



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0109582
(43) 공개일자 2017년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/42 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/0011 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7022218
(22) 출원일자(국제) 2016년02월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년08월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/016682
(87) 국제공개번호 WO 2016/127015
국제공개일자 2016년08월11일
(30) 우선권주장
62/113,153 2015년02월06일 미국(US)
62/174,942 2015년06월12일 미국(US)

(71) 출원인
히트 바이오로직스, 인코퍼레이티드
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피
톨라 드라이브 801
(72) 발명자
슈라이버 테일러
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피
톨라 드라이브 801
프롬 조지
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피
톨라 드라이브 801
(74) 대리인
특허법인아주김장리

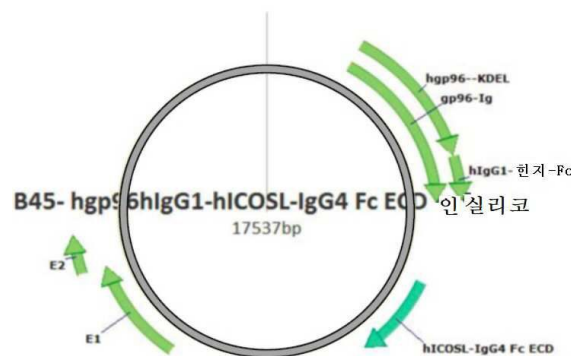
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 **백터 공동 발현 백신 및 공동 자극 분자**

(57) 요약

단일 백터로부터 특히 분비 가능한 백신 단백질(예컨대 gp96-Ig) 및 T-세포 공동 자극 분자를 공동발현시키기 위한 조성물 및 방법이 본 명세서에 제공된다. 대상체에서 임상 병태(예를 들어, 암)를 치료하기 위해 gp96-Ig 백신접종 및 T-세포 공동자극을 이용하는 물질 및 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 39/42 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C07K 14/70532 (2013.01)
C07K 14/70575 (2013.01)
A61K 2039/5258 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

발현 벡터로서, 분비 가능한 백신 단백질(secretable vaccine protein)을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질(costimulatory fusion protein)을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함 하되, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시키는, 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 벡터는 포유류 발현 벡터인, 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백신 단백질은 선택적으로 gp96 KDEL(서열번호 3) 서열이 없는, 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질인, 발현 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 gp96-Ig 융합 단백질 내 상기 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 OX40L-Ig, 또는 이의 OX40에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 ICOSL-Ig, 또는 이의 ICOS에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 4-1BBL-Ig, 또는 이의 4-1BBR에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 TL1A-Ig, 또는 이의 TNFRSF25에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 GITRL-Ig, 또는 이의 GITR에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 CD40L-Ig, 또는 이의 CD40에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 CD70-Ig, 또는 이의 CD27에 결합하는 부분인, 발현 벡터.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질 내 상기 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 발현 벡터는 DNA를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 발현 벡터는 RNA를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 15

조성물로서, 분비 가능한 백신 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하되, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상제에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시키는, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 벡터는 DNA-기반 포유류 발현 벡터인, 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 분비 가능한 백신 단백질은 선택적으로 gp96 KDEL(서열번호 3) 서열이 없는, 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질인, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 gp96-Ig 융합 단백질 내 상기 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함하는, 조성물.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 OX40-Ig, 또는 이의 OX40에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 ICOSL-Ig, 또는 이의 ICOS에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 4-1BBL-Ig, 또는 이의 4-1BBR에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 TL1A-Ig, 또는 이의 TNFRSF25에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 GITRL-Ig, 또는 이의 GITR에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 CD40L-Ig, 또는 이의 CD40에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 CD70-Ig, 또는 이의 CD27에 결합하는 부분인, 조성물.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질 내 상기 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함하는, 조성물.

청구항 27

제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자 내로 혼입되는, 조성물.

청구항 28

제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 인간 종양 세포 내로 혼입되는, 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 인간 종양 세포는 확립된 NSCLC, 방광암, 흑색종, 난소암, 신세포 암종, 전립선 암종, 육종, 유방 암종, 편평세포 암종, 두경부 암종, 간세포 암종, 췌장 암종 또는 결장 암종 세포주로부터의 세포인, 조성물.

청구항 30

대상체를 치료하는 방법으로서, 분비 가능한 백신 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 T 세포 공동자극 융합 단백질은 상기 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시키는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자 내로 혼입된, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 벡터는 인간 종양 세포 내로 혼입된, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간 암 환자인, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 인간 환자에 대한 상기 조성물의 투여는 상기 환자에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식을 증가시키는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 환자에서 종양 항원 특이적 T 세포의 상기 활성화 또는 증식은 상기 투여 전에 상기 환자에서의 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식 수준에 비해 적어도 25%만큼 증가되는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 36

제30항에 있어서, 종양 세포에 의해 생성되는 면역억제 분자를 저해하는 제제와 병용하여 인간 암 환자에게 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 제제는 PD-1에 대한 항체인, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 38

제30항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 급성 또는 만성 감염을 갖는 인간인, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 급성 또는 만성 감염은 C형 간염바이러스, B형 간염바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 또는 말라리아에 의한 감염인, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 인간 환자에 대한 상기 조성물의 투여는 병원성 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식을 자극하는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 41

제30항에 있어서, 상기 T 세포 공동자극 분자는 gp96-Ig 백신접종 단독보다 더 큰 수준으로 상기 대상체에서 항원-특이적 T 세포의 상기 활성화를 향상시키는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 42

제30항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분비 가능한 백신 단백질은 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질인, 대상체를 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2015년 2월 6일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/113,153호, 및 2015년 6월 12일자로 출원된 제 62/174,942호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 기초출원 모두의 전문은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 문헌은, 특히, 백신(예를 들어, gp96-Ig) 및 단일 백터로부터의 T-세포 공동 자극(co-stimulation) 분자를 공동 발현시키는 물질 및 방법을 포함하는, 대상체에서 임상 병태를 치료하기 위해 백신접종 및 T-세포 공동 자극을 이용하는 물질 및 방법에 관한 것이다.

[0005]

전자적으로 제출된 텍스트 파일의 설명

[0006]

본 명세서에 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용은 그들의 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다: 서열목록의 컴퓨터 판독 가능한 형식 사본(파일명: HTB-021PC-SequenceListing.txt; 기록일: 2016년 2월 4일, 파일 용량: 73 KB).

배경 기술

[0007]

암은 정상 세포의 수명을 연장시키는 장기간의 유전적 불안정성으로부터 생기는 질환이다. 이 기간의 시작을 표시하는 촉발 사건은 세포 유형 간에 가변적이지만, 통상적으로는 종양 억제 유전자, 예컨대 p53 또는 Rb에서의 돌연변이, 원발암 유전자, 예컨대 KRAS 또는 myc에서의 돌연변이, 또는 발암 바이러스, 예컨대 HPV16 또는 EBV에 의한 세포의 감염의 획득이다. 유래가 무엇이든지, 세포가 정상 성장 조절 또는 세포사 경로를 벗어나게 할 수 있는 유전자 내 돌연변이를 획득한 세포는 추가적인 돌연변이를 획득할 가능성이 더 많다. 일단 세포가 전형적으로 적어도 6가지가 되는 것으로 생각되는 "충분한" 돌연변이를 획득한다면, 이의 성장 또는 촉발자 세포사멸사를 저지하는 내인성 또는 외인성 신호에 더 이상 반응하지 않는다.

[0008]

종양은 숙주 세포로부터 생기기 때문에, 신체의 면역계는 해당 세포에 대해 초기에 내성이 있다. 종양 형성성 돌연변이의 획득은 면역원성이 되기에 충분히 비자기(non-self)인 에피토프를 함유하는 돌연변이된 단백질의 생성을 야기할 수도 있고 또는 야기하지 않을 수도 있다. 세포가 면역원성 돌연변이를 획득한다면, 이는 숙주 면역계, 면역학적 감시로서 알려진 과정에 의해 탐색되고 파괴될 수 있다(Smyth *et al.*, *Adv Immunol* 2006, 90:1-50). 너 연구는 면역 감시 가설에 대한 근거를 제공하였고(Dunn *et al.*, *Nat Immunol* 2002, 3:991-998;

Shankaran *et al.*, *Nature* 2001, 410:1107-1111; 및 Dunn *et al.*, *Annu Rev Immunol* 2004, 22:329-360), 또한 소위 적응성 면역 반응에 추가로 선천성 면역 반응은 면역원성 종양의 거부를 용이하게 할 수 있다는 것이 시사되었다(Unni *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:1686-1691; Taieb *et al.*, *Nat Med* 2006, 12:214-219; 및 Raulet and Guerra, *Nat Rev Immunol* 2009, 9:568-580). 선천성 반응은 NK 활성화 신호의 유도된 발현, 예컨대 NKG2D 리간드 발현 또는 돌연변이유발 또는 바이러스 과정의 결과로서 초래된 다음의 DNA 손상을 통해 유발될 수 있다. 면역원성 돌연변이를 획득한 일부 세포는 또한 반자기(anti-self) 면역 반응을 약화시키는 정상 면역 조절 시스템에 관여하는 능력을 얻는다(Rabinovich *et al.*, *Annu Rev Immunol* 2007, 25:267-296). 숙주 조절 메커니즘의 활성화를 유발하는 경로는 불명하게 이해되고 있다. 또 다른 세포는 숙주 면역계의 활성화를 야기하는 면역원성 펩타이드를 항상 생성하지 않고 다수의 종양형성 돌연변이를 획득할 수 있다. 따라서, 종양 세포 형질전환 동안 면역원성 펩타이드를 생성하는 종양 세포는 생존을 위해 항-종양 면역 반응을 연속적으로 회피하여야 하는 반면, 면역계를 활성화시키지 않고 형질전환된 종양은 생존 동안 이러한 면역 조절 메커니즘에 의존하지 않을 수도 있다.

발명의 내용

- [0009] 하나 이상의 면역 관문 저해제(checkpoint inhibitor), 하나 이상의 백신, 및 하나 이상의 T 세포 공동자극 분자의 조합 또는 부분조합을 포함하는 병용요법은 면역요법이 유리할 수 있는 암 환자의 기반을 확장시키는 것이 가능하다. 백신은 종양-항원 특이적 CD8+ T 세포의 빈도와 또한 해당 CD8+ T 세포에 의해 인식되는 종양 항원의 수를 둘 다 증가시킴으로써 이 반응에 기여할 수 있다. T 세포 공동자극 분자는 추가로 빈도를 증가시키고/시키거나 종양-항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킴으로써, 또한 CD8+ T 세포에 의한 종양-사멸 효과기 분자의 발현을 증가시킴으로써 반응을 향상시킬 수 있다. 면역 관문 저해제와 병용하여 사용할 때, 종양을 침윤시킬 수 있고, 일단 침윤이 생기면 다양한 면역 관문 경로에 의해 저해되지 않을 광범위한 고도로 활성화된 CD8+ T 세포를 생성할 수 있다. 그러나, 병용 요법의 성공에 대한 장애는 그들이 전통적으로 적어도 3가지 상이한 약물 제품(백신, T 세포 공동자극 및 면역 관문 저해제)의 투여가 필요하며, 이들 각각은 상당히 비용이 들고, 일부 경우에 독성을 가진다는 것이다.
- [0010] 이 보고는 백신접종, 예를 들어 gp96-Ig 백신접종, 및 특히 OX40, ICOS, 4-1BB, TNFRSF25, CD40, CD27 및/또는 GITR 중 하나 이상의 작용제를 이용하는 T 세포 공동자극의 조합이 상승적 항-종양 이점을 제공한다는 발견에 적어도 부분적으로 기반한다. 전임상 모델은 OX40, ICOS, 4-1BB 및 TNFRSF25를 표적화하는 작용제 항체와 조합한 gp96-Ig 백신의 독립적 조성물을 평가하였고, 메커니즘 및 항종양 상보성에 대한 가변적 효과를 입증하였다. 본 명세서에 기재된 물질 및 방법은, 특히, 그들이 독립적 접종에 대한 필요없이, 예를 들어, gp96-Ig 및 T 세포 공동자극에 의해 백신접종을 둘 다 자극할 수 있는 단일 조성물을 제공한다는 점에서 유리하다. 이들 물질 및 방법은 T 세포 공동자극을 제공하기 위해 융합 단백질, 예컨대 ICOSL-Ig, 4-1BBL-Ig, TL1A-Ig, OX40L-Ig, CD40L-Ig, CD70-Ig 또는 GITRL-Ig를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 공동자극 분자를 동시에 발현시키도록 유전자 변형된 단일 백신 단백질(예를 들어, gp96-Ig) 발현 벡터를 생성함으로써 이 목표를 달성한다. 벡터, 및 이들의 사용방법은 항원-특이적 CD8+ T 세포의 활성화를 향상시키기 위해 추가적인 항체 요법의 필요 없이 공동자극 유익을 제공할 수 있다. 따라서, 병용 면역요법은 백신/항체/융합 단백질 요법에 대한 필요를 제거하기 위해 벡터 제조작에 의해 달성될 수 있는데, 이는 요법의 비용과 전신 독성의 위험을 둘 다 감소시킬 수 있다.
- [0011] 일 양상에서, 이런 보고는 분비 가능한 백신 단백질(secretable vaccine protein)을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질(costimulatory fusion protein)을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 발현 벡터를 특징으로 하되, T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킨다. 일부 실시형태에서, 이런 보고는 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 발현 벡터를 특징으로 하되, T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킨다. 발현 벡터는 포유류 발현 벡터일 수 있다. 실시형태에서, 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질은 gp96 KDEL(서열번호 3) 서열이 없을 수 있다. gp96-Ig 융합 단백질 내 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함할 수 있다. T 세포 공동자극 융합 단백질은 특히 OX40L-Ig 또는 이의 OX40에 결합하는 부분, ICOSL-Ig 또는 이의 ICOS에 결합하는 부분, 4-1BBL-Ig 또는 이의 4-1BBR에 결합하는 부분, TL1A-Ig 또는 이의 TNFRSF25에 결합하는 부분, GITRL-Ig 또는 이의 GITR에 결합하는 부분, CD40-Ig 또는 이의 CD40에 결합하는 부분, 또는 CD70-Ig 또는 이의 CD27에 결합하는 부분일 수 있다. T 세포 공동자극 융합 단백질 내 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함할 수 있다. 발현 벡

터는 DNA 또는 RNA를 함유할 수 있다.

[0012] 다른 양상에서, 이 보고는 분비 가능한 백신 단백질, 예컨대 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 함유하는 조성물을 특징으로 하되, T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킨다. 벡터는 DNA-기반 포유류 발현 벡터일 수 있다. 실시형태에서, 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질은 gp96 KDEL(서열번호 3) 서열이 없을 수 있다. gp96-Ig 융합 단백질 내 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 함유할 수 있다. T 세포 공동자극 융합 단백질은 OX40L-Ig 또는 이의 OX40에 결합하는 부분, ICOSL-Ig 또는 이의 ICOS에 결합하는 부분, 4-1BBL-Ig 또는 이의 4-1BBR에 결합하는 부분, TL1A-Ig 또는 이의 TNFRSF25에 결합하는 부분, GITRL-Ig 또는 이의 GITR에 결합하는 부분, CD40L-Ig 또는 이의 CD40에 결합하는 부분, 또는 CD70-Ig 또는 이의 CD27에 결합하는 부분일 수 있다. T 세포 공동자극 융합 단백질 내 Ig 태그는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE의 Fc 영역을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 바이러스 또는 바이러스-유사 입자 내에 혼입될 수 있거나, 또는 인간 종양 세포(예를 들어, 확립된 세포주로부터의 인간 종양 세포, 예를 들어, NSCLC, 방광암, 흑색종, 난소암, 신세포 암종, 전립선 암종, 육종, 유방 암종, 편평세포 암종, 두경부 암종, 간세포 암종, 췌장 암종 또는 결장 암종 세포주) 내로 혼입될 수 있다.

[0013] 다른 양상에서, 이 보고는 분비 가능한 백신 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 함유하는 조성물을 포함하는 세포를 특징으로 하되, T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킨다. 일부 실시형태에서, 이 보고는 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 함유하는 조성물을 포함하는 세포를 특징으로 하되, T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킨다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 선반 재고 요법으로서 사용하는 데 적합할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 방사선 치료된다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 살아있고, 약독된다. 다양한 실시형태에서, 이들 세포는 본 조성물의 백신 단백질(예를 들어, gp96)에 의해 샤프론화(chaperoned)될 수 있는 종양 항원을 발현시킨다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 확립된 세포주, 예를 들어, 확립된 NSCLC, 방광암, 흑색종, 난소암, 신세포 암종, 전립선 암종, 육종, 유방 암종, 편평세포 암종, 두경부 암종, 간세포 암종, 췌장 암종 또는 결장 암종 세포주로부터의 인간 종양 세포로부터 유래될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 확립된 전립선 암 세포주로부터 유래될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 확립된 폐암 세포주로부터 유래될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 확립된 방광암 세포주로부터 유래될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 확립된 육종 세포주로부터 유래될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 세포는 확립된 용모암종 암 세포주로부터 유래될 수 있다.

[0014] 다른 양상에서, 이 보고는 대상체를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은, 예를 들어, 분비 가능한 백신 단백질, 예컨대 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 함유하는 본 명세서에 기재된 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있되, T 세포 공동자극 융합 단백질은 대상체에게 투여될 때 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킨다. 벡터는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자 내로 혼입될 수 있거나, 또는 인간 종양 세포 내로 혼입될 수 있다. 대상체는 인간 암 환자일 수 있다. 인간 환자에 대한 조성물의 투여는 환자에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 환자에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식은 투여 전에 환자에서의 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식 수준에 비해 적어도 25%(예를 들어, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 또는 적어도 75%)만큼 증가될 수 있다. 상기 방법은 종양 세포에 의해 생성되는 면역억제 분자를 저해하는 제제와 병용하여 인간 암 환자에게 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 제제는 PD-1에 대한 항체일 수 있다. 대상체는 급성 또는 만성 감염(예를 들어, C형 간염바이러스, B형 간염바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 또는 말라리아에 의한 감염)이 있는 인간일 수 있다. 인간 환자에 대한 조성물의 투여는 병원성 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식을 자극시킬 수 있다. T 세포 공동자극 분자는 gp96-Ig 백신접종 단독보다 더 큰 수준으로 대상체에서 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시킬 수 있다.

[0015] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 동일한 방법 및 물질이 본 발명을 실행하기 위해 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 이하에 기재된다. 본

명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그들의 전문이 참고로 포함된다. 상충되는 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서로 조절할 것이다. 추가로, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0016] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 상세한 설명은 수반하는 도면 및 이하의 설명에 제시한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구범위로부터 분명하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 제1 카세트 내 gp96-Ig 융합 단백질 및 제2 카세트 내 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 세포 기반 조합 생성물을 생성하기 위한 본래의 gp96-Ig 벡터의 재조작의 개략적 표현을 도시한 도면. ICOS-Fc, 4-1BBL-Fc 및 OX40L-Fc를 도시를 위해 나타낸다.

도 2는 하나의 발현 카세트 내 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질 및 제2 카세트 내 T 세포 공동자극 융합 단백질(비제한적 예시의 방법에 의해, ICOSL-IgG4 Fc)을 암호화하는 포유류 발현 벡터(B45)의 개략적 표현을 도시한 도면.

도 3은 2개의 분비 가능한 단백질을 암호화하는 벡터에 의해 형질감염된 동종이계 종양 세포를 도시한 도면. 제1 단백질인 gp96-Ig는 세포 밖의 세포-유래 항원을 샤프론화하는 분비 가능한 이량체(매끄러움)를 형성한다. 제2 단백질은 백신 세포에 의해 분비된 삼량체 분비 가능한 T 세포 공동자극 융합 단백질(거침)이고, T 세포의 표면 상에서 근처의 공동자극 수용체에 자유롭게 결합할 수 있다.

