaaaccgagg acgcctgggc 420
 tcccaggacc tgctgaactg gtgtatgcag attgccaagg ggatgagcta cctggaggat 480

gtgctggctcg tacacagggg cttggccgct cggaacgtgc tggtaagag tccaacat 540
gtcaaaatta cagacttcgg gctggctcgg ctgctggaca ttgacgagac agagtacat 600

gcagatgggg gcaaggtgcc catcaagtgg atggcgtgg agtccattct cgcgcggcgg 660
ttcaccacc agagtgatgt gtggagtat ggtgtgactg tgtgggagct gatgactttt 720
ggggcctaac cttacgatgg gatccagcc cgggagatcc ctgacctgct ggaaaagggg 780
gagcggctgc ccagccccc catctgcacc attgatgtct acatgatcat ggtcaaatgt 840
tggatgattg actctgaatg tcggccaaga ttccgggagt tgggtgtctga attctcccgc 900
atggccaggg acccccagcg ctttgggtc atccagaatg aggacttggg ccagccagc 960
cccttggaca gcaccttcta ccgctcactg ctggaggacg atgacatggg ggacctggtg 1020

gatgctgagg agtatctggt accccagcag ggcttcttct gtccagacc tgccccgggc 1080
gctgggggca tggccacca caggcacgc agctcatcta ccaggagtgg cgggtggggac 1140
ctgacactag ggctggagcc ctctgaagag gaggccccca ggtctccact ggcacctcc 1200
gaaggggct 1209

<210> 57
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Her-2-Chimera (F)
<400> 57
tgatctcgag acccacctgg acatgctc 28
<210> 58
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HerEC1-EC2F (Junction)
<400> 58
ctaccaggac acgattttgt ggaagaatat ccaggagttt gctggctgc 49
<210> 59
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HerEC1-EC2R (Junction)

<400> 59
gcagccagca aactcctgga tattcttcca caaatcgtg tcctggtag 49

<210> 60
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HerEC2-ICIF (Junction)
<400> 60
ctgccaccag ctgtgcgcc gagggcagca gaagatccgg aagtacacga 50

<210> 61
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HerEC2-ICIR (Junction)
<400> 61
tcgtgtactt ccggatcttc tgctgccctc gggcgcacag ctggtggcag 50

<210> 62
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Her-2-Chimera (R)
<400> 62
gtggcccggg tctagattag tctaagaggc agccatagg 39

<210> 63
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Her-2-EC1(F)
<400> 63
ccgcctcgag gccgcgagca cccaagtg 28

<210> 64
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Her-2-EC1(R)
 <400> 64
 cgcgactagt ttaatcctct gctgtcacct c 31
 <210> 65
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Her-2-EC2(F)
 <400> 65
 ccgcctcgag tacctttcta cggacgtg 28
 <210> 66
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Her- 2- EC2(R)
 <400> 66
 cgcgactagt ttactctggc cggttggcag 30
 <210> 67
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Her-2-Her-2-IC1(F)
 <400> 67
 ccgcctcgag cagcagaaga tccggaagta c 31
 <210> 68
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Her-2-IC1(R)
 <400> 68
 cgcgactagt ttaagccct tcggagggtg 30