도 4A 내지 도 4g는 gp96-Ig 세포 백신과 조합한 OX40 작용제 항체가 항원 특이적 CD8 증식을 촉진시키는 반면, FOXP3+ Treg는 영향받지 않고 남아있다는 것을 나타낸다. 도 4A 내지 도 4D는 gp96-Ig 세포 백신 작용 메커니즘을 도시한 도면. 도 4A에서, 백신 세포는 세포-유래 항원과 함께 gp96-Ig를 분비하거나, 또는 도 5, 도 6 및 도 8의 경우에, 본 백신 세포주에서 안정하게 발현되는 단일 항원 닭 오브알부민을 분비한다. 도 4B에서, gp96-Ig/항원 복합체는 APC에 의해 취해지고, 항원은 MHC 클래스 I 분자에 전달된다. 도 4C에서, 항원 교차 제시는 CD8+ 특이적 T 세포 활성화를 야기한다. 도 4D에서, 종양과 관련하여, 활성화된 CD8+ T 세포는 별개의 종양 상의 공유된 종양 항원을 인식하고, 그들을 파괴할 수 있다. 도 4E는 ImPACT(본 명세서에 사용된 바와 같이, 이는 변형된(예를 들어, KDEL 결실) gp96-Ig 융합 단백질 또는 일부 경우에, gp96-Ig 융합 단백질을 발현시키도록 설계된 공학 처리된 세포주를 지칭함) 단독으로 또는 ICOS, 4-1BB 또는 OX40에 대한 작용제 T 세포 공동자극 항체와 병용하여 백신접종 후 항원 특이적(OT-1) 세포 확장을 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 데이터를 초기 백신접종 후 제5일 및 제40일 동안 나타낸다(각각 프라이밍 및 기억). 후자는 또한 제2, 부스트 백신접종 후 5일에 대응한다. ImPACT/OX40(ab) 조합물만이 그 자체에 대한 ImPACT보다 유의하게 더 큰 OT-1 확장을 생성하였다(*, p<.05). 실험 복제물을 열거한다. 플롯팅한 값은 평균이며, 오차는 SEM이다. 도 4E에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌에서 우로의 순서는 다음과 같다: 백신 없음, ImPACT 단독, ImPACT + ICOS 항체, ImPact + OX40 항체, 및 ImPact + 4-1BB 항체. 도 4F는 총 CD4+ 세포의 백분율로서 FOXP3+ Treg를 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 증가로부터 감소 FOXP3+ 세포로 변동되는 ImPACT/4-1BB 처리 마우스를 제외하고, ImPACT 처리 후에 Treg의 상당한 변화가 없었는데, 이는 CD8+ 확장에 대한 그의 특이성을 강조한다. 실험 복제물을 열거한다. 플롯팅한 값은 평균이며, 오차는 SEM이다. 도 4F에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: 백신 없음, ImPACT 단독, ImPact + ICOS 항체, ImPact + OX40 항체, 및 ImPact + 4-1BB 항체. 도 4g는 애주번트 명반에 반응하여 제2 모델 시스템에서 OT-1/CD8 및 FOXP3+ 세포 확장을 플롯팅하는 그래프 쌍이다. 또한, ImPACT와 OX40(ab)의 조합물은 FOXP3+ 세포에서 보통의 증가에 추가로 유의한 OT-1 증식을 초래하였다. 실험 복제물을 열거한다. 플롯팅한 값은 평균이며, 오차는 SEM이다. 도 4g에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌에서 우로의 순서는 다음과 같다: 백신 없음, IgG 대조군, 및 ImPact + OX40 항체.

도 5a 내지 도 5d는 T 세포를 활성화하기 위해 그리고 항원 특이적 CD8+ 확장을 생성하기 위해 T 세포 공동 자극제 OX40이 ImPACT(gp96-Ig) 세포의 백신과 상승적으로 작용한다는 것을 도시한 도면. 도 5a는 T 세포와 T 세포 활성화를 촉진시키는 항원 제시 세포(APC) 사이의 수용체(OX40, ICOS 및 4-1BB)와 리간드(OX40L, ICOSL 및 4-1BBL) 상호작용의 개략적 도시이다. 도 5b는 백신의 투여 후 항원 특이적 T 세포 확장(OT-I 세포)을 추적하기 위해 단일 항원 닭 오브알부민과 함께 gp96-Ig/HLA-A1(ImPACT)을 발현시키는 세포의 클론 집단의 선택을 통해 확립된 백신 세포주를 도시한 다이어그램이다. 도 5c는 T 세포 확장을 촉진시킴에 있어서 상승작용을 위해 ImPACT와 병용하여 시험되는 듀린 T 세포 공동자극제 작용제 항체 - 다양한 실시형태에서 병용 요법 제제로서 유용한 모든 이들 항체의 목록을 도시한다. 도 5d는 ImPACT 단독 또는 제0일에 OX40, ICOS 또는 4-1BB에 대한 작용제 T 세포 공동자극 항체 100μg과 병용한 ImPACT 중 하나에 의한 백신접종 후 43일 동안 유세포분석에 의해

검출한 바와 같이 -제1일에 꼬리 정맥 주사를 통해 GFP로 표지한 항원 특이적 OT-1(CD8) 세포를 과종한 FOXP3-RFP 리porter 마우스의 OT-1 수준을 플롯팅하는 그래프이다. 비백신접종(백신 없음) 마우스를 대조군과 동시에 평가하였다. 마우스를 제35일에 다시 백신 또는 백신/항체 조합물로 부스트하였다. 백신접종일을 주사기로 표시한다. 초기(프라이밍) 반응은 제5일에 최대로 되었고, 백신/OX40(ab) 처리 마우스만이 부스트 후 보통의 기억 반응을 나타내었다(화살표). 플롯팅한 값은 모든 CD8+ 세포로부터의 OT-1 세포의 평균 백분율을 나타내고, 오차는 SEM이다. 또한 실험 복제물의 수 및 샘플 그룹 사이의 통계학적 유의도에 대해 도 4A 내지 도 4G를 참조한다.

도 6a 내지 도 6c는 새로운 백신 벡터("ComPACT")내로 ImPACT와 T 세포 공동자극제 OX40L의 조합은 OX40 작용제 항체의 공동투여에 비해 놀랍게 우수한 항원 특이적 CD8+ T 세포 확장을 생성하였다는 것을 도시한 도면. 도 6a는 (a) OX40 작용제 항체와 병용하여 본래의 백신 ImPACT(Gp96-Ig)를 이용하는 항원 특이적 T 세포 확장을 (b) 새로운 백신 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc)와 비교하는 실험 설계를 도시한다. 도 6b는 대조군 백신, 오브알부민을 발현시키는 백신, 오브알부민 및 gp96-Ig를 발현시키는 백신(ImPACT), OX40 작용제 항체와 조합한 ImPACT, 또는 ComPACT에 의한 1차 면역화 후에 항원-특이적 CD8+ T 세포 증식의 피크를 도시한다. 도 6b에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 백신 없음, Ova 단독 대조군, ImPACT, ImPACT + OX40 항체 및 ComPACT. 도 6c는 -제1일에 OT-1 (CD8) 세포로 과종한 FOXP3-RFP 마우스를 이용하여 OT-1 확장 시간 과정(도 5d와 유사)을 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 제0일에 처음 백신접종 및 제35일에 부스트(주사기에 의해 표시)에 의해 OT-1/GFP 세포를 46일에 걸쳐 백신 없음, Ova 단독 대조군 세포, ImPACT, ImPACT + 100 μ g OX40(ab), 및 ComPACT로 처리한 마우스에서 유세포 분석에 의해 분석하였다. 프라이밍 반응과 기억 반응 둘 다(화살표) ImPACT + OX40(ab)과 비교할 때조차 ComPACT로 처리한 마우스에서 가장 컸다. ComPACT 마우스는 또한 놀랍게도 시간 과정(대략 제7일 내지 제20일) 전체적으로 상승된 OT-1 수준을 유지하였다. 플롯팅한 값은 평균을 나타내며, 오차는 SEM이다. 또한 실험 복제물의 수 및 샘플 그룹 사이의 통계학적 유의도에 대해 도 7A 내지 도 7F를 참조한다.

도 7A 내지 도 7F는 ComPACT에서 gp96-Ig 및 OX40L, ICOSL 또는 4-1BBL 발현의 조합물은 고수준의 CD8, 항원 특이적 T 세포 반응을 초래한다는 것을 도시한 도면. 도 7A 내지 도 7d는 도 6c에서 사용되는 바와 같은 ComPACT의 3T3-버전의 특성규명을 도시한 도면. 3T3 세포를 플라스미드 발현 담 오브알부민(Ova)으로 형질감염시키고 나서, 단일 고-발현 클론을 확립하였고, 백신 벡터(gp96-Ig 단독, gp96-Ig/OX40L-Fc, gp96-Ig/ICOSL 또는 gp96-Ig/4-1BBL 중 하나)로 재형질감염시키기 위해 사용하였다. 따라서 백신을 동일한 Ova 모 클론에서 확립하였다. 비백신접종 마우스(백신없음)를 Ova 단독 발현 세포(추가적인 대조군으로서), ImPACT(Ova-gp96-Ig), ImPACT + OX40 작용제 항체(OX40(ab)), ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL), ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc) 또는 ComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL)로 처리한 마우스와 비교하였다. 도 7A는 분비가 Ova 단독 대조군, ImPACT와 다양한 ComPACT 세포 사이에서 본질적으로 동일하였다는 것을 나타내는 ELISA에 의해 확인되는 바와 같은 Ova 분비를 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 값은 6가지 복제물의 최소값으로부터의 평균이며, 오차는 SEM이다. 도 7A에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: Ova 단독 대조군, ImPACT(3T3-ova-gp96-Ig), ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL), ComPACT (Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc) 및 ComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL). 도 7B는 상당한 수준으로 분비된 개개의 ImPACT 및 ComPACT 클론이 확립되었다는 것을 나타내는 ELISA에 의해 결정된 바와 같은 gp96-Ig 분비(IgG로서 검출)를 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 값은 6가지 복제물의 최소값으로부터의 평균이며, 오차는 SEM이다. 도 7B에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: Ova 단독 대조군, ImPACT(3T3-ova-gp96-Ig), ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL), ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc) 및 ComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL). 도 7C는 ComPACT 세포에서의 발현만을 나타내는 qRT-PCR에 의해 확인되는 바와 같은 ICOSL, OX40L 또는 4-1BBL의 mRNA 발현을 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 그래프 값은 3가지 별개의 복제물의 최소값으로부터의 평균이고, 오차는 SEM이다. 도 7C에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: Ova 단독 대조군, ImPACT(3T3-ova-gp96-Ig), ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL), ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc) 및 ComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL). 도 7d는 ComPACT 세포에서 OX40L, ICOSL 및 4-1BBL 발현의 확인을 나타내는 웨스턴 블롯을 제공하는 도면. 단백질 수송 및 분비를 예방하기 위해 16시간 동안 ImPACT 및 ComPACT 세포를 브레펠딘 A(Brefeldin A)(BFA)로 처리하였다. 이어서 세포를 채취하고 나서, 용해시키고, SDS PAGE/웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. OX40L(또한 CD252로서 알려짐), ICOSL 또는 4-1BBL, 및 히스톤 H3 또는 장입 대조군으로서 액틴 B(ACTB)에 대한 항체를 이용하여 블롯을 프로빙하였다. OX40L, ICOSL 및 4-1BBL을 ComPACT 세포에서만 검출하였다. 도 7E는 표시한 1차 면역화 후 제5일에 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포 빈도를 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 도 7E에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 백신 없음, Ova 단독 대조군, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT(이 도면에서, Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc). 도 7F는 좌측에 나타

낸 제42일(부스트 면역화 후 7일)에 말초 혈액 내 항원-특이적 CD8⁺ T 세포(OT-I)의 빈도를 플롯팅하는 그래프 및 말초 혈액 중에서 동일한 날에 CD4⁺FOXP3⁺ T 조절 세포의 피크의 쌍을 도시한 도면. 도 6c에서와 같이, Ova 단독 발현 세포주, ImPACT, OX40(ab) 및 ComPACT와 조합한 ImPACT(이 경우에, Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc)에 의한 백신 접종 후 항원 특이적 (OT-1) 세포 확장을 초기 백신접종 후 5일 및 40일에 나타낸다(각각 프라이밍 및 기억). 후자는 또한 제2, 부스트 백신접종 후 5일에 대응한다. ImPACT, ImPACT + OX40(ab) 및 ComPACT 처리 마우스에서의 OT-1 수준은 Ova 단독 대조군 처리 마우스에 비해 유의하게 상승된다. ComPACT 처리 마우스는 OT-1 세포의 가장 큰 증식을 나타내는데, 이는 프라이밍과 기억 반응 지점 둘 다에서 ImPACT + OX40(ab)보다 유의하게 더 높다. 실험 복제물을 열거하고, 오차는 SEM이다. 도 7f에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 백신 없음, Ova 단독 대조군, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT(이 도면에서, Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc).

도 8a 내지 도 8e는 ComPACT가 항원 특이적 CD8⁺ 확장을 유발한 반면, OX40 항체는 비특이적 T 세포 활성화를 야기하였다는 것을 도시한 도면. 도 8a는 ImPACT, ImPACT + OX40(ab) 또는 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc)에 의해 비처리 또는 백신접종한 마우스에서 단핵(MNC), CD4, CD8, OT-I 및 OT-II 세포의 총 수를 플롯팅하는 일련의 그래프. 도 5d 및 도 6c에 대해서와 같이, FOXP3-RFP 리porter 마우스에 -제1일에 꼬리 정맥 주사를 통해 OT-1로 과종하고 나서, 제0일에 백신접종하고, 복막 세척으로부터 얻은 세포의 유세포 분석을 포함하는 분석을 위해 제8일에 희생시켰다. ComPACT 처리는 강한 OT-I(CD8) 특이적 반응을 생성한 반면, OX40(ab) 처리는 FOXP3⁺ CD4 세포를 포함하는 모든 T 세포 하위 유형에서 증가를 초래하였다. 플롯팅한 값은 3마리 마우스의 최소값으로부터의 평균을 나타내고, 오차는 SEM이다. 도 8a에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc). 도 8b는 1차 면역화 후 8일에 각각 기억 전구체 세포, 단명 효과기 세포 및 기억 세포에 대응하는 CD127⁺KLRG1⁻, CD127⁻KLRG1⁺ 및 CD127⁺KLRG1⁺ 세포의 수를 플롯팅하는 일련의 그래프를 도시한 도면. 세포는 비장(상부 패널) 및 복막강(하부 패널)으로부터 유래되었다. 도 8b에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, Ova 단독, ImPACT, ComPACT (Ova-gp96-Ig/ICOSL), ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc) 및 ComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL). 도 8c는 INF γ , TNF α , IL2, IL6 및 IL5의 수준을 플롯팅하는 일련의 그래프를 도시한 도면. 제8일에 상기 도 8a에서 제시한 동일한 마우스로부터 전혈 혈청을 채취하고 나서, 바이오레전드사(BioLegend)로부터의 레전드플렉스(LEGENDPLEX)(상표명) 키트 및 유세포분석기를 이용하여 사이토카인 분석을 실시하였다. 도 8a의 데이터와 일치되게, OX40(ab) 처리는 INF γ , TNF α 및 IL2뿐만 아니라 IL6 및 IL5의 상승된 수준으로 비특이적, 전신 면역 반응을 생성하였다. 플롯팅한 값은 3마리 마우스의 최소값으로부터의 평균을 나타내고, 오차는 SEM이다. 도 8c에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc). 도 8d는 INF γ , TNF α , 및 그랜자임(Granzyme)-B (GZMB)에 대해 유전자 발현 수준을 플롯팅하는 일련의 그래프를 도시한 도면. qRT-PCR에 의한 T 세포 활성화 유전자의 분석은 내인성(OT-I-) 세포와 항원 특이적 CD8 (OT-I+) 세포를 둘 다 비특이적으로 활성화시킨 OX40(ab)에 비해 항원 특이적 CD8(OT-I+) 세포를 단지 활성화시킴에 있어서 ComPACT의 특이성을 입증하였다. 상기 도 8a에서 복막 세척액으로부터의 세포를 OT-1- 및 OT-1+ CD8 세포 집단으로 분류하였다. 총 RNA를 채취하고 나서, 역전사시키고, qPCR에 의해 분석하였다. IFN γ , TNF α , 및 GZMB의 유전자 발현 수준을 나타내고 나서, 1에서 첫 번째 ImPACT만으로 처리한 복제물 세트에 18S mRNA에 대해 정규화시켰다. 플롯팅한 값은 3마리 마우스의 최소값으로부터의 평균을 나타내고, 오차는 SEM이다. 도 8d에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc). 도 8e는 마우스에서 비장세포 및 종양 배수 림프절(tumor draining lymph node: TDLN) 내 FOXP3 조절 T 세포(Treg)의 수를 도시한 도면. 도 8e에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc).

도 9A 내지 도 9c는 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc) 처리가 항원 특이적 CD8 T 세포 활성화를 초래하는 반면, OX40(ab) 처리의 공동투여가 비장과 림프절 둘 다에서 FOXP3 Treg의 증가를 포함하는 비특이적 면역 세포 활성화를 유발한다는 것을 나타낸다. 도 9A는 비처리하거나 또는 ImPACT, ImPACT + OX40(ab) 또는 ComPACT로 백신접종한 마우스에 대해 MNC, CD4, CD8, OT-I 및 OT-II 세포의 총 수를 플롯팅하는 일련의 그래프를 도시한 도면. 도 5d 및 도 6c에 대해서와 같이, FIR 리porter 마우스에 -제1일에 꼬리 정맥 주사를 통해 OT-1로 과종하고 나서, 제0일에 백신접종하고, 비장으로부터 얻은 세포의 유세포 분석을 포함하는 분석을 위해 제8일에 희생시켰다. OX40(ab) 처리 마우스는 CD4⁺FOXP3⁺ 세포를 포함하는 모든 T 세포 하위 유형에서의 증가를 입증하였다. ComPACT 처리 마우스는 OX40(ab) 반응보다 유의하게 더 높은 강한 OT-1(CD8) 특이적 반응을 생성하였

다. 플롯팅한 값은 3마리 마우스의 최소값으로부터의 평균을 나타내고, 오차는 SEM이다. 도 9A에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT. 도 9B는 말초 림프절에서를 제외하고 도 9A에서와 같이 비처리하거나 또는 ImPACT, ImPACT + OX40(ab) 또는 ComPACT로 백신접종한 마우스에 대해 MNC, CD4, CD8, OT-I 및 OT-II 세포의 총 수를 플롯팅하는 일련의 그래프를 도시한 도면. 도 9B에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT. 도 9c는 T 세포 활성화 유전자(ACTB, IL2, 및 페르포린(Perforin) 1(PRF1))에 대한 mRNA 발현을 플롯팅하는 일련의 그래프를 도시한 도면. qRT-PCR은 OX40(ab)로 처리한 마우스에서의 내인성 세포와 항원 특이적 OT-1 CD8 세포 둘 다의 비특이적 활성화에 비해 ComPACT로 처리한 마우스에서 항원 특이적 OT-1(CD8) 활성화를 나타내었다. 상기 도 8a에서 복막 세척액으로부터의 세포를 OT-1⁺ 및 OT-1⁻ CD8 세포 집단으로 분류하였다. 총 RNA를 채취하고 나서, 역전사시키고, qPCR에 의해 분석하였다. ACTB 수준은 세포 집단과 처리 사이에 일치되었고, 대조군으로서 작용한다. IL2 수준은 ImPACT, ImPACT + OX40(ab) 및 ComPACT로 처리한 마우스의 OT-1⁺ 세포에서 유의하게 상승되었는데, 이는 모든 백신/조합물에 의한 상당한 T 세포 활성화를 나타낸다. 도 8c와 일치되게, PRF1의 수준은 OX40(ab)로 처리한 마우스의 OT-1⁻와 OT-1⁺ CD8 분획 둘 다에서 비특이적으로 상승된 반면, ComPACT 처리 마우스의 OT-1⁺ 세포에서만 증가되었다. 플롯팅한 값은 3마리 마우스의 최소값으로부터의 평균을 나타내고, 오차는 SEM이다. 도 9c에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT.

도 10a 내지 도 10c는 종양 보유 마우스에서, ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc) 처리가 최대 수의 종양 침윤 림프구 및 종양 억제제를 초래하였다. 도 10a는 실험 구성의 개략도를 도시한 도면. BALB/C 마우스에 피하로 2×10^5 개의 CT26 세포를 접종하여, 제0일을 나타낸다. 제6일 및 제11일에, 마우스를 백신접종하거나 또는 ImPACT, ImPACT + OX86(ab), ComPACT 또는 OX86(ab) 단독으로 백신접종하였다. 백신 처리는 1×10^6 개 세포 및 100 μ g의 항체로 이루어졌다. 도 10b는 제0일에 종양 접종 후 표시일에 종양 면적을 플롯팅하고, 샘플 그룹당 5마리 실험 마우스의 최소값으로부터의 평균으로서 플롯팅한 그래프를 도시한 도면(오차는 SEM으로서). 도 10c는 연구 제21일에 종양 면적을 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 도 10c에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 백신 없음, CT26 단독 대조군, OX40 항체 단독, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT.

도 11A 내지 도 11E는 CT26 결장직장 암종 모델에서 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc) 처리가 CD8⁺ 특이적 종양 침윤을 초래하고, 종양 성장을 방해하며, 전반적인 생존 및 상당한 종양 거부를 증가시켰다는 것을 나타내는 도면. 도 11A에서, 마우스에 뒤쪽 옆구리에서 피하로 5×10^5 개의 CT26 종양 세포를 주사하여 제0일에 접종하였다. 마우스를 비처리하거나 또는 CT26 모 세포, OX40(ab) 단독, ImPACT 단독, ImPACT + OX40(ab) 또는 ComPACT로 제4일, 제7일 및 제10일에 처리하였다. 마우스의 코호트를 종양 유전자 분석을 위해 제12일에 희생시켰다. 남아있는 마우스를 30일 동안 모니터링하여 종양 면적 및 전체 생존을 측정하였다. 도 11B는 제12일 종양 유전자 발현의 분석을 도시한다. 총 RNA를 분리한 종양으로부터 단리시키고 나서, 역전사시키고, qPCR에 의해 분석하였다. 값을 18S mRNA에 대해 정규화시키고 나서, 제1 '비처리' 단독 복제물을 1에서 설정하였다. 도 11B에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 히스토그램 순서는 다음과 같다: 비처리, CT26 단독 대조군, OX40 항체 단독, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT. 도 11C에서, AH1-4량체/항원 특이적 CD8⁺ 세포를 처리 마우스에서 분석하였다. 도 11C에서 설정한 각각의 데이터에 대해, 좌측에서 우측으로의 피크 순서는 다음과 같다: 비처리, CT26 단독 대조군, OX40 항체 단독, ImPACT, ImPACT + OX40 항체, 및 ComPACT. 도 11D는 초기 종양 접종 후 21일 동안 매일 측정된 바와 같은 종양 면적을 나타낸다. 도 11E에서, 30일 시간 과정에 걸쳐 전체 생존을 결정하였다. 80%의 ComPACT 처리 마우스는 실험 기준에 따라 생존하였고, 47%의 마우스(15마리 중 7마리)는 확립된 종양을 완전히 거부하였다. 하나의 OX40(ab)만으로 처리한 마우스는 제24일까지 종양을 거부하였고, 하나의 ImPACT + OX40(ab) 처리 마우스는 제25일까지 거부하였다.

도 12A 내지 도 12D는 공격적 B16.F10-ova 흑색종 모델에서 ComPACT(이 도면에서, Gp96-Ig/OX40L-Fc)가 항원-특이적 CD8⁺ 확장을 생성하고, 종양 성장을 지연시키며, 전체적인 생존 및 종양 거부를 증가시킨다는 것을 도시한 도면. 도 12A에서, 마우스는 -제1일에 5×10^5 개 OT-I 세포로 입양전달되었고, 이어서, 뒤쪽 옆구리에서 피하로 주사한 5×10^5 개 B16.F10-ova 종양 세포로 제0일에 접종하였다. 마우스를 비처리하거나 또는 B16.F10-ova 모 세포, OX40(ab) 단독, ImPACT 단독, ImPACT + OX40(ab) 또는 ComPACT로 제4일, 제7일 및 제10일에 처리하였다.

도 12B는 25일의 시간 과정에 걸쳐 처리 후 항원-특이적 CD8⁺ (OT-I) 확장을 나타낸다. 도 12C에서, 초기 종양 접종 후 25일 시간 과정 전체적으로 종양 면적을 측정하였다. 도 12D에서, 30일 시간 과정에 걸쳐 전체 생존을 결정하였다. 대략 78%의 ComPACT 처리 마우스가 생존하였고, 11%의 ComPACT 처리 마우스는 확립된 종양을 완전히 거부하였다. ComPACT 처리군만이 완전한 종양 거부자였다: 9마리 마우스 중 1마리 또는 대략 11%.

도 13는 -제1일에 OT-1(CD8) 세포로 과중한 FOXP3-RFP 마우스를 이용하여 OT-1 확장 시간 과정(도 5d 및 도 6c와 유사)을 플롯팅하는 그래프를 도시한 도면. 제0일에 처음 백신접종 및 제35일에 부스트에 의해 OT-1/GFP 세포를 46일에 걸쳐 백신 없음, Ova 단독 대조군 세포, ComPACT(gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A) 또는 ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)로 처리한 마우스에서 유세포 분석에 의해 분석하였다. 플롯팅한 값은 평균을 나타내며, 오차는 SEM이다. ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)는 ComPACT-OX40L 및 ComPACT-TL1A(즉, 동일한 주사기에서 2가지 상이한 세포주)를 포함하는 조합 주사를 나타낸다.

도 14는 오브알부민 특이적 CD8⁺ T 세포(OTI)의 증식 및 활성화에 대한 ComPACT의 효과를 나타내는 그래프를 도시한 도면. C57BL/6 마우스는 제0일에 ImPACT 단독 또는 ComPACT(gp96-Ig/OX40L), ComPACT(gp96-Ig/4-1BBL), 또는 ComPACT(gp96-Ig/4-1BBL)로 면역화하였다. OT-I의 빈도를 표지를 표시일에 말초 혈액에서 모니터링하였다.

도 15는 CT26 결장직장 암종 모델에서 종양 성장 역학에 대한 ComPACT의 효과를 나타내는 그래프를 도시한 도면. 마우스에 뒤쪽 옆구리에서 피하로 5×10^5 개 CT26 종양 세포를 주사하여 제0일에 접종하였다. 마우스를 비처리하거나 또는 CT26 모 세포, ImPACT 단독, ImPACT + TNFRSF25 작용제(4C12 ab), 4C12(ab) 단독, PD-1(ab) 단독, 4C12(ab) 및 PD-1(ab), ComPACT(gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A), ComPACT(gp96-Ig/OX40L) + PD-1(ab), 또는 ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)로 제4일, 제7일 및 제10일에 백신접종하였다. 마우스를 30일 동안 모니터링하여 종양 면적을 측정하였다. ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)는 ComPACT-OX40L 및 ComPACT-TL1A(즉, 동일한 주사기에서 2가지 상이한 세포주)를 포함하는 조합 주사를 나타낸다.

도 16은 CT26 결장직장 암종 모델에서 전체 마우스 생존에 대한 ComPACT의 효과를 나타내는 그래프를 도시한 도면. 마우스를 CT26 종양 세포로 처리하였고, 도 15에 기재한 바와 같이 백신접종하였다.

도 17은 인간 전립선 특이적 백신(HS-1020, PC-3 세포주)에 의해 생성된 인간 OX40L의 양을 나타내는 그래프를 도시한 도면.

도 18은 인간 폐 특이적 백신(HS-120, AD100 세포주)에 의해 생성된 인간 OX40L의 양을 나타내는 그래프를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

다양한 분비 가능한 단백질, 즉, 본 명세서에 기재된 바와 같은 백신 단백질은 생체내 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 분비 가능한 열충격 단백질 gp96-Ig 기반 동종이계 세포 백신은 생체내 항원 교차-프라이밍을 통해 펩토이드 농도의 종양 항원에 대해 고빈도 다클론성 CD8⁺ T 세포 반응을 달성시킬 수 있다 (Oizumi *et al.*, *J Immunol* 2007, 179(4):2310-2317). 그러나, 확립된 종양에 의해 상술된 다중 면역억제 매커니즘은 이 백신 접근의 활성을 약화시킬 수 있다. 진행된 질환을 갖는 환자에 대한 병용 면역요법의 잠재적 효용을 평가하기 위해, 오래 확립된 B16-F10 흑색종의 마우스 모델에서 PD-1, PD-L1, CTLA-4 및 LAG-3 차단 항체의 체계적 비교를 수행하였는데(본 명세서의 실시예 참조), 이는 다른 면역 관문에 비해 gp96-Ig 백신접종과 PD-1 차단 사이에서의 더 우수한 조합을 입증한다. 상승적 항종양 이점은 OX40의 작용제(예를 들어, OX40 리간드-Ig(OX40L-Ig) 융합, 또는 OX40에 결합하는 이들의 단편), 유도성 T-세포 공동자극제(ICOS)의 작용제(예를 들어, ICOS 리간드-Ig(ICOSL-Ig) 융합, 또는 ICOS에 결합하는 이들의 단편), CD40의 작용제(예를 들어, CD40L-Ig 융합 단백질, 또는 이들의 단편), CD27의 작용제(예를 들어, CD70-Ig 융합 단백질 또는 이들의 단편), 4-1BB의 작용제(예를 들어, 4-1BB 리간드-Ig(4-1BBL-Ig) 융합, 또는 4-1BB에 결합하는 이들의 단편), TNFRSF25의 작용제(예를 들어, TL1A-Ig 융합, 또는 TNFRSF25에 결합하는 이들의 단편), 또는 글루코코르티코이드-유도 종양 괴사 인자 수용체(GITR)의 작용제(예를 들어, GITR 리간드-Ig(GITRL-Ig) 융합 또는 GITR에 결합하는 이들의 단편) 중 하나 이상을 이용하여 gp96-Ig 백신접종, PD-1 차단과 T 세포 공동자극의 삼중 조합으로부터 초래될 수 있다. 그러나, 이러한 삼중 조합의 개발을 위한 열정은 이러한 요법의 예상되는 비용에 의해 억제되게 된다. 이 문제를 회피하기 위해, 백신 단백질 발현 벡터(예를 들어, gp96-Ig 발현 벡터)를 T 세포 공동자극 단백질(예를 들어, ICOSL-Ig, 4-1BBL-Ig 또는 OX40L-Ig)을 동시에 발현시키도록 재조합하여, 추가적인 항체 요법에 대한 필

요없이 공동자극 이점을 제공한다. 제조작된 벡터는 그들의 사용을 위한 방법과 같이 본 명세서에 제공된다. gp96-Ig 및 이들 공동자극 융합 단백질이 동종이계 세포주에 의해 분비되었을 때, 항원-특이적 CD8+ T 세포의 향상된 활성화가 관찰되었다(본 명세서의 실시예 참조). 따라서, 병용 면역요법은 완전히 별개의 백신/항체/융합 단백질 요법에 대한 필요를 제거하기 위해 벡터 제조작에 의해 달성될 수 있다.

[0019] 백신 단백질

[0020] 백신 단백질은 본 발명에서의 용도를 발견한 면역 반응을 유도할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 발명은 분비 가능한 백신 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 다양한 실시형태에서, 이러한 조성물은 대상체에서 항원-특이적 T 세포의 활성화를 향상시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 자극하기 위해 대상체를 치료하는 방법에서 이용된다. 본 조성물은 암을 포함하는 다양한 질환의 치료에서의 용도를 발견한다.

[0021] 소포체(ER)에서 국소화된 열 충격 단백질(hsp) gp96은 MHC 클래스 I 및 II 분자로 가는 도중에 펩타이드에 대한 샤프론으로서 작용한다. 종양 세포로부터 얻고 백신으로서 사용한 Gp96은 추정하건데 항원-제시 세포(APC)에 대한 종양-특이적 펩타이드의 수송을 통해 특정 종양 면역을 유도할 수 있다(*J Immunol* 1999, 163(10):5178-5182). 예를 들어, gp96-관련 펩타이드는 수지상 세포(DC)에 의해 CD8 세포에 교차 제시된다.

[0022] 백신접종 시스템은 종양 세포 내로 gp96-Ig G1-Fc 융합 단백질을 형질감염시키는 것에 의해 항종양 요법에 대해 개발되었고, 샤프론화된 종양 펩타이드와 복합체로 gp96-Ig의 분비를 초래한다(문헌[*J Immunother* 2008, 31(4):394-401], 및 거기에 인용된 참고문헌 참조). gp96-Ig 분비 종양 세포의 비경구 투여는 선천적 면역계의 활성화와 조합된 강한, 항원-특이적 CD8 세포독성 T 림프구(CTL) 확장을 촉발한다. 종양 분비 gp96은 DC 및 gp96 분비의 부위에 대한 자연 살해(NK) 세포의 동원(recruitment)을 야기하고, DC 활성화를 매개한다. 추가로, gp96 및 이의 샤프론화된 펩타이드의 식균 작용 흡수는 주요 MHC 클래스 I을 통한 펩타이드 교차 제시뿐만 아니라 CD4 세포와 독립적인 강한 동족 CD8 활성화를 촉발한다.

[0023] 본 명세서에 제공된 벡터는 gp96-Ig 융합 단백질을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열을 함유한다. 인간 gp96의 암호 영역은 길이가 2,412개의 염기이고(서열번호 1), 아미노 말단에서 21개의 아미노산 신호 펩타이드, 소수성 잔기에서 풍부한 잠재적 막관통 영역, 및 카복실 말단에서 ER 체류 펩타이드 서열을 포함하는 803 아미노산 단백질(서열번호 2)을 암호화한다(젠뱅크(GENBANK)(등록상표) 수탁 번호 X15187; 문헌[Maki *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:5658-5562] 참조). 인간 gp96의 DNA 및 단백질 서열은 다음과 같다:

atgaggccctgtgggtgctggccctgctgctgctgaccttcgggtcggtcagagctga
cgtgaaagttgatgtggtacagtagaagaggtatcgggtaaaagtagaagagatcaagg
acggatgatgaagtagacagagaggaagagctatcagttggatggattaaatgcatcaca
aataagagaacttagagagaagtcggaaaagtttgcctccaagccgaagftaacagaatgatga
aacttatcatcaattcattgtataaaaaataagagattttcctgagagaactgattcaaatgcttctgat
gctttagataagataaggctaatactactgactgatgaaaatgctcttctggaaatgaggaactaac
agtcaaaattaagtgatagaaggagaagaacctgctgcatgtcacagacaccgggtgtaggaatga
ccagagagaagtggttaaaaaccttggtaccatagccaaatctgggacaagcgagttttaaca
aaatgactgaagcacaggaagatggccagtcactctgaattgattggccagtttggtgctggttt
ctattccgcttctgtagcagataagggtattgtcacttcaaacacacaacgataccagcaca
tctgggagtgctgactccaatgaattttctgaattgctgaccaagaggaacactctaggacgggg
aacgacaattacccttgcttaaaagaagaagcatctgattacctgaattggatacaattaaaaatct
cgtcaaaaaatattcacagttcataaactttctatttatgtatggagcagcaagactgaaactgttga
ggagcccatggaggagaagaagcagccaaagaagagaagaagaatctgatgatgaagctg
cagtagaggaagaagaagaagaaagaaacaaagactaaaaaagtgaaaaaactgtctggg
actgggaacttatgaatgatacaaccaatatggcagagaccatcaaaagaagtagaagaagat
gaatacaagctttctacaaatcatttcaaggaagtgatgaccccatggcttatctactttact
gctgaagggaagttaccttcaaatcaattttattgtaccacatctgctccacgtgctgtttgac
gaatagtgatctaaaaagcgtattacattaagctctatgtcgccgtgtattcatcacagacgactt
ccatgatgatgcctaataacctcaattttgtcaagggtgtggtggactcagatgatctccccttga
atgtttcccgagactcttcagcaacataaactgcttaagtgattaggaagaagcttgttcgtaaa
acgctggacatgatcaagaagattgctgatgataatacaatgatacttttggaaagaatttggtag
caacatcaagcttgggtgatgaagaccactgaatcgaacacgtcttgctaaaacttctaggttcc
agtcttctcatctcaactgacattactagcctagaccagtatgtggaaagaatgaaggaaaaaca
agacaaaatctacttcatggctgggtccagcaaaaagaggctgaatcttccatttgttgagcga
cttctgaaaaagggtatgaagttattacctcagagaacctgtggatgaatactgtattcaggccctt
cccgaatttgatgggaagaggttccagaatgttccaagggaaggatgaagttcgtatgaagtgatga
gaaaactaaggagagtcgtgaagcagttgagaagaatttgagccctctgctgaattggatgaaag
ataaagcccttaaggacaagattgaaaaaggctgtggtgtctcagcgctgacagaatctccgtgtg
cttgggtggccagccagtagcggatggtctggcaacatggagagaatcatgaaagcacaagcgta
ccaaacgggcaaggacatcttacaattactatgcgagtcagaagaaaacatttgaattaatcc
cagacacccgctgatcagagacatgcttcgacgaattaagggaagatgaagatgataaacagtttt
ggatcttgcgtggtttgtttgaaacagcaacgcttcggtcagggtatctttaccagacactaaagc

[0024]

atatggagatagaataaagaatgcttcgctcagtttgaacattgacctgatgcaaaagtgga
agaagagcccgaagaagaacctgaagagacagcagaagacacaagaagacacagagcaa
gacgaagatgaagaatggatgtgggaacagatgaagaagaagaacagcaaaggaatctaca
gctgaaaaagatgaattgtaa (서열번호 1)

MRALWVLGLCCVLLTFGSVRADDEVDVDGTVEEDLGKSREG
SRTDDEVVQREEEAIQLDGLNASQIRELREKSEKFAFQAEVNR
MMKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISLTDENALSG
NEELTVKIKCDKEKNLLHVTDTGVGMTREELVKNLGTIAKSG
TSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIVTS
KHNDTQHIWESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITLVLKEEAS
DYLELDTIKNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAA
KEEKEESDDEAAVEEEEEKKPKTKKVEKTVWDWELMNDIK
PIWQRPSKEVEEYKAFYKSFSKESDDPMAYIHFTAEGEVTF
KSILFVPTSAPRGLFDEYGSKSDYIKLYVRRVFITDDFHDMM
PKYLNFKVGVVDSDDLPLNVSRETLQQHKLLKVRKKLVRKT
LDMIKKIADDKYNDTFWKEFGTNIKLGVIEDHSNRTRLAKLL
RFQSSHHPTDITSLDQYVERMKEKQDKIYFMAGSSRKEAESSP
FVERLLKKGYEVIYLTEPVDEYCIQALPEFDGKRFQNVAKEG
VKFDESEKTESREAVEKEFEPLLNWMKDKALKDKIEKAVV
SQRLTESPCALVASQYGSNGMERIMKAQAYQTGKDISTNY
YASQKKTFEINPRHPLIRDMLRRIKEDEDDKTVLDLAVVLFET
ATLRSGYLLPDTKAYGDRIERMLRSLNIDPDAKVEEPEEPEEP
EETAEDTTEDTEQDEDEEMDVGTDDEEETAKESTAEEKDEL

(서열번호 2).

[0025]

[0026]

gp96-Ig 융합 서열을 암호화하는 핵산은 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제8,685,384호에 기재된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, gp96-Ig 융합 단백질의 gp96 부분은 야생형 gp96 서열(예를 들어, 서열번호 2에 제시된 인간 서열)의 모두 또는 일부를 함유할 수 있다. 예를 들어, 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질은, 그것이 C-말단의 KDEL(서열번호 3) 서열을 결여하도록 서열번호 2의 처음 799개의 아미노산을 포함할 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질의 gp96 부분은, 그것이 야생형 폴리펩타이드에 대해 적어도 90% (예를 들어, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 서열 동일성을 갖도록 야생형 gp96 서열의 처음 799개 아미노산에 비해 하나 이상의 치환, 결실 또는 첨가를 함유하는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0027]

본 명세서 전체적으로 사용되는 바와 같이, 특정 핵산 또는 아미노산 서열과 특정 서열 식별 번호에 의해 언급되는 서열 사이의 서열 동일성 백분율은 다음과 같이 결정된다. 첫째로, 핵산 또는 아미노산 서열은 BLASTN 버전 2.0.14 및 BLASTP 버전 2.0.14를 포함하는 BLASTZ의 독립형 버전으로부터의 BLAST 2 서열(BI2seq) 프로그램을 이용하여 특정 서열 식별 번호에서 제시된 서열과 비교된다. BLASTZ의 이런 독립형 버전은 fr.com/blast에서 또는 ncbi.nlm.nih.gov에서 온라인에서 얻을 수 있다. BI2seq 프로그램을 사용하는 방법을 설명하는 설명서는 BLASTZ에 첨부된 리드미 파일에서 찾을 수 있다. BI2seq는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘 중 하나를 이용하여 두 서열 간의 비교를 수행한다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하기 위해 사용되는 한편, BLASTP는 아미노산 서열을 비교하기 위해 사용된다. 두 핵산 서열을 비교하기 위해, 선택사항은 다음과 같은 설정이다: -i는 비교될 제1 핵산 서열을 포함하는 파일로 설정됨(예를 들어, C:\seq1.txt); -j는 비교될 제2 핵산 서열을 포함하는 파일로 설정됨(예를 들어, C:\seq2.txt); -p는 blastn으로 설정됨; -o는 임의의 목적으로 하는 파일명으로 설정됨(예를 들어, C:\output.txt); -q는 -l로 설정됨; -r은 2로 설정됨; 모든 다른 선택사항은 그들의 디폴트 상황에 남겨짐. 예를 들어, 다음의 명령은 두 서열 간의 비교를 포함하는 아웃풋 파일을 생성하는 데 사용할 수 있다: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -l -r 2. 두 아미노산 서열을 비교하기 위해, BI2seq의 선택사항은 다음과 같은 설정이다: -i는 비교될 제1 아미노산 서열을 포함하는 파일로 설정됨(예를 들어, C:\seq1.txt); -j는 비교될 제2 아미노산 서열을 포함하는 파일로 설정됨(예를 들어, C:\seq2.txt); -p는 blastp로 설정됨; -o는 임의의 목적으로 하는 파일명으로 설정됨(예를 들어, C:\output.txt); 모든 다른 선택사항은 그들의 디폴트 상황에 남겨짐. 예를 들어, 다음의 명령은 두 아미노산 서열

간의 비교를 포함하는 아웃풋 파일을 생성하는 데 사용할 수 있다: C:\Bl2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. 두 커맨드 서열이 상동성을 공유한다면, 지정된 아웃풋 파일은 정렬된 서열과 상동성의 해당 영역을 제시할 것이다. 두 비교 서열이 상동성을 공유하지 않는다면, 지정된 아웃풋 파일은 정렬된 서열을 제시하지 않을 것이다.

[0028] 일단 정렬되면, 매치 수는 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 서열 둘 다에서 제시되는 위치의 수를 계수화함으로써 결정된다. 서열 동일성 백분율은 매치 수를 동정된 서열(예를 들어, 서열번호 1)에 제시된 서열의 길이에 의해, 또는 나누어진 길이에 의해(예를 들어, 동정된 서열에 제시된 서열로부터의 100개 연속적 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기) 나눈 다음에, 얻은 값에 100을 곱함으로써 결정된다. 예를 들어, 서열번호 1에 제시된 서열과 함께 정렬할 때 2,200개의 매치를 갖는 핵산 서열은 서열번호 1에 제시된 서열에 대해 91.2% 동일하다(즉, $2,000 \div 2,412 \times 100 = 91.2$). 서열 동일성 값 백분율은 거의 1/10까지 반올림된다는 것을 주목한다. 예를 들어, 75.11, 75.12, 75.13 및 75.14는 75.1로 아래로 반올림하는 반면, 75.15, 75.16, 75.17, 75.18 및 75.19는 75.2로 위로 반올림한다. 또한 길이값은 항상 정수라는 것을 주목한다.

[0029] 따라서, 일부 실시형태에서, gp96-Ig 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 gp96 부분은, 그것이 하나 이상의 보존적 치환, 비보존적 치환, 스플라이싱 변이체, 아이소폼, 다른 종으로부터의 상동체 및 다형성을 함유하도록 하나 이상의 아미노산 위치에서 야생형 gp96 폴리펩타이드와 상이한 아미노산 서열을 암호화할 수 있다.

[0030] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "보존적 치환"은 아미노산 잔기의 다른, 생물학적으로 유사한 잔기에 의한 대체를 의미한다. 전형적으로, 상기 언급한 바와 같은 생물학적 유사성은 야생형 서열에 대해 보존된 아미노산으로의 치환을 반영한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은, 특히 그들이 폴리펩타이드 또는 단백질 내 잔기의 총 수의 10% 미만을 나타낸다면, 생물학적 활성에 대해 효과가 거의 또는 전혀 없는 것으로 예상된다. 보존적 치환은, 예를 들어, 수반된 아미노산 잔기의 극성, 전하, 크기, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 특성의 유사성에 기반하여 이루어질 수 있다. 20가지 천연 유래 아미노산은 다음의 6가지 표준 아미노산 그룹으로 그룹화될 수 있다: (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe. 따라서, 보존적 치환은 아미노산을 상기 나타난 6가지 표준 아미노산 기 내에서 열거된 다른 아미노산으로 교환함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, Asp의 Glu에 의한 교환은 이렇게 변형된 폴리펩타이드에서 하나의 음전하를 보유한다. 추가로, 글리신 및 프롤린은 α -나선을 방해하는 그들의 능력에 기반하의 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 보존된 아미노산 치환의 추가적인 예는 소수성 잔기의 다른 잔기, 예컨대 아이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌으로의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 다른 잔기, 예컨대 아르기닌의 리신으로의 치환, 글루탐산의 아스파르트산으로의 치환, 또는 글루타민의 아스파라긴 등으로의 치환을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 용어 "보존적 치환"은 또한 비치환 모 아미노산 잔기 대신 치환된 아미노산 잔기의 사용을 포함하며, 단, 치환된 폴리펩타이드에 대해 상승된 항체는 또한 비치환된 폴리펩타이드와 면역반응한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "비보존적 치환"은 아미노산의, 상기 나타난 6개의 표준 아미노산 기 (1) 내지 (6)의 상이한 그룹에 열거된 다른 아미노산에 의한 교환으로서 정의된다.

[0032] 다양한 실시형태에서, 치환은 또한 비고전적 아미노산(예를 들어, 셀레노시스테인, 피롤라이신, *N*-폼일메티오닌 β -알라닌, GABA 및 δ -아미노레불린산, 4-아미노벤조산(PABA), 통상적인 아미노산의 D-이성질체, 2,4-다이아미노뷰티르산, α -아미노 아이소뷰티르산, 4-아미노뷰티르산, Abu, 2-아미노 뷰티르산, γ -Abu, ϵ -Ahx, 6-아미노 핵산산, Aib, 2-아미노 아이소뷰티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사코솜, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스테인, t-뷰틸글리신, t-뷰틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, β -알라닌, 플루오로-아미노산, 디자인어 아미노산, 예컨대 β 메틸 아미노산, C α -메틸 아미노산, Na-메틸 아미노산, 및 일반적으로 아미노산 유사체)을 포함할 수 있다.

[0033] 돌연변이는 또한 코돈 축중을 고려하는 것을 포함하는 유전자 코드를 참고로 하여 본 융합 단백질의 뉴클레오타이드 서열로 이루어질 수 있다.

[0034] gp96-Ig 융합 단백질의 Ig 부분("태그")은, 예를 들어, 면역글로불린 분자의 비가변 부분(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE 분자)을 함유할 수 있다. 전형적으로, 이러한 부분은 면역글로불린 중쇄의 불변 영역의 적어도 기능적 CH2 및 CH3 도메인을 함유한다. 융합은 또한 불변 도메인의 Fc 부분의 카복실 말단, 또는 중쇄 또는 경쇄의 CH1에 대해 아미노-말단 바로 옆 영역을 이용하여 이루어질 수 있다. Ig 태그는 포유류(예를 들어, 인간, 마우스, 원숭이 또는 래트) 면역글로불린으로부터 유래될 수 있지만, 인간 면역글로불린은 gp96-Ig 융합이 인간에 대해 생체내 용도로 의도될 때 특히 유용할 수 있다.

- [0035] 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA는 공지되어 있고, cDNA 라이브러리로부터 용이하게 입수 가능하다. 예를 들어, 문헌[Adams *et al.*, *Biochemistry* 1980, 19:2711-2719; Gough *et al.*, *Biochemistry* 1980 19:2702-2710; Dolby *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:6027-6031; Rice *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:7862-7865; Falkner *et al.*, *Nature* 1982, 298:286-288; 및 Morrison *et al.*, *Ann Rev Immunol* 1984, 2:239-256] 참조. 다수의 면역학적 시약 및 표지 시스템이 면역글로불린의 검출을 위해 이용 가능하기 때문에, gp96-Ig 융합 단백질은 당업계에서 공지된 다양한 면역학적 기법, 예컨대 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 면역침전법 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 용이하게 검출되고, 정량화될 수 있다. 유사하게, 펩타이드 태그가 용이하게 이용 가능한 항체와의 에피토프라면, 이러한 시약은 gp96-Ig 융합을 검출하고, 정량화하며, 단리하기 위해 상기 언급한 기법에 의해 사용될 수 있다.
- [0036] 다양한 실시형태에서, gp96-Ig 융합 단백질 및/또는 공동자극 분자 융합은 링커를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 링커는 천연 유래 다중 도메인 단백질로부터 유래될 수 있거나, 또는, 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Chichili *et al.*, (2013), *Protein Sci.* 22(2):153-167, Chen *et al.*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369]에 기재된 바와 같은 경험적 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 링커 설계 데이터베이스 및 컴퓨터 프로그램, 예컨대 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Chen *et al.*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369 및 Crasto *et al.*, (2000), *Protein Eng.* 13(5):309-312]에 기재된 것을 이용하여 설계될 수 있다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 링커는 합성 링커, 예컨대 PEG이다.
- [0038] 다른 실시형태에서, 링커는 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 링커는 약 100개 미만의 아미노산 길이이다. 예를 들어, 링커는 약 100개 미만, 약 95개, 약 90개, 약 85개, 약 80개, 약 75개, 약 70개, 약 65개, 약 60개, 약 55개, 약 50개, 약 45개, 약 40개, 약 35개, 약 30개, 약 25개, 약 20개, 약 19개, 약 18개, 약 17개, 약 16개, 약 15개, 약 14개, 약 13개, 약 12개, 약 11개, 약 10개, 약 9개, 약 8개, 약 7개, 약 6개, 약 5개, 약 4개, 약 3개 또는 약 2개의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 가요성이다. 다른 실시형태에서, 링커는 강성이다. 다양한 실시형태에서, 링커는 실질적으로 글리신 및 세린 잔기(예를 들어, 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 97% 글리신 및 세린)를 포함한다.
- [0039] 다양한 실시형태에서, 링커는 항체의 힌지 영역(예를 들어, 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 IgA1 및 IgA2)를 포함하는 IgG, IgA, IgD 및 IgE)이다. IgG, IgA, IgD 및 IgE 부류 항체에서 발견되는 힌지 영역은 가요성 스페이스로서 작용하여, Fab 부분이 공간 내에서 자유롭게 움직이게 한다. 불변 영역과 대조적으로, 힌지 도메인은 구조적으로 다양하며, 면역글로불린 부류와 하위부류 사이의 서열과 길이는 둘 다 다르다. 예를 들어, 힌지 영역의 길이 및 가요성은 IgG 하위부류 중에서 다르다. IgG1의 힌지 영역은 아미노산 216 내지 231을 포함하며, 그것이 자유롭게 가요성이기 때문에, Fab 단편은 그들의 대칭축 주위에서 회전할 수 있고, 2개의 중쇄간 이황화 브릿지의 처음에 집중된 구체 내에서 이동할 수 있다. IgG2는 IgG1보다 더 짧은 힌지를 가지며, 12개의 아미노산 잔기 및 4개의 이황화 브릿지를 가진다. IgG2의 힌지 영역은 글리신 잔기가 없으며, 상대적으로 짧고, 강성의 폴리-프롤린 이중 나선을 함유하고, 추가의 중쇄-중쇄간 이황화 브릿지에 의해 안정화된다. 이들 특성은 IgG2 분자의 가요성을 제한한다. IgG3은 62개의 아미노산(21개의 프롤린 및 11개의 시스테인을 포함)을 함유하고, 비가요성 폴리-프롤린 이중 나선을 형성하는 그의 독특한 연장된 힌지 영역(IgG1 힌지의 약 4배만큼의 길이)에 의해 다른 하위 부류와 다르다. IgG3에서, Fab 단편은 Fc 단편으로부터 상대적으로 멀리 떨어져서, 분자에 더 큰 가요성을 제공한다. IgG3에서 연장된 힌지는 또한 다른 하위부류에 비해 그의 더 높은 분자량을 초래한다. IgG4의 힌지 영역은 IgG1의 힌지 영역보다 더 짧고, 그의 가요성은 IgG1과 IgG2의 중간이다. 힌지 영역의 가요성은 알려진 바에 따르면 IgG3>IgG1>IgG4>IgG2 순서로 감소된다.
- [0040] 추가적인 예시적 링커는 서열 LE, GGGGS(서열번호 26), (GGGGS)_n(n=1 내지 4)(서열번호 27), (Gly)₈(서열번호 28), (Gly)₆(서열번호 29), (EAAAK)_n(n=1 내지 3)(서열번호 30), A(EAAAK)_nA(n = 2 내지 5)(서열번호 31), AEAKEAAKA(서열번호 32), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A(서열번호 33), PAPAP(서열번호 34), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 35), EGKSSGSGSESKST(서열번호 36), GSAGSAAGSGEF(서열번호 37), 및 (XP)_n을 갖는 링커를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, X는 임의의 아미노산, 예를 들어, Ala, Lys 또는 Glu를 나타낸다.
- [0041] 다양한 실시형태에서, 링커는 기능성일 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 링커는 폴딩 및/또는 안정성을 개선시키고/시키거나, 발현을 개선시키고/시키거나, 약동학을 개선시키고/시키거나 본 조성물의 생체 활성을 개선시키

는 작용을 할 수 있다. 다른 예에서, 링커는 특정 세포 유형 또는 위치에 조성물을 표적화하는 작용을 할 수 있다.

[0042] 일부 실시형태에서, gp96 펩타이드는 무린 IgG1의 힌지, CH2 및 CH3 도메인에 융합될 수 있다(Bowen *et al.*, *J Immunol* 1996, 156:442-449). IgG1 분자의 이 영역은 Ig 분자 내 다른 시스테인과의 이황화 결합에 정상적으로 연루된 3개의 시스테인 잔기를 함유한다. 시스테인 중 어떤 것도 펩타이드가 태그로서 작용하는 것을 요구하지 않기 때문에, 이들 시스테인 잔기 중 하나 이상은 다른 아미노산 잔기, 예를 들어, 세린에 의해 치환될 수 있다.

[0043] 당업계에서 공지된 다양한 리더 서열은 또한 박테리아 및 포유류 세포로부터 gp96-Ig 융합 단백질의 효율적인 분리를 위해 사용될 수 있다(문헌[von Heijne, *J Mol Biol* 1985, 184:99-105] 참조). 리더 펩타이드는 의도된 숙주 세포에 기반하여 선택될 수 있고, 박테리아, 효모, 바이러스, 동물 및 포유류 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 헤르페스 바이러스 당단백질 D 리더 펩타이드는 다양한 포유류 세포에서 사용하기에 적합하다. 포유류 세포에서 사용하기 위한 다른 리더 펩타이드는 마우스 면역글로불린 카파 쇄의 V-J2-C 영역으로부터 얻어질 수 있다(Bernard *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:5812-5816). 펩타이드 태그 또는 리더 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 공지되어 있거나 또는 라이브러리 또는 상업적 공급업자로부터 용이하게 입수 가능하고, 본 명세서에 기재된 융합 단백질에서 적합하다.

[0044] 더 나아가, 다양한 실시형태에서, 본 개시내용의 gp96을 하나 이상의 백신 단백질로 치환할 수 있다. 예를 들어, 다양한 열 충격 단백질은 백신 단백질 중에 있다. 다양한 실시형태에서, 열 충격 단백질은 작은 hsp, hsp40, hsp60, hsp70, hsp90 및 hsp110 패밀리 구성원(단편, 변이체, 돌연변이체, 유도체 또는 이들의 조합을 포함) 중 하나 이상이다(Hickey, *et al.*, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:2615-2626; Jindal, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:2279-2283).

[0045] T-세포 공동 자극

[0046] gp96-Ig 융합 단백질에 추가로, 본 명세서에 제공된 발현 벡터는 하나 이상의 생물학적 반응 변경유전자를 암호화할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 발현 벡터는 하나 이상의 T 세포 공동자극 분자를 암호화할 수 있다.

[0047] 다양한 실시형태에서, 본 발현 벡터는 강한, 항원-특이적 CD8 세포독성 T 림프구(CTL) 확장을 허용한다. 다양한 실시형태에서, 본 발현 벡터는 CD8 세포독성 T 림프구(CTL)를 선택적으로 향상시키고, 전종양일 수 있고, Treg, 하나 이상의 면역관문 저해 수용체를 발현시키는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포, Th2 세포 및 Th17 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 T 세포 유형을 실질적으로 향상시키지 않는다. 면역 관문 저해 수용체는 비체어 면역 반응을 방지 또는 저해하는 면역 세포 상에서 발현되는 수용체(예를 들어, CTLA-4, B7-H3, B7-H4, TIM-3)를 지칭한다. 예를 들어, 본 발현 벡터는 FOXP3⁺ 조절 T 세포를 실질적으로 향상시키지 않는다. 일부 실시형태에서, 이 선택적 CD8 T 세포 증대는 gp-96 융합 및 T 세포 공동자극 분자에 대한 항체의 병용 요법에 의해 관찰된 비특이적 T 세포 증대와 대조적이다.

[0048] 예를 들어, 벡터는 OX40의 작용제(예를 들어, OX40 리간드-Ig(OX40L-Ig) 융합, 또는 OX40에 결합하는 이들의 단편), 유도성 T-세포 공동자극제(ICOS)의 작용제(예를 들어, ICOS 리간드-Ig(ICOSL-Ig) 융합, 또는 ICOS에 결합하는 이들의 단편), CD40의 작용제(예를 들어, CD40L-Ig 융합 단백질, 또는 이들의 단편), CD27의 작용제(예를 들어, CD70-Ig 융합 단백질 또는 이들의 단편), 4-1BB의 작용제(예를 들어, 4-1BB 리간드-Ig(4-1BBL-Ig) 융합, 또는 4-1BB에 결합하는 이들의 단편)를 암호화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 TNFRSF25 (예를 들어, TL1A-Ig 융합, 또는 TNFRSF25에 결합하는 이들의 단편), 또는 글루코코르티코이드-유도 종양 괴사 인자 수용체(GITR)의 작용제(예를 들어, GITR 리간드-Ig(GITRL-Ig) 융합, 또는 GITR에 결합하는 이들의 단편), 또는 CD40의 작용제(예를 들어, CD40 리간드-Ig(CD40L-Ig) 융합, 또는 CD40에 결합하는 이들의 단편); 또는 CD27의 작용제(예를 들어, CD27 리간드-Ig(예를 들어, CD70L-Ig) 융합, 또는 CD40에 결합하는 이들의 단편)를 암호화할 수 있다.

[0049] ICOS는 CD28 및 CTLA-4를 나타내는 유도성 T 세포 공동자극 수용체 분자이고, 항원-제시 세포의 표면 상에서 발현된 B7-H2와 상호작용한다. ICOS는 세포 매개 및 체액성 면역 반응의 조절에 연루되었다.

[0050] 4-1BB는 TNF 슈퍼패밀리에 속하는 2형 막관통 당단백질이며, 활성화된 T 림프구 상에서 발현된다.

[0051] OX40(또한 CD134 또는 TNFRSF4로서 지칭됨)은 OX40L에 의해 맞물리는 T 세포 공동자극 분자이고, 빈번하게는 항원 제시 세포 및 다른 세포 유형에서 유도된다. OX40은 사이토카인 발현 및 효과기 T 세포의 생존을 향상시키는

것으로 알려져 있다.

- [0052] GITR(TNFRSF18)은 GITRL에 의해 맞물리는 T 세포 공동자극 분자이고, FoxP3+ 조절 T 세포에서 우선적으로 발현된다. GITR은 종양 미세환경 내에서 Treg의 유지 및 기능에 상당한 역할을 한다.
- [0053] TNFRSF25는 항원 자극 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 우선적으로 발현된 T 세포 공동자극 분자이다. TNFRSF25를 통한 신호전달은 TL1A에 의해 제공되고, 동족 항원 의존적 방식으로 IL-2 수용체 매개 증식에 대한 T 세포 민감성을 향상시키는 작용을 한다.
- [0054] CD40은 활성화에서 어떤 역할을 하는 다양한 항원 제시 세포 상에서 발견된 공동자극 단백질이다. CD40에 대한 T_H 세포 상의 CD40L(CD154) 결합은 항원 제시 세포를 활성화하고, 다양한 하류의 효과를 유도한다.
- [0055] CD27은 T 세포 면역의 생성 및 장기간 유지에 어떤 역할을 하는 TNF 슈퍼패밀리에 속하는 T 세포 공동자극 분자이다. 이는 다양한 면역학적 과정에서 리간드 CD70에 결합한다.
- [0056] 본 발명에서 이용될 수 있는 추가적인 공동자극 분자는 HVEM, CD28, CD30, CD30L, CD40, CD70, LIGHT(CD258), B7-1 및 B7-2를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0057] gp96-Ig 융합에 대해서와 같이, T 세포 공동자극 융합 단백질의 Ig 부분("태그")는 면역글로불린 분자(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA 또는 IgE 분자)의 비가변 부분을 함유할 수 있다. 상기 기재한 바와 같이, 이러한 부분은 전형적으로 면역글로불린 중쇄의 불변 영역의 적어도 기능적 CH2 및 CH3 도메인을 함유한다. 일부 실시형태에서, T 세포 공동자극 펩타이드는 무린 IgG1의 힌지, CH2 및 CH3 도메인에 융합될 수 있다(Bowen *et al.*, *J Immunol* 1996, 156:442-449). Ig 태그는 포유류(예를 들어, 인간, 마우스, 원숭이 또는 래트) 면역글로불린으로부터 유래될 수 있지만, 인간 면역글로불린은 융합 단백질이 인간에 대해 생체내 용도로 의도될 때 특히 유용할 수 있다. 또한, 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA는 공지되어 있고, cDNA 라이브러리로부터 용이하게 입수 가능하다. 상기 기재한 바와 같은 다양한 리더 서열은 또한 박테리아 및 포유류 세포로부터의 T 세포 공동자극 융합 단백질의 분비를 위해 사용될 수 있다.
- [0058] Ig에 융합된 인간 ICOSL의 세포외 도메인을 암호화하는 대표적인 뉴클레오타이드 최적화 서열(서열번호 4), 및 암호화된 융합의 아미노산 서열(서열번호 5)이 제공된다:

ATGAGACTGGGAAGCCCTGGCCTGCTGTTTCTGCTGTTTCAG
 CAGCCTGAGAGCCGACACCCAGGAAAAAGAAGTGCGGGC
 CATGGTGGGAAGCGACGTGGAAGTGAAGTGCCTGTCCT
 GAGGGCAGCAGATTGACCTGAACGACGTGTACGTGTACT
 GGCAGACCAGCGAGAGCAAGACCGTCGTGACCTACCACAT
 CCCCAGAACAGCTCCCTGGAAAAAGTGGACAGCCGGTAC
 AGAAACCGGGCCCTGATGTCTCCTGCCGGCATGCTGAGAG
 GCGACTTCAGCCTGCGGCTGTTCAACGTGACCCCCAGGA
 CGAGCAGAAATTCCACTGCCTGGTGTGAGCCAGAGCCTG
 GGCTTCCAGGAAGTGTGAGCGTGGAAGTGACCTGCACG
 TGGCCGCCAATTTACAGCGTGCCAGTGGTGTCTGCCCCCAC
 AGCCCTTCTCAGGATGAGCTGACCTTCACCTGTACCAGCAT
 CAACGGCTACCCCAGACCAATGTGTACTGGATCAACAAG
 ACCGACAACAGCCTGCTGGACCAGGCCCTGCAGAACGATA
 CCGTGTTCTGAACATGCGGGGCCTGTACGACGTGGTGTCC
 GTGCTGAGAATCGCCAGAACCCCCAGCGTGAACATCGGCT
 GCTGCATCGAGAACGTGTGCTGCAGCAGAACCTGACCGT
 GGGCAGCCAGACCGGCAACGACATCGGCGAGAGAGACAA
 GATCACCGAGAACCCCGTGTCCACCGGCGAGAAGAATGCC
 GCCACCTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTTCTTGCCCAGC
 CCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCC
 CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGA
 AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCC
 GAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGGTGGAAGTGC
 ACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACA
 GCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GATTGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA
 GCAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAA
 CGCCACCGGCCAGCCCAGGGAACCCCAGGTGTACACACTG
 CCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC

[0059]

TGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC
GTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACACTAC
AAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCT
TCCTGTACTCCCGGCTGACAGTGGACAAGAGCAGCTGGCA
GGAAGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAAGCC
CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCT
GGGCAAATGA (서열번호 4)

MRLGSPGLLFLLFSSLRADTQEKEVRAMVGSDELSCACPEG
SRFDLNDVYVYWQTSESKTVVITYHIPQNSSLENVDSRYRNRA
LMSPAGMLRGDFSLRFLNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEV
SVEVTLHVAANFSPVVSAPHSPSQDELFTCTTSINGYPRPNV
YWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPS
VNIGCCIEENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKN
AATSKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLK (서열번호 5).

[0060]

[0061]

Ig에 융합된 인간 4-1BBL의 세포외 도메인을 암호화하는 대표적인 뉴클레오타이드 최적화 서열(서열번호 6), 및
암호화된 아미노산 서열(서열번호 7)이 제공된다:

ATGTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGCCCTGCCCC
TGAATTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGT
GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAG
GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACA
ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCA
CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT
TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCA
AGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAACGC
CACCGGCCAGCCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCC
CCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG
GAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG

[0062]

ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCT
GTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGA
AGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCTGG
GCAAGGCCTGTCCATGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCT
CCTGGATCTGCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTG
AGCTGAGCCCCGATGATCCTGCCGACTGCTGGATCTGAG
ACAGGGCATGTTCCGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTG
CTGATCGATGGCCCCCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACT
GGCTGGCGTGTCAGTACAGGCGGCTGAGCTACAAAGAG
GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGACT
ACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTCCGGAGAGTGGTGGCCGG
CGAAGGATCCGGCTCTGTGTCTCTGGCTCTGCATCTGCAGC
CCCTGAGATCTGCTGCTGGCGCTGCTGCTCTGGCCCTGACA
GTGGACCTGCCTCCTGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCG
CATTCCGGTTTCAAGGCAGACTGCTGCACCTGTCTGCCGGC
CAGAGACTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCA
GGCACGCCTGGCAGCTGACTCAGGGCGCTACAGTGCTGGG
CCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTA
GCCCCAGATCCGAATGA (서열번호 6)

MSKYGPPCSPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLMSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLKACPWAVSGARASPGSAASPRREG
PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL
AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE
GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG
FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR
VTPEIPAGLPSRSE (서열번호 7).

[0063]

[0064]

Ig에 융합된 인간 TL1A의 세포외 도메인을 암호화하는 대표적인 뉴클레오타이드 최적화 서열(서열번호 8), 및 암호화된 아미노산 서열(서열번호 9)이 제공된다:

ATGTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGCCCTGCCCC
TGAATTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT
GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAG
GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCA
CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT
TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCA
AGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAACGC
CACCGGCCAGCCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCC
CCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG
GAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG
ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCT
GTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGA
AGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCTGG
GCAAGATCGAGGGCCGGATGGATAGAGCCCAGGGCGAAG
CCTGCGTGCAGTTCCAGGCTCTGAAGGGCCAGGAATTCGC
CCCCAGCCACCAGCAGGTGTACGCCCCTCTGAGAGCCGAC
GGCGATAAGCCTAGAGCCCACCTGACAGTCGTGCGGCAGA
CCCCTACCCAGCACTTCAAGAATCAGTTCCCCGCCCTGCAC
TGGGAGCACGAAGTGGGCCTGGCCTTCACCAAGAACAGAA
TGAATAACCAACAAGTTTCTGCTGATCCCCGAGAGCGG
CGACTACTTCATCTACAGCCAAGTGACCTTCCGGGGCATGA
CCAGCGAGTGCAGCGAGATCAGACAGGCCGGCAGACCTAA
CAAGCCCAGCAGCATCACCGTCGTGATCACCAGAGTGACC
GACAGCTACCCCGAGCCACCCAGCTGCTGATGGGCACCA
AGAGCGTGTGCGAAGTGGGCAGCAACTGGTTCCAGCCCAT
CTACCTGGGCGCCATGTTTAGTCTGCAAGAGGGCGACAAG
CTGATGGTCAACGTGTCCGACATCAGCCTGGTGGATTACAC
CAAAGAGGACAAGACCTTCTTCGGCGCCTTTCTGCTCTGA
(서열번호 8)

MSKYGPCCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV

VSVLTVLHQDWLMSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMDRAQGEACVQFQALKGQE
FAPSHQQVYAPLRADGDKPRAHLTVVRQTPTQHFKNQFPAL
HWEHELGLAFTKNRMNYTNKFLIPESGDYFIYSQVTFRGMT
SECSEIRQAGRPKNPDSITVVITKVTDSYPEPTQLLMGTSVCE
VGSNWFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVNVSDISLVDYTKEDKTF
FGAFL (서열번호 9).

인간 OX40L-Ig를 암호화하는 대표적인 뉴클레오타이드 최적화 서열(서열번호 10), 및 암호화된 아미노산 서열(서열번호 11)이 제공된다:

ATGTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGCCCTGCCCC
TGAATTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT
GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAG
GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCA
CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT
TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCA
AGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAACGC
CACCGGCCAGCCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCC
CCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG
GAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG
ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCT
GTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGA
AGGCAACGTGTTTACGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCTGG
GCAAGATCGAGGGCCGGATGGATCAGGTGTCACACAGATA
CCCCGGATCCAGAGCATCAAAGTGCAGTTTACCGAGTAC
AAGAAAGAGAAGGGCTTTATCCTGACCAGCCAGAAAGAG
GACGAGATCATGAAGGTGCAGAACAAACAGCGTGATCATCA
ACTGCGACGGGTTCTACCTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTC
AGTCAGGAAGTGAACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACG
AGGAACCCCTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAA

[0068]

CAGCCTGATGGTGGCCTCTCTGACCTACAAGGACAAGGTG
TACCTGAACGTGACCACCGACAACACCAGCCTGGACGACT
TCCACGTGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATTCACCAGAA
CCCCGGCGAGTTCTGCGTGCTCTGA (서열번호 10)

MSKYGPSCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLGSKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMDQVSHRYPRIQSIKVQFTEY
KKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYSQEV
NISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT
DNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL (서열번호 11).

[0069]

[0070] 인간 TL1A에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 12 및 서열번호 13에 제시된다:

```
TCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGAGCCCACCACCACCCCC
GGCTAATTTTTTGTATTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCG
TGTTAGCCAAGATGGTCTTGATCACCTGACCTCGTGATCCA
CCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGA
GCCACCGCGCCCGCCTCCATTCAAGTCTTTATTGAATATC
TGCTATGTTCTACACACTGTTCTAGGTGCTGGGGATGCAAC
AGGGGACAAAATAGGCAAAATCCCTGTCCTTTTGGGGTTG
ACATTCTAGTGACTCTTCATGTAGTCTAGAAGAAGCTCAGT
GAATAGTGTCTGTGGTTGTTACCAGGGACACAATGACAGG
AACATTCTTGGGTAGAGTGAGAGGCCTGGGGAGGGAAGGG
TCTCTAGGATGGAGCAGATGCTGGGCAGTCTTAGGGAGCC
CCTCCTGGCATGCACCCCTCATCCCTCAGGCCACCCCGT
CCCTTGCAAGGAGCACCTGGGGAGCTGTCCAGAGCGCTGT
GCCGCTGTCTGTGGCTGGAGGCAGAGTAGGTGGTGTGCTG
GGAATGCGAGTGGGAGAACTGGGATGGACCGAGGGGAGG
CGGGTGAGGAGGGGGGCAACCACCCAACACCCACCAGCTG
CTTTCAGTGTTCTGGGTCCAGGTGCTCCTGGCTGGCCTTGT
GGTCCCCCTCCTGCTTGGGGCCACCCTGACCTACACATACC
GCCACTGCTGGCCTCACAAGCCCCTGGTTACTGCAGATGA
AGCTGGGATGGAGGCTCTGACCCACCACCGGCCACCCAT
```

[0071]

CTGTCACCCTTGGACAGCGCCACACCCTTCTAGCACCTCC
 TGACAGCAGTGAGAAGATCTGCACCGTCCAGTTGGTGGGT
 AACAGCTGGACCCCTGGCTACCCCGAGACCCAGGAGGCGC
 TCTGCCCCGACGGTGACATGGTCCTGGGACCAGTTGCCAG
 CAGAGCTCTTGGCCCCGCTGCTGCGCCACACTCTCGCCAG
 AGTCCCCAGCCGGCTCGCCAGCCATGATGCTGCAGCCGGG
 CCCGACGCTCTACGACGTGATGGACGCGGTCCCAGCGCGG
 CGCTGGAAGGAGTTTCGTGCGCACGCTGGGGCTGCGCGAGG
 CAGAGATCGAAGCCGTGGAGGTGGAGATCGGCCGCTTCCG
 AGACCAGCAGTACGAGATGCTCAAGCGCTGGCGCCAGCAG
 CAGCCCGCGGGCCTCGGAGCCGTTTACGCGGCCCTGGAGC
 GCATGGGGCTGGACGGCTGCGTGGAAGACTTGCGCAGCCG
 CCTGCAGCGCGGCCCGTGACACGGCGCCACTTGCCACCT
 AGGCGCTCTGGTGGCCCTTGCAAGCCCTAAGTACGTT
 ACTTATGCGTGTAGACATTTTATGTCACTTATTAAGCCGCT
 GGCACGGCCCTGCGTAGCAGCACCCAGCCGGCCCCACCCCT
 GCTCGCCCCATCGCTCCAGCCAAGGCGAAGAAGCACGAA
 CGAATGTCGAGAGGGGGTGAAGACATTTCTCAACTTCTCG
 GCCGGAGTTTGGCTGAGATCGCGGTATTAATCTGTGAAA
 GAAAAACAAAACAAAACAA (서열번호 12)

MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTRSPRCDACGDFHK
 KIGLFCCRGPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWEN
 HHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVE
 CQVSQCVSSPFYCQPCLDGALHRHTRLLCSRRDTCGTCL
 PGFYEHGDGCVSCPTPPPSLAGAPWGAVQSAVPLSVAGGRV
 GVFWVQVLLAGLVVPLLLGATLTYTYRHCWPHKPLVTADEA
 GMEALTPPPATHLSPLDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNSWT
 PGPYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSPESPAGS
 PAMMLQPGPQLYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVE
 VEIGRFRDQQYEMLRWRQQPAGLGAVYAALERMGLDGC
 VEDLRSRLQRGP (서열번호 13).

[0072]

[0073]

인간 HVEM에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 38(수탁번호 CR456909) 및 서열번호 39(수탁번호 CR456909)에 제시되어 있다:

ATGGAGCCTCCTGGAGACTGGGGGCCTCCTCCCTGGAGAT
 CCACCCCCAAAACCGACGTCTTGAGGCTGGTGCTGTATCTC
 ACCTTCCTGGGAGCCCCCTGCTACGCCCCAGCTCTGCCGTC
 CTGCAAGGAGGACGAGTACCCAGTGGGCTCCGAGTGCTGC
 CCCAAGTGCAAGTCCAGGTTATCGTGTGAAGGAGGCCTGCG
 GGGAGCTGACGGGCACAGTGTGTGAACCCTGCCCTCCAGG
 CACCTACATTGCCCACCTCAATGGCCTAAGCAAGTGTCTGC
 AGTGCCAAATGTGTGACCCAGCCATGGGCCTGCGCGCGAG
 CCGGAACTGCTCCAGGACAGAGAACGCCGTGTGTGGCTGC
 AGCCCAGGCCACTTCTGCATCGTCCAGGACGGGGACCACT
 GCGCCGCGTGCCGCGCTTACGCCACCTCCAGCCCGGGCCA
 GAGGGTGCAAGGGAGGCACCGAGAGTCAGGACACCCT
 GTGTGAGAACTGCCCCCGGGACCTTCTCTCCAATGGGA
 CCCTGGAGGAATGTCAGCACCAGACCAAGTGCAGCTGGCT
 GGTGACGAAGGCCGGAGCTGGGACCAGCAGCTCCCACTGG
 GTATGGTGGTTTCTCTCAGGGAGCCTCGTCATCGTCATTGT
 TTGCTCCACAGTTGGCCTAATCATATGTGTGAAAAGAAGA
 AAGCCAAGGGGTGATGTAGTCAAGGTGATCGTCTCCGTCC
 AGCGGAAAAAGACAGGAGGCAGAAAGGTGAGGCCACAGTCA
 TTGAGGCCCTGCAGGCCCTCCGGACGTCACCACGGTGGC
 CGTGAGGAGACAATAACCTCATTACGGGGAGGAGCCCA
 AACCATTAA (서열번호 38)

MEPPGDWGPWPWRSTPKTDVLRVLVLTFLGAPCYAPALPSC
 KEDEYPVGSECCPKCSPGYRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYIA
 HLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCSTENAVCGCSPGHF
 CIVQGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQDTLCQNCPP
 GTFSPNGTLEECQHQTCSWLVTKAGAGTSSSHVWWFSLG
 SLVIVIVCSTVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQAEAGE
 ATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH (서열번호 39).

[0074]

[0075]

인간 CD28에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 40(수탁 번호 NM_006139) 및 서열번호 41에 제시된다:

TAAAGTCATCAAAACAACGTTATATCCTGTGTGAAATGCTG
 CAGTCAGGATGCCTTGTGGTTTGAGTGCCTTGATCATGTGC
 CCTAAGGGGATGGTGGCGGTGGTGGTGGCCGTGGATGACG
 GAGACTCTCAGGCCTTGGCAGGTGCGTCTTTCAGTTCCCT

[0076]

CACACTTCGGGTTCTCGGGGAGGAGGGGCTGGAACCCTA
 GCCCATCGTCAGGACAAAGATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTC
 TCAACTTATTCCTTCAATTCAAGTAACAGGAAACAAGATT
 TTGGTGAAGCAGTCGCCCATGCTTGTAGCGTACGACAATG
 CGGTCAACCTTAGCTGCAAGTATTCCTACAATCTCTTCTCA
 AGGGAGTTCCGGGCATCCCTTCACAAAGGACTGGATAGTG
 CTGTGGAAGTCTGTGTTGTATATGGGAATTACTCCAGCAG
 CTTCAGGTTTACTCAAAAACGGGGTTCAACTGTGATGGGA
 AATTGGGCAATGAATCAGTGACATTCTACCTCCAGAATTTG
 TATGTTAACCACAGATATTTACTTCTGCAAAATTGAAGT
 TATGTATCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATG
 GAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAG
 TCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAA
 CAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC
 AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
 GCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCC
 ACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCTGACACGGACGC
 CTATCCAGAAGCCAGCCGGCTGGCAGCCCCCATCTGTCTA
 ATATCACTGCTCTGGATAGGAAATGACCGCCATCTCCAGCC
 GGCCACCTCAGGCCCTGTTGGGCCACCAATGCCAATTTTT
 CTCGAGTGACTAGACCAAATATCAAGATCATTTTGAGACTC
 TGAAATGAAGTAAAAGAGATTCCTGTGACAGGCCAAGTC
 TTACAGTGCCATGGCCCACATTCCAACCTACCATGTACTTA
 GTGACTTGACTGAGAAGTTAGGGTAGAAAACAAAAGGG
 AGTGGAATCTGGGAGCCTCTTCCCTTTCTCACTCACCTGCA
 CATCTCAGTCAAGCAAAGTGTTGGTATCCACAGACATTTTAG
 TTGCAGAAGAAAGGCTAGGAAATCATTCCTTTTGGTTAAAT
 GGGTGTTTAATCTTTTGGTTAGTGGGTAAACGGGGTAAGT
 TAGAGTAGGGGGAGGGATAGGAAGACATATTTAAAAACC
 ATTTAAACACTGTCTCCCACTCATGAAATGAGCCACGTAGT
 TCCTATTTAATGCTGTTTTCTTTAGTTTAGAAATACATAGA
 CATTGTCTTTTATGAATTCTGATCATATTTAGTCATTTTGAC
 CAAATGAGGGATTTGGTCAAATGAGGGATTCCCTCAAAGC
 AATATCAGGTAAACCAAGTTGCTTTCCTCACTCCCTGTCAT

[0077]

GAGACTTCAGTGTTAATGTTTACAATATACTTTGAAAGAA
TAAAATAGTTCTCCTACATGAAGAAAGAATATGTCAGGAA
ATAAGGTCACCTTATGTCAAAATTATTTGAGTACTATGGGA
CCTGGCGCAGTGGCTCATGCTTGTAAATCCCAGCACTTTGGG
AGGCCGAGGTGGGCAGATCACTTGAGATCAGGACCAGCCT
GGTCAAGATGGTGAACTCCGTCTGTACTAAAAATACAAA
ATTTAGCTTGGCCTGGTGGCAGGCACCTGTAATCCCAGCTG
CCCAAGAGGCTGAGGCATGAGAATCGCTTGAACCTGGCAG
GCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATAGTGCCACAGCTCTCC
AGCCTGGGCGACAGAGTGAGACTCCATCTCAAACAACAAC
AACACAACAACAACAACAACAACCACAAAAATTATTTGA
GTACTGTGAAGGATTATTTGTCTAACAGTTCATTCCAATCA
GACCAGGTAGGAGCTTTCCTGTTTCATATGTTTCAGGGTTG
CACAGTTGGTCTCTTTAATGTCGGTGTGGAGATCCAAAGTG
GGTTGTGGAAAGAGCGTCCATAGGAGAAGTGAGAATACTG
TGAAAAAGGGATGTTAGCATTCAATTAGAGTATGAGGATGA
GTCCCAAGAAGGTTCTTTGGAAGGAGGACGAATAGAATGG
AGTAATGAAATTCTTGCCATGTGCTGAGGAGATAGCCAGC
ATTAGGTGACAATCTTCCAGAAGTGGTCAGGCAGAAGGTG
CCCTGGTGAGAGCTCCTTTACAGGGACTTTATGTGGTTTAG
GGCTCAGAGCTCCAAACTCTGGGCTCAGCTGCTCCTGTAC
CTTGAGGTTCCATTACATGGGAAAGTATTTTGAATGTGT
CTTTTGAAGAGAGCATCAGAGTTCTTAAGGGACTGGGTAA
GGCCTGACCCTGAAATGACCATGGATATTTTCTACCTACA
GTTTGAGTCAACTAGAAATATGCCTGGGGACCTTGAAAGAAT
GGCCCTTCAGTGGCCCTCACCATTGTTCATGCTTCAGTTA
ATTCAGGTGTTGAAGGAGCTTAGGTTTTAGAGGCACGTAG
ACTTGGTTCAAGTCTCGTTAGTAGTTGAATAGCCTCAGGCA
AGTCACTGCCCACCTAAGATGATGGTTCTTCAACTATAAAA
TGGAGATAATGGTTACAAATGTCTCTTCCTATAGTATAATC
TCCATAAGGGCATGGCCCAAGTCTGTCTTTGACTCTGCCTA
TCCCTGACATTTAGTAGCATGCCCACATACAATGTTAGCT
ATTGGTATTATTGCCATATAGATAAATTATGTATAAAAATT
AAACTGGGCAATAGCCTAAGAAGGGGGGAATATTGTAACA
CAAATTTAAACCCACTACGCAGGGATGAGGTGCTATAATA

[0078]

TGAGGACCTTTTAACTTCCATCATTTTCCTGTTTCTTGAAAT
 AGTTTATCTTGTAATGAAATATAAGGCACCTCCCACTTTTA
 TGTATAGAAAAGAGGTCTTTTAATTTTTTTTAATGTGAGAA
 GGAAGGGAGGAGTAGGAATCTTGAGATTCCAGATCGAAAA
 TACTGTACTTTGGTTGATTTTAAAGTGGGCTTCCATTCCATG
 GATTTAATCAGTCCCAAGAAGATCAAACTCAGCAGTACTT
 GGGTGCTGAAGAACTGTTGGATTACCTGGCACGTGTGCC
 ACTTGCCAGCTTCTTGGGCACACAGAGTTCTTCAATCCAAG
 TTATCAGATTGTATTTGAAAATGACAGAGCTGGAGAGTTTT
 TTGAAATGGCAGTGGCAAATAAAATAAAATACTTTTTTTTAAA
 TGGAAAGACTTGATCTATGGTAATAAATGATTTTGTCTTCT
 GACTGGAAAAATAGGCCTACTAAAGATGAATCACACTTGA
 GATGTTTCTTACTACTCTGCACAGAAACAAAGAAGAAAT
 GTTATACAGGGAAGTCCGTTTTCTACTATTAGTATGAACCAA
 GAAATGGTTCAAAAACAGTGGTAGGAGCAATGCTTTCATA
 GTTTCAGATATGGTAGTTATGAAGAAAACAATGTCATTTGC
 TGCTATTATTGTAAGAGTCTTATAATTAATGGTACTCCTAT
 AATTTTTGATTGTGAGCTCACCTATTTGGGTAAAGCATGCC
 AATTTAAAGAGACCAAGTGTATGTACATTATGTTCTACATA
 TTCAGTGATAAAATTACTAACTACTATATGTCTGCTTTAA
 ATTTGTACTTTAATATTGTCTTTTGGTATTAAGAAAGATAT
 GCTTTCAGAATAGATATGCTTCGCTTTGGCAAGGAATTTGG
 ATAGAACTTGCTATTTAAAAGAGGTGTGGGGTAAATCCTTG
 TATAAATCTCCAGTTTAGCCTTTTTGAAAAAGCTAGACTT
 TCAAATACTAATTTCACTTCAAGCAGGGTACGTTTCTGGTT
 TGTTTGCTTGACTTCAGTCACAATTTCTTATCAGACCAATG
 GCTGACCTCTTTGAGATGTCAGGCTAGGCTTACCTATGTGT
 TCTGTGTCATGTGAATGCTGAGAAGTTTGACAGAGATCCA
 ACTTCAGCCTTGACCCCATCAGTCCCTCGGGTTAACTAACT
 GAGCCACCGGTCCTCATGGCTATTTTAATGAGGGTATTGAT
 GGTAAATGCATGTCTGATCCCTTATCCCAGCCATTTGCAC
 TGCCAGCTGGGAACTATACCAGACCTGGATACTGATCCCA
 AAGTGTTAAATTCAACTACATGCTGGAGATTAGAGATGGT
 GCCAATAAAGGACCCAGAACCAGGATCTTGATTGCTATAG
 ACTTATTAATAATCCAGGTCAAAGAGAGTGACACACACTC

[0079]

TCTCAAGACCTGGGGTGAGGGAGTCTGTGTTATCTGCAAG
GCCATTTGAGGCTCAGAAAGTCTCTCTTTCCTATAGATATA
TGCATACTTTCTGACATATAGGAATGTATCAGGAATACTCA
ACCATCACAGGCATGTTCTTACCTCAGGGCCTTTACATGTC
CTGTTTACTCTGTCTAGAATGTCCTTCTGTAGATGACCTGG
CTTGCCTCGTCACCCCTTCAGGTCCTTGCTCAAGTGTCATCTT
CTCCCCTAGTTAAACTACCCACACCCTGTCTGCTTTCCTTG
CTTATTTTCTCCATAGCATTTTACCATCTCTTACATTAGAC
ATTTTTCTTATTTATTTGTAGTTTATAAGCTTCATGAGGCAA
GTAACCTTTGCTTTGTTTCTTGCTGTATCTCCAGTGCCCAGAG
CAGTGCCTGGTATATAATAAATATTTATTGACTGAGTGAAA
AAAAAAAAAAAAAA (서열번호 40)

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKY
SYNLFREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGF
NCDGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNE
KSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGLACYSLL
VTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP
PRDFAAYRS (서열번호 41).

[0080]

[0081]

인간 CD30L에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 42(수탁 번호 L09753) 및 서열번호 43에 제시된다:

CCAAGTCACATGATTCAGGATTCAGGGGGAGAATCCTTCTT
GGAACAGAGATGGGCCCAGAACTGAATCAGATGAAGAGA
GATAAGGTGTGATGTGGGGAAGACTATATAAAGAATGGAC
CCAGGGCTGCAGCAAGCACTCAACGGAATGGCCCCCTCCTG
GAGACACAGCCATGCATGTGCCGCGGGCTCCGTGGCCAG
CCACCTGGGGACACGAGCCGCAGCTATTTCTATTTGACCA
CAGCCACTCTGGCTCTGTGCCTTGCTTTCACGGTGGCCACT
ATTATGGTGTGGTTCGTTTCAGAGGACGGACTCCATTCCCAA
CTCACCTGACAACGTCCCCCTCAAAGGAGGAAATTGCTCA
GAAGACCTCTTATGTATCCTGAAAAGAGCTCCATTCAAGA
AGTCATGGGCCTACCTCCAAGTGGCAAAGCATCTAAACAA
AACCAAGTTGTCTTGGAACAAAGATGGCATTCTCCATGGA
GTCAGATATCAGGATGGGAATCTGGTGATCCAATTCCTG
GTTTGTACTTCATCATTTGCCAACTGCAGTTTCTTGTAAT
GCCCAAATAATTCTGTCTGATCTGAAGTTGGAGCTTCTCATC

[0082]

AACAAGCATATCAAAAAACAGGCCCTGGTGACAGTGTGTG
 AGTCTGGAATGCAAACGAAACACGTATACCAGAATCTCTC
 TCAATTCTTGCTGGATTACCTGCAGGTCAACACCACCATAT
 CAGTCAATGTGGATACATTCCAGTACATAGATACAAGCAC
 CTTTCCTCTTGAGAATGTGTTGTCCATCTTCTTATACAGTAA
 TTCAGACTGAACAGTTTCTCTTGGCCTTCAGGAAGAAAGCG
 CCTCTCTACCATACAGTATTTTCATCCCTCCAAACACTTGGG
 CAAAAAGAAAACTTTAGACCAAGACAACTACACAGGGTA
 TTAAATAGTATACTTCTCCTTCTGTCTCTTGAAAGATACA
 GCTCCAGGGTTAAAAAGAGAGTTTTTAGTGAAGTATCTTTC
 AGATAGCAGGCAGGGAAGCAATGTAGTGTGGTGGGCAGA
 GCCCCACACAGAATCAGAAGGGATGAATGGATGTCCCAGC
 CCAACCACTAATTCAGTGTATGGTCTTGATCTATTTCTTCTG
 TTTTGAGAGCCTCCAGTTAAATGGGGCTTCAGTACCAGA
 GCAGCTAGCAACTCTGCCCTAATGGGAAATGAAGGGGAGC
 TGGGTGTGAGTGTTTACACTGTGCCCTTCACGGGATACTTC
 TTTTATCTGCAGATGGCCTAATGCTTAGTTGTCCAAGTCGC
 GATCAAGGACTCTCTCACACAGGAACTTCCCTATACTGGC
 AGATACACTTGTGACTGAACCATGCCAGTTTATGCCTGTC
 TGACTGTCACTCTGGCACTAGGAGGCTGATCTTGACTCCA
 TATGACCCACCCCTAGGAACCCCAAGGAAAACCAGGCT
 CGGACAGCCCCCTGTTCTGAGATGGAAAGCACAAATTTA
 ATACACCACCACAATGGAAAACAAGTTCAAAGACTTTTAC
 TTACAGATCCTGGACAGAAAGGGCATAATGAGTCTGAAGG
 GCAGTCCTCCTTCTCCAGGTTACATGAGGCAGGAATAAGA
 AGTCAGACAGAGACAGCAAGACAGTTAACAACGTAGGTA
 AAGAAATAGGGTGTGGTCACTCTCAATTCAGTGGCAAATG
 CCTGAATGGTCTGTCTGAAGGAAGCAACAGAGAAGTGGGG
 AATCCAGTCTGCTAGGCAGGAAAGATGCCTCTAAGTTCTTG
 TCTCTGGCCAGAGGTGTGGTATAGAACCAGAAACCCATAT
 CAAGGGTGACTAAGCCCGGCTTCCGGTATGAGAAATTTAA
 CTTGTATACAAAATGGTTGCCAAGGCAACATAAAATTATA
 AGAATTC (서열번호 42)

MDPGLQQALNGMAPPDGTAMHVPAGSVASHLGTTSRSYFYL
 TTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIPNSPDNVPLKGGNCSE

[0083]

DLLCILKRAPFKKSWAYLQVAKHLNKTLSWNKDGLHGVR
 YQDGNLVIQFPGLYFIICQLQFLVQCPNNSVDLKLELLINKHIK
 KQALVTVCESGMQTKHVYQNLSQLLDYLVQVNTTISVNVDT
 FQYIDTSTFPLENVLSIFLYSNSD (서열번호 43)

[0084]

[0085]

인간 CD40에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 44(수탁번호 NM_001250) 및 서열
 번호 45에 제시된다:

TTTCCTGGGCGGGGCCAAGGCTGGGGCAGGGGAGTCAGCA
 GAGGCCTCGCTCGGGCGCCAGTGGTCCTGCCGCCTGGTCT
 CACCTCGCTATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGTGCGTCCTCTG
 GGGCTGCTTGCTGACCGCTGTCCATCCAGAACCCACTG
 CATGCAGAGAAAAACAGTACCTAATAAACAGTCAGTGCTG
 TTCTTTGTGCCAGCCAGGACAGAACTGGTGAGTGACTGC
 ACAGAGTTCACTGAAACGGAATGCCTTCCTTGCGGTGAAA
 GCGAATTCCTAGACACCTGGAACAGAGAGACACACTGCCA
 CCAGCACAAATACTGCGACCCCAACCTAGGGCTTCGGGTC
 CAGCAGAAAGGGCACCTCAGAAACAGACACCATCTGCACCT
 GTGAAGAAGGCTGGCACTGTACGAGTGAGGCCTGTGAGAG
 CTGTGTCCTGCACCGCTCATGCTCGCCCGGCTTTGGGGTCA
 AGCAGATTGCTACAGGGGTTTCTGATACCATCTGCGAGCCC
 TGCCCACTCGGCTTCTTCTCCAATGTGTATCTGCTTTCGA
 AAAATGTCAACCTTGACAAAGCTGTGAGACCAAGACCTG
 GTTGTGCAACAGGCAGGCACAAACAAGACTGATGTTGTCT
 GTGGTCCCCAGGATCGGCTGAGAGCCCTGGTGGTGATCCC
 CATCATCTTCGGGATCCTGTTTGCCATCCTCTTGGTGCTGGT
 CTTTATCAAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCC
 CCCCACCCCAAGCAGGAACCCAGGAGATCAATTTTCCCG
 ACGATCTTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTCCAGTGCAAGGAG
 ACTTTACATGGATGCCAACCGGTCACCCAGGAGGATGGCA
 AAGAGAGTCGCATCTCAGTGCAGGAGAGACAGTGAGGCTG
 CACCCACCCAGGAGTGTGGCCACGTGGGCAACAGGCAGT
 TGGCCAGAGAGCCTGGTGCTGCTGCTGCTGTGGCGTGAGG
 GTGAGGGGCTGGCACTGACTGGGCATAGCTCCCCGCTTCT
 GCCTGCACCCCTGCAGTTTGAGACAGGAGACCTGGCACTG
 GATGCAGAAACAGTTCACCTGAAGAACCTCTCACTTCACC
 CTGGAGCCCATCCAGTCTCCCAACTTGTATTAAGACAGA

[0086]

GGCAGAAAGTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGGATGGTTAGT
 AATATCCACCAGACCTCCGATCCAGCAGTTTGGTGCCCAG
 AGAGGCATCATGGTGGCTTCCCTGCGCCAGGAAGCCATA
 TACACAGATGCCCATTCAGCATTGTTTGTGATAGTGAACA
 ACTGGAAGCTGCTTAACTGTCCATCAGCAGGAGACTGGCT
 AAATAAAATTAGAATATATTTATACAACAGAATCTCAAAA
 ACACTGTTGAGTAAGGAAAAAAGGCATGCTGCTGAATGA
 TGGGTATGGAACCTTTTAAAAAAGTACATGCTTTTATGTAT
 GTATATTGCCTATGGATATATGTATAAATACAATATGCATC
 ATATATTGATATAACAAGGGTTCTGGAAGGGTACACAGAA
 AACCCACAGCTCGAAGAGTGGTGACGTCTGGGGTGGGGAA
 GAAGGGTCTGGGGG (서열번호 44)

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQ
 PGQKLVSDEFTETELPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCD
 PNLGLRVQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSP
 GFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETK
 DLVVQQAGTNKTDVVCQPQDRRLALVVIPIIFILFAILLVLVF
 IKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHG
 CQPVTQEDGKESRISVQERQ (서열번호 45)

[0087]

[0088] 인간 CD70에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 46(수탁번호 NM_001252) 및 서열번호 47에 제시된다:

CCAGAGAGGGGCAGGCTGGTCCCCTGACAGGTTGAAGCAA
GTAGACGCCCAGGAGCCCCGGGAGGGGGCTGCAGTTTCCT
TCCTTCCTTCTCGGCAGCGCTCCGCGCCCCCATCGCCCCCTC
CTGCGCTAGCGGAGGTGATCGCCGCGGCGATGCCGGAGGA
GGGTTCGGGCTGCTCGGTGCGGCGCAGGCCCTATGGGTGC
GTCCTGCGGGCTGCTTTGGTCCCATTTGGTCGCGGGCTTGGT
GATCTGCCTCGTGGTGTGCATCCAGCGCTTCGCACAGGCTC
AGCAGCAGCTGCCGCTCGAGTCACTTGGGTGGGACGTAGC
TGAGCTGCAGCTGAATCACACAGGACCTCAGCAGGACCCC
AGGCTATACTGGCAGGGGGGCCAGCACTGGGCCGCTCCT
TCCTGCATGGACCAGAGCTGGACAAGGGGCAGCTACGTAT
CCATCGTGATGGCATCTACATGGTACACATCCAGGTGACG
CTGGCCATCTGCTCCTCCACGACGGCCTCCAGGCACCACCC
CACCACCCTGGCCGTGGGAATCTGCTCTCCCGCCTCCCGTA

[0089]

GCATCAGCCTGCTGCGTCTCAGCTTCCACCAAGGTTGTACC
ATTGCCTCCCAGCGCCTGACGCCCCCTGGCCCCGAGGGGACA
CACTCTGCACCAACCTCACTGGGACACTTTTGCCTTCCCGA
AACTGATGAGACCTTCTTTGGAGTGCAGTGGGTGCGCC
CCTGACCACTGCTGCTGATTAGGGTTTTTTAAATTTTATTTT
ATTTTATTTAAGTTCAAGAGAAAAAGTGTACACACAGGGG
CCACCCGGGGTTGGGGTGGGAGTGTGGTGGGGGGTAGTGG
TGGCAGGACAAGAGAAGGCATTGAGCTTTTTCTTTCATTTT
CCTATTAAAAAATACAAAAATCA (서열번호 46)

MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFA
QAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALG
RSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHP
TTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCT
NLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP (서열번호 47)

[0090]

[0091] 인간 LIGHT에 대한 대표적인 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 48(수탁번호 CR541854) 및 서열번호 49에 제시된다:

ATGGAGGAGAGTGTCTACGGCCCTCAGTGTGTTGTGGTGG
ATGGACAGACCGACATCCCATTACGAGGCTGGGACGAAG
CCACCGGAGACAGTCTGTCAGTGTGGCCCGGGTGGGTCTG
GGTCTCTTGCTGTTGCTGATGGGGGCGGGCTGGCCGTCCA
AGGCTGGTTCCTCCTGCAGCTGCACTGGCGTCTAGGAGAG
ATGGTCACCCGCCTGCCTGACGGACCTGCAGGCTCCTGGG
AGCAGCTGATACAAGAGCGAAGGTCTACGAGGTCAACCC
AGCAGCGCATCTCACAGGGGCCAACTCCAGCTTGACCGGC
AGCGGGGGGGCCGCTGTTATGGGAGACTCAGCTGGGCCTGG
CCTTCCTGAGGGGCTCAGCTACCACGATGGGGCCCTTGTG
GTCACCAAAGCTGGCTACTACTACATCTACTCCAAGGTGCA
GCTGGGCGGTGTGGGCTGCCCCTGGGCCTGGCCAGCACC
ATCACCCACGGCCTCTACAAGCGCACACCCCGCTACCCCG
AGGAGCTGGAGCTGTTGGTCAGCCAGCAGTCACCTGCGG
ACGGGCCACAGCAGCTCCCGGTCTGGTGGGACAGCAGC
TTCCTGGGTGGTGTGGTACACCTGGAGGCTGGGGAGGAGG
TGGTCGTCCGTGTGCTGGATGAACGCCTGGTTCGACTGCGT
GATGGTACCCGGTCTTACTTCGGGGCTTTCATGGTGTGA

(서열번호 48)

MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGL
LLLLMGAGLAVQGWFLQLHWRLGEMVTRLPGDPAGSWEQ
LIQERRSHEVNPAHLTGANSSLTSGSGPLLWETQLGLAFLR
GLSYHDGALVVTKAGYIIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGL
YKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVH
LEAGEEVVRVLDERLVRLRDGTRS YFGAFMV (서열번호 49)

다양한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 서열, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 임의의 서열 (예를 들어, 서열번호 1 내지 13 및 38 내지 49)과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 61%, 또는 적어도 약 62%, 또는 적어도 약 63%, 또는 적어도 약 64%, 또는 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 66%, 또는 적어도 약 67%, 또는 적어도 약 68%, 또는 적어도 약 69%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 71%, 또는 적어도 약 72%, 또는 적어도 약 73%, 또는 적어도 약 74%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 76%, 또는 적어도 약 77%, 또는 적어도 약 78%, 또는 적어도 약 79%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 81%, 또는 적어도 약 82%, 또는 적어도 약 83%, 또는 적어도 약 84%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 86%, 또는 적어도 약 87%, 또는 적어도 약 88%, 또는 적어도 약 89%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 91%, 또는 적어도 약 92%, 또는 적어도 약 93%, 또는 적어도 약 94%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 96%, 또는 적어도 약 97%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%) 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 변이체를 제공한다.

다양한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 단백질 서열에 대해 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 제공한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 본 명세서에 기재된 바와 같은 보존적 또는 비보존적 치환, 삽입, 결실 및 절단으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

면역 관물 차단/ 종양 면역억제의 차단

일부 인간 종양은 환자의 면역계에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, 면역의 "면역 관문" 분자에 대해 표적화된 단클론성 항체의 투여는 완전한 반응 및 종양 관해를 야기할 수 있다. 이러한 항체의 작용 방식은 종양이 항종양 면역 반응으로부터의 보호로서 사용된 면역 조절 분자의 저해를 통한다. 이들 "면역 관문" 분자를 저해함으로써(예를 들어, 길항 항체에 의해), 환자의 CD8+ T 세포는 종양 세포를 증식 및 파괴하도록 허용될 수 있다.

예를 들어, 제한 없이, 예로서, CTLA-4 또는 PD-1에 표적화된 단클론성 항체의 투여는 완전한 반응 및 종양 관해를 야기할 수 있다. 이러한 항체의 작용 방식은 종양이 항종양 면역 반응으로부터의 보호로서 사용된 CTLA-4 또는 PD-1의 저해를 통한다. 이들 "면역 관문" 분자를 저해함으로써(예를 들어, 길항 항체에 의해), 환자의 CD8+ T 세포는 종양 세포를 증식 및 파괴하도록 허용될 수 있다.

- [0099] 따라서, 본 명세서에 제공된 벡터는 면역의 "면역 관문" 분자에 대해 표적화된 하나 이상의 차단 항체와의 조합에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 벡터는 분자, 예컨대 CTLA-4 또는 PD-1에 대해 표적화된 하나 이상의 차단 항체와 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 벡터는 PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2 및/또는 PD-1의 PD-L1 또는 PD-L2와의 결합을 차단, 감소 및/또는 저해하는 제제(비제한적 예로서, 니볼루맵 중 하나 이상(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, 오펜디보(OPDIVO), 브리스톨 마이어스 스쿼브(BRISTOL MYERS SQUIBB)), 캄브롤리주맵(KEYTRUDA, 머크사(Merck)), 피딜리주맵(CT-011, 큐어 테크(CURE TECH)), MK-3475(머크사), BMS 936559(브리스톨 마이어스 스쿼브), MPDL3280A(로슈(ROCHE)))와 병용하여 사용될 수 있다. 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 벡터는 CTLA-4의 활성 및/또는 CTLA-4의 하나 이상의 수용체(예를 들어, CD80, CD86, AP2M1, SHP-2 및 PPP2R5A)와의 결합을 차단, 감소 및/또는 저해하는 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 면역-조절제는 항체, 비제한적 예로서, 이필리무맵(MDX-010, MDX-101, 예르보이(Yervoy), BMS) 및/또는 트레멜리무맵(화이자사(Pfizer))이다. 이들 분자에 대한 차단 항체는, 예를 들어, 브리스톨 마이어스 스쿼브(뉴욕주 뉴욕에 소재), 머크사(뉴저지주 케닐워스에 소재), 메드이문(MedImmune)(메릴랜드주 게이더스버그에 소재), 및 화이자사(뉴욕주 뉴욕에 소재)로부터 얻을 수 있다.
- [0100] 추가로, 본 명세서에 제공된 벡터는 면역의 "면역 관문" 분자에 표적화된 하나 이상의 차단 항체, 예를 들어, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160(또한 BY55로서 언급됨), CGEN-15049, CHK 1 및 CHK2 키나제, A2aR, CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), GITR, GITRL, 갈렉틴-9, CD244, CD160, TIGIT, SIRP α, ICOS, CD172a 및 TMIGD2 및 다양한 B-7 패밀리의 리간드(B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 및 B7-H7을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)와 병용하여 사용될 수 있다.
- [0101] *벡터 및 숙주 세포*
- [0102] 이 문헌은 원핵 및 진핵 세포에서 발현될 수 있는 백신 단백질 융합 단백질(예를 들어, gp96-Ig 융합 단백질) 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 핵산 작제물을 제공한다. 예를 들어, 이 보고는 백신 단백질 융합(예를 들어, gp96-Ig 융합) 및 T 세포 공동자극 융합 단백질(예를 들어, OX40L-Ig 또는 OX40에 특이적으로 결합하는 이의 일부, ICOSL-Ig 또는 ICOS에 특이적으로 결합하는 이의 일부, 4-1BBL-Ig, 또는 4-1BB에 특이적으로 결합하는 이의 일부, CD40L-Ig, 또는 CD40에 특이적으로 결합하는 이의 일부, CD70-Ig, 또는 CD27에 특이적으로 결합하는 이의 일부, TL1A-Ig 또는 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 이의 일부, 또는 GITRL-Ig 또는 GITR에 특이적으로 결합하는 이의 일부)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 발현 벡터(예를 들어, DNA-또는 RNA-기반 벡터)를 제공한다. 추가로, 이 문헌은 본 명세서에 기재된 벡터의 제조 방법뿐만 아니라 암호화된 폴리펩타이드의 발현을 위해 적절한 숙주 세포 내로 벡터를 도입하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 본 명세서에 제공된 방법은 백신 단백질 융합 단백질(예를 들어, gp96-Ig 융합 단백질) 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 구성하는 단계, 융합 단백질을 암호화하는 서열을 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계를 포함한다. 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되거나 또는 바이러스 입자 내로 혼입될 수 있으며, 이 중 하나는, 예를 들어, 암 또는 감염을 치료하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, gp96-Ig 기반 백신은 유인원 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, C형 간염바이러스 및 말라리아에 의해 발현되는 개개 항원에 대한 항원 특이적 면역 반응을 자극하도록 생성될 수 있다. 이들 백신에 대한 면역 반응은 gp96-Ig 벡터에 의한 T 세포 공동자극 융합 단백질의 공동 발현을 통해 향상될 수 있다.
- [0103] 통상적인 DNA 클로닝 및 돌연변이유발 방법, DNA 증폭 방법, 및/또는 합성 방법을 이용하여 백신 단백질 융합(예를 들어, gp96-Ig 융합)을 암호화하는 cDNA 또는 DNA 서열 및 T 세포 공동자극 융합 단백질이 얻어질 수 있다(원한다면, 변형됨). 일반적으로, 백신 단백질 융합 단백질(예를 들어, gp96-Ig 융합 단백질) 및/또는 T 세포 공동자극 융합 단백질을 암호화하는 서열은 발현 전에 유전자 변형 및 복제 목적을 위해 클로닝 벡터 내로 삽입될 수 있다. 각각의 암호 서열은 시험관내 및 생체내 적합한 숙주 세포에서 암호화된 단백질을 발현시키는 목적을 위해 조절 요소, 예컨대 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0104] 발현 벡터는 분비된 백신 단백질(예를 들어, gp96-Ig) 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 생성하기 위해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 살아있는 세포 내로 핵산을 도입하기 위해 이용 가능한 다양한 기법이 있다. 시험관내 포유류 세포 내로 핵산을 전달하기에 적합한 기법은 리포좀의 사용, 전기천공법, 미세주입법, 세포 융합, 중합체-기반 시스템, DEAE-덱스트란, 바이러스 형질도입, 인산칼슘 침전 방법 등을 포함한다. 생체내 유전자 전달을 위해, 리포좀을 포함하는 다수의 기법 및 시약이 또한 사용될 수 있고; 천연 중합체-기반 전달 비히클, 예컨대 키토산 및 젤라틴; 바이러스 벡터는 또한 생체내 형질도입에 적합하다. 일부 상황에서, 세포 표면 막 단백질에 특이적인 표적화제, 예컨대 항체 또는 리간드를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 리포좀이 사용되는 경우에, 내포작용과 관련된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질은 표적화를 위해 그리고/또는, 예를 들어,

특정 세포 유형에 반응하는 캡시드 단백질 또는 이의 단편, 순환에서 내재화를 겪은 단백질에 대한 항체, 세포 내 국소화를 표적화하고, 세포내 반감기를 향상시키는 단백질의 흡수를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 수용체-매개 내포작용의 기법은, 예를 들어, 문헌[Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 및 Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)]에 의해 기재된다.

[0105] 적절하다면, 유전자 전달제, 예컨대, 통합 서열이 또한 사용될 수 있다. 수많은 통합 서열이 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Nunes-Duby *et al.*, Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005; Plasterk *et al.*, TIG 15:326-332, 1999; Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003] 참조). 이들은 재조합효소 및 트랜스포사제를 포함한다. 예는 Cre(Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), 람다(Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), FIp(Broach, *et al.*, Cell, 29:227-234, 1982), R(Matsuzaki, *et al.*, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31(예를 들어, 문헌[Groth *et al.*, J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004] 참조), 잠자는 미너, 선원 패밀리(mariner family) 트랜스포사제(Plasterk *et al.*, 상기 참조) 및 바이러스를 통합하기 위한 성분, 예컨대 AAV, 레트로바이러스, 및 바이러스 통합을 제공하는 성분을 갖는 항바이러스, 예컨대 레트로바이러스 또는 렌티바이러스의 LTR 서열 및 AAV의 ITR 서열(Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)을 포함한다.

[0106] 세포는, 예를 들어, 시험관내에서 배양되거나 또는 유전자 조작될 수 있다. 숙주 세포는 건강한 인간, 암 환자, 및 감염성 질환을 지니는 환자, 개인 실험실 기탁물, 공공 배양 수집물, 예컨대 미국 미생물 보존 센터(American Type Culture Collection), 또는 상업적 공급업자로부터를 포함하여, 정상 또는 병에 걸린 대상으로부터 얻을 수 있다.

[0107] 생체내에서 gp96-Ig 융합 단백질 및 T 세포 공동자극 융합 단백질의 생성 및 분비를 위해 사용될 수 있는 세포는, 제한 없이, 상피세포, 내피세포, 케라틴세포, 섬유아세포, 근육 세포, 간세포; 혈액 세포, 예컨대 T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거핵구 또는 과립구, 다양한 줄기 또는 전구 세포, 예컨대 조혈모세포 또는 전구 세포(예를 들어, 골수로부터 얻은 바와 같음), 제대혈, 말초 혈액, 태아간 등, 및 종양 세포(예를 들어, 인간 종양 세포)를 포함한다. 세포 유형의 선택은 치료 또는 예방 중인 종양 또는 감염성 질환의 유형에 의존하고, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0108] 상이한 숙주 세포는 번역후 가공 및 단백질의 변형을 위한 특징적 및 구체적 메커니즘을 가진다. 수용자가 그의 열 충격 단백질(hsp)을 가공하는 것과 유사한 특정 방식으로 발현된 유전자 산물을 변형 및 가공하는 숙주 세포가 선택될 수 있다. 다량의 gp96-Ig를 생성하는 목적을 위해, 숙주 세포의 유형은 이중성 유전자의 발현을 위해 사용되고, 합리적으로 잘 특성규명되며, 대규모 생산 공정을 위해 개발되는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 숙주 세포는 본 발명의 융합 단백질을 분비하는 본 발명의 융합 또는 재조합 세포가 후속적으로 투여되는 환자에 대해 자가이다.

[0109] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 발현 작제물은 항원 세포 내로 도입될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 항원 세포는, 예를 들어 암-유발 감염체, 예컨대 바이러스로 감염되지만, 아직 신생물이 아닌 종양전 세포, 또는 돌연변이원 또는 암-유발제, 예컨대 DNA-손상제 또는 방사선에 노출된 항원 세포를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 세포는 형태 또는 생리적 또는 생화학적 기능에 의해 특성 규명된 정상으로부터 신생물 형태로 전이 중인 종양전 세포이다.

[0110] 전형적으로, 본 명세서에서 제공되는 방법에서 사용되는 암세포 및 종양전 세포는 포유류 유래이다. 상정된 포유류는 인간, 반려 동물(예를 들어, 개 및 고양이), 가축 동물(예를 들어, 양, 소, 염소, 돼지 및 말), 실험 동물(예를 들어, 마우스, 래트 및 토끼), 및 감금된 또는 자유로운 야생 동물을 포함한다.

[0111] 일부 실시형태에서, 암세포(예를 들어, 인간 종양 세포)는 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 암세포는 발현된 gp96-Ig 융합 단백질과 비공유적으로 관련되는 항원 펩타이드를 제공한다. 종양전 병원, 암조직 또는 암세포로부터 유래된 세포주가 또한 사용될 수 있으며, 단, 세포주의 세포는 표적 암세포에 대한 항원과 공통으로 적어도 하나 이상의 항원 결정소를 가진다. 암조직, 암세포, 암-유발제로 감염된 세포, 다른 종양전 세포 및 인간 유래의 세포주가 사용될 수 있다. 동종이계 세포가 또한 사용될 수 있지만, 궁극적으로는 융합 단백질이 궁극적으로 투여될 환자로부터 절제된 암세포가 특히 유용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암세포는 확립된 종양 세포주, 예컨대 제한 없이, 확립된 비소세포 폐암종(NSCLC), 방광암, 흑색종, 난소암, 신세포 암종, 전립선 암종, 육종, 유방 암종, 편평세포 암종, 두경부 암종, 간세포 암종, 췌장 암종 또는 결장 암종 세포주로부터 유래될 수 있다.

- [0112] 다양한 실시형태에서, 본 발명의 융합 단백질은 공동자극 T 세포와 다양한 종양 세포 항원의 제시를 둘 다 허용한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 발명의 백신 단백질 융합(예를 들어, gp96 융합)은 이들 다양한 종양 항원을 샤프론화한다. 다양한 실시형태에서, 종양 세포는 다양한 항원을 분비한다. 예시적이지만, 비제한적인, 분비될 수 있는 항원은 다음과 같다: MART-1/Melan-A, gp100, 다이캡티딜 펩티다제 IV(DPP-IV), 아데노신 탈아미노효소-결합 단백질(ADAbp), 사이클로필린 b, 결합조직 관련 항원(CRC)-0017-1A/GA733, 암배아 항원(CEA) 및 이의 면역원성 에피토프 CAP-1 및 CAP-2, etv6, aml1, 전립선 특이적 항원(PSA) 및 이의 면역원성 에피토프 PSA-1, PSA-2 및 PSA-3, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), T-세포 수용체/CD3-제타쇄, 종양 항원의 MAGE-패밀리(예를 들어, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), 종양 항원의 GAGE-패밀리(예를 들어, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 타이로시나제, p53, MUC 패밀리, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -태아단백질, E-카데린, α -카테닌, β -카테닌 및 γ -카테닌, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 대장 선종종 단백질(APC), 포도린, 코넥신 37, Ig-이디오프, p15, gp75, GM2 및 GD2 ganglioside, 바이러스 산물, 예컨대 인유두종 바이러스 단백질, 종양 항원의 Smad 패밀리, Imp-1, NA, EBV-암호화된 핵 항원(EBNA)-1, 뇌 글리코겐 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 CT-7, c-erbB-2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD56, CD70, CD74, CD138, AGS16, MUC1, GPNMB, Ep-CAM, PD-L1, PD-L2, PMSA, 방광암 항원, 예컨대 ACTL8, ADAM22, ADAM23, ATAD2, ATAD2B, BIRC5, CASC5, CEP290, CEP55, CTAGE5, DCAF12, DDX5, FAM133A, IL13RA2, IMP3, KIAA0100, MAGEA11, MAGEA3, MAGEA6, MPHOSPH10, ODF2, ODF2L, OIP5, PBK, RQCD1, SPAG1, SPAG4, SPAG9, TMEFF1, TTK, 및 전립선암 항원, 예컨대 PRAME, BIRC5, CEP55, ATAD2, ODF2, KIAA0100, SPAG9, GPATCH2, ATAD2B, CEP290, SPAG1, ODF2L, CTAGE5, DDX5, DCAF12, IMP3. 일부 실시형태에서, 항원은 인간 내인성 레트로바이러스 항원이다. 예시적인 항원은 또한 Gag의 적어도 일부로부터 유래된 에피토프, Tat의 적어도 일부, Rev의 적어도 일부, Nef의 적어도 일부, 및 gp160의 적어도 일부를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 인간 내인성 레트로바이러스로부터의 항원을 포함할 수 있다.
- [0113] 추가로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 백신 단백질 융합(예를 들어, gp96 융합)은 추가로 본 명세서에 기재된 다양한 방법에서 사용될 때 환자의 면역계가 관심 대상의 질환에 대해 활성화되도록 하는 애주버트 효과를 제공한다.
- [0114] 원핵 벡터와 진핵 벡터는 둘 다 본 명세서에 제공된 방법에서 백신 단백질(예를 들어, gp96-Ig) 및 T 세포 공동자극 융합 단백질의 발현을 위해 사용될 수 있다. 원핵세포 벡터는 이콜라이(*E. coli*) 서열에 기반한 작제물을 포함한다(예를 들어, 문헌[Makrides, *Microbiol Rev* 1996, 60:512-538] 참조). 이콜라이에서 발현을 위해 사용될 수 있는 조절 영역의 비제한적 예는 lac, trp, lpp, phoA, recA, tac, T3, T7 및 λ P_L를 포함한다. 원핵생물 발현 벡터의 비제한적 예는 λ gt 벡터 시리즈, 예컨대 λ gt11(Huynh *et al.*, "DNA Cloning Techniques, Vol. I: A Practical Approach," 1984, (D. Glover, ed.), pp. 49-78, IRL Press, Oxford), 및 pET 벡터 시리즈(Studier *et al.*, *Methods Enzymol* 1990, 185:60-89)를 포함할 수 있다. 그러나, 원핵생물 숙주 벡터 시스템은 포유류 세포의 다수의 번역후 가공을 수행할 수 없다. 따라서, 진핵생물 숙주 벡터 시스템이 특히 유용할 수 있다.
- [0115] 다양한 조절 영역은 포유류 숙주 세포 내 백신 단백질(예를 들어, gp96-Ig) 및 T 세포 공동자극 융합의 발현을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, SV40 초기 및 후기 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 급속 초기 프로모터, 및 라우스(Rous) 육종 바이러스 길이 말단 반복부(RSV-LTR) 프로모터가 사용될 수 있다. 포유류 세포에서 유용할 수 있는 유도성 프로모터는 메탈로티오네인 II 유전자와 관련된 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 글루코코르티코이드 반응성 길이 말단 반복부(MMTV-LTR), β -인터페론 유전자, 및 hsp70 유전자(문헌[Williams *et al.*, *Cancer Res* 1989, 49:2735-42; 및 Taylor *et al.*, *Mol Cell Biol* 1990, 10:165-75] 참조)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 열충격 프로모터 또는 스트레스 프로모터는 또한 재조합 숙주 세포에서 융합 단백질의 발현을 유도하는 데 유리할 수 있다.
- [0116] 실시형태에서, 본 발명은 신호에 반응하여 일시적으로 고수준의 발현을 달성할 수 있는 유도성 프로모터의 사용을 상정한다. 예시적인 유도성 발현 제어 영역은 소분자 화학 화합물과 같은 신호를 이용하여 자극되는 유도성 프로모터를 포함하는 것을 포함한다. 특정 예는, 예를 들어, 미국 특허 제5,989,910호, 제5,935,934호, 제6,015,709호 및 제6,004,941호에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

- [0117] 조직 특이성을 나타내고, 유전자 이식 동물에서 시용된 동물 조절 영역은 또한 특정 조직 유형의 종양 세포에서 사용될 수 있다: 췌장 소포 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 제어 영역(Swift *et al.*, *Cell* 1984, 38:639-646; Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986, 50:399-409; 및 MacDonald, *Hepatology* 1987, 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 제어 영역(Hanahan, *Nature* 1985, 315:115-122), 림프구 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 제어 영역(Grosschedl *et al.*, *Cell* 1984, 38:647-658; Adames *et al.*, *Nature* 1985, 318:533-538; 및 Alexander *et al.*, *Mol Cell Biol* 1987, 7:1436-1444), 고환, 유방, 림프구 및 비만세포에서 활성인 마우스 유방 종양 바이러스 제어 영역(Leder *et al.*, *Cell* 1986, 45:485-495), 간에서 활성인 알부민 유전자 제어 영역(Pinkert *et al.*, *Genes Devel*, 1987, 1:268-276), 간에서 활성인 알파-태아단백질 유전자 제어 영역(Krumlauf *et al.*, *Mol Cell Biol* 1985, 5:1639-1648; 및 Hammer *et al.*, *Science* 1987, 235:53-58); 간에서 활성인 알파 1-항트립신 유전자 제어 영역(Kelsey *et al.*, *Genes Devel* 1987, 1:161-171), 골수성 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 제어 영역(Mogam *et al.*, *Nature* 1985, 315:338-340; 및 Kollias *et al.*, *Cell* 1986, 46:89-94); 뇌의 회소돌기신경교 세포에서 활성인 마이엘린 염기성 단백질 유전자 제어 영역(Readhead *et al.*, *Cell* 1987, 48:703-712); 골격근에서 활성인 마이오신 경쇄-2 유전자 제어 영역(Sani, *Nature* 1985, 314:283-286), 및 시상하부에서 활성인 성선 자극 방출 호르몬 유전자 제어 영역(Mason *et al.*, *Science* 1986, 234:1372-1378).
- [0118] 발현 벡터는 또한 전사 인핸서 요소, 예컨대 SV40 바이러스, B형 간염 바이러스, 거대세포 바이러스, 면역글로불린 유전자, 메탈로티오네인 및 β -액틴에서 발견되는 것을 포함할 수 있다(문헌[Bittner *et al.*, *Meth Enzymol* 1987, 153:516-544; 및 Gorman, *Curr Op Biotechnol* 1990, 1:36-47] 참조). 추가로, 발현 벡터는 숙주 세포의 하나 초과와 유형에서 벡터의 유지 및 복제 또는 숙주 염색체 내로 벡터 통합을 허용하는 서열을 함유할 수 있다. 이러한 서열은 복제기점, 복제기점 염기순서(ARS), 동원체 DNA 및 텔로미어 DNA를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0119] 추가로, 발현 벡터는 본 명세서에 기재된 바와 같은 DNA 암호화 융합 단백질을 함유하는 숙주 세포를 처음에 단리, 동정 또는 추적하기 위한 하나 이상의 선택 가능한 또는 선별 가능한 마커 유전자를 함유할 수 있다. gp96-Ig 및 T 세포 공동자극 융합 단백질의 장기간, 고수율 생성을 위해, 포유류 세포에서 안정한 발현이 유용할 수 있다. 다수의 선택 시스템이 포유류 세포에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(Wigler *et al.*, *Cell* 1977, 11:223), 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Szybalski and Szybalski, *Proc Natl Acad Sci USA* 1962, 48:2026), 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy *et al.*, *Cell* 1980, 22:817) 유전자는 각각 tk⁻, hgp⁻ 또는 aprt⁻ 세포에서 사용될 수 있다. 추가로, 대사길항물질 내성은 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 다이하이드로엽산환원효소(dhfr)(Wigler *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:3567; O'Hare *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:1527); 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt(Mulligan and Berg, *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:2072); 아미노글리코사이드 G-418에 대한 내성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(neo)(Colberre-Garapin *et al.*, *J Mol Biol* 1981, 150:1); 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hyg)(Santerre *et al.*, *Gene* 1984, 30:147)에 대한 선택에 기반하여 사용될 수 있다. 다른 선택 가능한 마커, 예컨대 히스티딘올 및 제오신(Zeocin)(상표명)이 또한 사용될 수 있다.
- [0120] 유용한 포유류 숙주 세포는 인간, 원숭이 및 설치류로부터 유래된 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다(예를 들어, 문헌[Kriegler, "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual," 1990, New York, Freeman & Co.] 참조). 이들은 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 세포주(예를 들어, COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계통(예를 들어, 현탁 배양물 중에서 성장을 위해 서브클로닝된 293, 293-EBNA 또는 293 세포, Graham *et al.*, *J Gen Virol* 1977, 36:59); 새끼 햄스터 신장 세포(예를 들어, BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소-세포-DHFR (예를 들어, CHO, Urlaub and Chasin, *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:4216); 마우스 세르톨리 세포(Mather, *Biol Reprod* 1980, 23:243-251); 마우스 섬유아세포(예를 들어, NIH-3T3), 원숭이 신장 세포(예를 들어, CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포. (예를 들어, VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(예를 들어, HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(예를 들어, MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간세포(예를 들어, BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포(예를 들어, W138, ATCC CCL 75); 인간 간세포(예를 들어, Hep G2, HB 8065); 및 마우스 유방 종양 세포(예를 들어, MMT 060562, ATCC CCL51)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 발현시키기 위한 예시적인 암세포 유형은 마우스 섬유아세포 세포주, NIH3T3, 마우스 루이스(Lewis) 폐암종 세포주, LLC, 마우스 비만세포종 세포주, P815, 마우스 림프종 세포주, EL4 및 이의 오프알부민 형질감염체, E.G7, 마우스 흑색종 세포주, B16F10, 마우스 섬유육종 세포주, MC57, 인

간 소세포 폐암종 세포주, SCLC#2 및 SCLC#7, 인간 폐선암종 세포주, 예를 들어, AD100, 및 인간 전립선암 세포주, 예를 들어, PC-3을 포함한다.

[0121] 다수의 바이러스 기반 발현 시스템은 또한 gp96-Ig 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 생성하기 위해 포유류 세포와 함께 사용될 수 있다. DNA 바이러스 벡본을 이용하는 벡터는 유인원 바이러스 40(SV40)(Hamer *et al.*, *Cell* 1979, 17:725), 아데노바이러스(Van Doren *et al.*, *Mol Cell Biol* 1984, 4:1653), 아데노-관련 바이러스(McLaughlin *et al.*, *J Virol* 1988, 62:1963), 및 소유두종 바이러스(Zinn *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:4897)로부터 유래되었다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용될 때, 공여체 DNA 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 3부 리더 서열에 결합될 수 있다. 이어서, 이 융합 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)에서의 삽입은 살아있고, 감염 숙주에서 이중성 산물을 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 초래할 수 있다. (예를 들어, 문헌[Logan and Shenk, *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:3655-3659] 참조).

[0122] 소유두종바이러스(BPV)는 에피솜으로서 사람, 및 그의 DNA 복제물을 포함하는 다수의 고등 척추동물을 감염시킬 수 있다. 다수의 서틀 벡터는 포유류 세포에서 안정한, 다중복제물(20 내지 300개 복제물/세포) 염색체외 요소로서 존재하는 재조합 유전자 발현을 위해 개발되었다. 전형적으로, 이들 벡터는 BPV DNA의 세그먼트(전체 게놈 또는 69% 형질전환 단편), 넓은 숙주 범위를 갖는 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 스플라이스 신호, 선택 가능한 마커 및 벡터가 이콜라이에서 증식되도록 허용하는 "독이 없는" 플라스미드 서열을 함유한다. 박테리아에서의 구성 및 증식 후에, 발현 유전자 작제물은, 예를 들어 인산 칼슘 공침에 의해 배양된 포유류 세포내로 형질감염된다. 형질전환된 표현형을 나타내지 않는 해당 숙주 세포에 대해, 형질전환체의 선택은 우세한 선택 가능한 마커, 예컨대 히스티딘올 및 G418 내성의 사용에 의해 달성된다.

[0123] 대안적으로, 백시니아 7.5K 프로모터가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Mackett *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:7415-7419; Mackett *et al.*, *J Virol* 1984, 49:857-864; 및 Panicali *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:4927-4931] 참조). 인간 숙주 세포가 사용되는 경우에, 엡스타인-바르 바이러스(EBV) 기점(oriP) 및 EBV 핵 항원 1(EBNA-1; 트랜스-작용 복제 인자)에 기반한 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 넓은 범위의 인간 숙주 세포, 예를 들어, EBO-pCD(Spickofsky *et al.*, *DNA Prot Eng Tech* 1990, 2:14-18); pDR2 및 λDR2(클론테크 래버러토리즈(Clontech Laboratories)로부터 입수 가능)와 함께 사용될 수 있다.

[0124] Gp96-Ig 및 T 세포 공동자극 융합 단백질은 또한 레트로바이러스-기반 발현 시스템으로 이루어질 수 있다. 레트로바이러스, 예컨대 몰로니 뮤린(Moloney murine) 백혈병 바이러스가 사용될 수 있는데, 대부분의 바이러스 유전자 서열이 제거되고, 외인성 암호 서열로 대체될 수 있는 반면, 상실된 바이러스 기능에 수송 중에 공급될 수 있기 때문이다. 형질감염과 대조적으로, 레트로바이러스는, 예를 들어, 1차 조혈 세포를 포함하는 넓은 범위의 세포 유형에 효율적으로 감염시키고 유전자를 전달할 수 있다. 게다가, 레트로바이러스 벡터에 의한 감염을 위한 숙주 범위는 벡터 패키징을 위해 사용되는 외피의 선택에 의해 조작될 수 있다.

[0125] 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 5' 길이 말단 반복부(LTR), 3' LTR, 패키징 신호, 박테리아의 복제기점 및 선택 가능한 마커를 포함할 수 있다. gp96-Ig 융합 단백질 암호 서열은, 예를 들어, 5' LTR 프로모터로부터의 전사가 클로닝된 DNA를 전사하도록 5' LTR과 3' LTR 사이의 위치에 삽입될 수 있다. 5' LTR은 해당 순서로 프로모터(예를 들어, LTR 프로모터), R 영역, U5 영역 및 프라이머 결합 부위를 함유한다. 이들 LTR 요소의 뉴클레오타이드 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다. 이중성 프로모터뿐만 아니라 다약물 선택 마커는 또한 감염된 세포의 선택을 용이하게 하기 위해 발현 벡터에 포함될 수 있다. 문헌[McLaughlin *et al.*, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990, 38:91-135; Morgenstern *et al.*, *Nucleic Acid Res* 1990, 18:3587-3596; Chouluka *et al.*, *J Virol* 1996, 70:1792-1798; Boesen *et al.*, *Biotherapy* 1994, 6:291-302; Salmons and Gunzberg, *Human Gene Ther* 1993, 4:129-141; 및 Grossman and Wilson, *Curr Opin Genet Devel* 1993, 3:110-114] 참조.

[0126] 본 명세서에 기재된 임의의 클로닝 및 발현 벡터는 합성되고, 당업계에 공지된 기법을 이용하여 공지된 DNA 서열로부터 조립될 수 있다. 조절 영역 및 인핸서 요소는 천연과 합성 둘 다의 다양한 기점을 가질 수 있다. 일부 벡터 및 숙주 세포는 상업적으로 얻어질 수 있다. 유용한 벡터의 비제한적 예는 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, 1988, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience의 부록 5]; 및 상업적 공급업자, 예컨대 클론테크 래버러토리즈(Clontech Laboratories), 스트라타젠 인코포레이티드(Stratagene Inc.) 및 인비트로젠 인코포레이티드(Invitrogen, Inc.)의 카탈로그에 기재되어 있다.

- [0127] 치료 방법
- [0128] 본 명세서에 제공된 바와 같은 발현 벡터는 대상체에 대한 투여를 위해 조성물 내로 혼입될 수 있다(예를 들어, 암 또는 감염과 같은 임상 병태를 갖는 연구 동물 또는 포유류, 예컨대 인간). 예를 들어, 발현 벡터는 암 또는 감염의 치료를 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 이 보고는 본 명세서에 제공된 발현 벡터를 이용하여 암 또는 감염과 같은 임상 병태를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 감염은, 예를 들어, 급성 감염 또는 만성 감염일 수 있다. 일부 실시형태에서, 감염은 C형 간염바이러스, B형 간염바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 또는 말라리아에 의한 감염일 수 있다. 상기 방법은 대상체에서 임상 병태의 진행 또는 증상이 치료적 방식으로 감소되는 조건 하에서 대상체에게 발현 벡터, 발현 벡터를 함유하는 세포 또는 발현 벡터를 함유하는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0129] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 암 및/또는 종양; 예를 들어, 암 및/또는 종양의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 암 또는 종양은 신체 기관 및 시스템의 정상 기능을 방해하는 세포의 제어되지 않은 성장 및/또는 비정상적인 증가된 세포 생존 및/또는 세포자멸사의 저해를 지칭한다. 양성 및 악성 암, 폴립, 과다형성뿐만 아니라 휴면기 종양 또는 미소 전이가 포함된다. 또한, 면역계(예를 들어, 바이러스 감염 세포)에 의해 방해되지 않는 비정상 증식을 갖는 세포가 포함된다. 암은 원발암 또는 전이암일 수 있다. 원발암은 임상적으로 검출 가능하게 되는 본래의 부위에서의 암세포 영역일 수 있고, 원발성 종양일 수 있다. 대조적으로, 전이암은 하나의 기관 또는 부분으로부터 다른 비인접 기관 또는 부분까지의 질환의 퍼짐일 수 있다. 전이암은 국소 영역에서 정상 조직 주위로 침투 및 침윤하는 능력을 획득한 암세포에 의해 야기되어, 국소 전이일 수 있는 새로운 종양을 형성할 수 있다. 암은 또한 림프액 및/또는 혈관 벽을 침투하는 능력을 획득한 암세포에 의해 야기될 수 있고, 이후에 암세포는 신체 내 다른 부위 및 조직에 혈류를 통해 순환할 수 있다(이에 의해 순환 종양 세포가 됨). 암은 림프액 또는 혈행성 퍼짐과 같은 과정에 기인할 수 있다. 암은 또한 다른 부위에서 중단되는 종양 세포에 의해 야기되고, 혈관 또는 벽을 통해 재침투하며, 증식을 계속하고, 종국적으로 다른 임상적으로 검출 가능한 종양을 형성할 수 있다. 암은 전이성(또는 2차) 종양일 수 있는 이런 새로운 종양일 수 있다.
- [0130] 암은 2차 또는 전이 종양일 수 있는 전이된 종양 세포에 의해 야기될 수 있다. 종양 세포는 본래 종양과 같을 수 있다. 예로서, 유방암 또는 결장암이 간에 전이된다면, 2차 종양은 간에 존재하지만, 비정상 간세포가 아닌 비정상 유방 또는 결장 세포로 구성된다. 따라서 간의 종양은 전이성 유방암 또는 전이성 결장암(간암이 아님)일 수 있다.
- [0131] 암은 임의의 조직으로부터의 기점을 가질 수 있다. 암은 흑색종, 결장, 유방 또는 전립선으로부터 유래될 수 있고, 따라서 본래 각각 피부, 결장, 유방 또는 전립선인 세포로 구성될 수 있다. 암은 또한 림프종일 수 있는 혈액학적 악성종양일 수 있다. 암은 조직, 예컨대 간, 폐, 방광 또는 장을 침윤할 수 있다.
- [0132] 치료될 수 있는 예시적인 암은 암종(예를 들어, 다양한 하위유형, 예를 들어, 선암종, 기저 세포 암종, 편평세포 암종, 및 이행 세포 암종을 포함), 육종 (예를 들어, 뼈 및 연조직을 포함), 백혈병(예를 들어, 급성 골수성, 급성 림프아구성, 만성 골수성, 만성 림프구성 및 모발세포를 포함), 림프종 및 골수종(예를 들어, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 경쇄, 비분비, MGUS 및 형질세포종을 포함), 및 중추 신경계암(예를 들어, 뇌(예를 들어, 신경교종(예를 들어, 성상세포종, 핍지교종 및 상의세포종), 뇌수막종, 뇌하수체 선종, 및 신경종, 및 척수 종양(예를 들어, 수막종 및 신경섬유종)을 포함)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0133] 본 발명의 대표적인 암 및/또는 종양은 기저세포 암종, 담도암; 방광암; 뼈암; 뇌 및 중추 신경계암; 유방암; 배막암; 자궁경부암; 융모암종; 결장 및 직장암; 결합조직암; 소화기 계통의 암; 자궁내막암; 식도암; 눈암; 두경부암; 위암(위장암을 포함); 교모세포종; 간암종; 간세포암; 상피내 신생물; 신장 또는 신암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암(예를 들어, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종); 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(입술, 혀, 입 및 인두); 난소암; 췌장암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡계의 암; 침샘 암종; 육종; 피부암; 편평세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁내막암; 비뇨기계의 암; 음문암; 호지킨 및 비호지킨 림프종뿐만 아니라 B-세포 림프종을 포함하는 림프종(저등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL)을 포함; 소 림프구성(SL) NHL; 중간 등급/여포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 작은 비절단 세포 NHL; 거대 종양 NHL; 맨틀세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발렌스트롬 마크로글로불린혈증; 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 모발세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병;뿐만 아니라 다른 암종 및 육종; 및 이식후 림프증식증 장애(PTLD)뿐만 아니라 모반증과 관련된 비정상 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌 종양과 관련된 것) 및 메이그스 증후군을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0134] 일부 양상에서, 본 융합은 세포내 병원균을 제거하기 위해 사용된다. 일부 양상에서, 본 융합은 하나 이상의 감염을 치료하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 본 융합 단백질은 바이러스 감염(예를 들어, HIV 및 HCV를 포함), 기생충 감염(예를 들어, 말라리아를 포함), 및 박테리아 감염을 치료하는 방법에서 사용된다. 다양한 실시형태에서, 감염은 면역억제를 유도한다. 예를 들어, HIV 감염은 종종 감염된 대상체에서 면역억제를 초래한다. 따라서, 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 이러한 감염의 치료는, 다양한 실시형태에서, 본 융합 단백질을 이용하여 면역계를 조절하여 면역 저해 이상으로 면역 자극을 촉진하는 것을 수반할 수 있다. 대안적으로, 본 발명은 면역활성화를 유도하는 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 장 연충 감염은 만성 면역 활성화와 관련되었다. 이들 실시형태에서, 이러한 감염의 치료는 본 융합 단백질을 이용하여 면역계를 조절하여 면역 자극 이상으로 면역 저해를 촉진하는 것을 수반할 수 있다.
- [0135] 다양한 실시형태에서, 본 발명은, 예를 들어 호흡관의, 급성 또는 만성 바이러스 감염, 유두종 바이러스 감염, 단순포진 바이러스(HSV) 감염, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염, 및 내부 기관의 바이러스 감염, 예컨대 간염 바이러스에 의한 감염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 감염은 플라비비리대(Flaviviridae) 과의 바이러스에 의해 야기된다. 일부 실시형태에서, 플라비비리대과의 바이러스는 황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트루이스 뇌막염 바이러스 및 C형 간염 바이러스로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 피코르나비리대(Picornaviridae) 과의 바이러스, 예를 들어, 폴리오바이러스, 리노바이러스, 콕사키바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 오쏘믹소비리대(Orthomyxoviridae)의 구성원, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 레트로비리대(Retroviridae)의 구성원, 예를 들어, 렌티바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 파라믹소비리대(Paramyxoviridae)의 구성원, 예를 들어, 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 파라인플루엔자 바이러스, 루볼라바이러스(예를 들어, 뎀프스 바이러스), 홍역 바이러스 및 인간 메타뉴모바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 부니아바이러스과(Bunyaviridae)의 구성원, 예를 들어, 한타바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 레오비리대(Reoviridae)의 구성원, 예를 들어 로타바이러스에 의해 야기된다.
- [0136] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 기생충 감염, 예컨대 원생동물 또는 유충 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 기생충 감염은 원생동물 기생충에 의한 감염이다. 일부 실시형태에서, 오리티지아(Oritizab) 기생충은 소화관 기생충, 조직 원생 원생동물 또는 혈액 원생동물로부터 선택된다. 예시적인 원생동물 기생충은 이질아메바(*Entamoeba histolytica*), 람블편모충(*Giardia lamblia*), 크립토스포리듐 뮤리스(*Cryptosporidium muris*), 트립파노소마티다 감비엔스(*Trypanosomatida gambiense*), 트립파노소마티다 로데시엔스(*Trypanosomatida rhodesiense*), 트립파노소마티다 크루시(*Trypanosomatida cruzi*), 리슈마니아 멕시카나(*Leishmania mexicana*), 리슈마니아 브라질리엔시스(*Leishmania braziliensis*), 리슈마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 리슈마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 톡소플라즈마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모듐 오발(*Plasmodium ovale*), 플라스모듐 말라리아(*Plasmodium malariae*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*) 및 히스토모나스 멜레아그리디스(*Histomonas meleagridis*)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 기생충 감염은 구충제 기생충, 예컨대 선충(예를 들어, 쌍기충강)에 의한 감염이다. 일부 실시형태에서, 기생충은 쌍선충강(Secementea)(예를 들어, 편충(*Trichuris trichiura*), 회충(*Ascaris lumbricoides*), 요충(*Enterobius vermicularis*), 두비니구충(*Ancylostoma duodenale*), 아메리카 구충(*Necator americanus*), 분선충(*Strongyloides stercoralis*), 반크로프트 사상충(*Wuchereria bancrofti*), 용선충(*Dracunculus medinensis*)으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 기생충은 흡충(예를 들어, 주혈흡충, 간흡충, 장흡충류 및 폐흡충)으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 기생충은 다음으로부터 선택된다: 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*), 빌하르츠 주혈흡충(*Schistosoma haematobium*), 일본주혈흡충(*Schistosoma japonicum*), 간충(*Fasciola hepatica*), 거대간질(*Fasciola gigantica*), 유해이형흡충, 폐흡충. 일부 실시형태에서, 기생충은 촌충류(예를 들어, 갈고리촌충(*Taenia solium*), 무구조충(*Taenia saginata*), 소형조충, 단방조충(*Echinococcus granulosus*))로부터 선택된다.
- [0137] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 박테리아 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시형태에서, 박테리아 감염은 그람양성 박테리아, 그람음성 박테리아, 호기성 및/또는 혐기성 박테리아에 의한 감염이다. 다양한 실시형태에서, 박테리아는 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 사르시나(*Sarcina*), 에스케리키아(*Escherichia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 클렙시엘라

(*Klebsiella*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 프로테우스(*Proteus*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 시트로박터(*Citrobacter*), 네이세리아(*Nisseria*), 바실러스(*Bacillus*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 펩토코커스(*Peptococcus*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 세라티아(*Serratia*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 브뤼셀라(*Brucella*) 및 다른 유기체로부터 선택되지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 박테리아는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 아시도보란스(*Pseudomonas acidovorans*), 슈도모나스 알칼리케네스(*Pseudomonas alcaligenes*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 아에로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophilia*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 파라티피(*Salmonella paratyphi*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 쉬겔라 디센테리아(*Shigella dysenteriae*), 쉬겔리 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 쉬겔라 손네이(*Shigella sonnei*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 세라티아 마르센스(*Serratia marcescens*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로비덴시아 알칼리파시엔스(*Providencia alcalifaciens*), 프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*), 프로비덴시아 스투아르티(*Providencia stuartii*), 아시네토박터 바우만니(*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 헤몰리티쿠스(*Acinetobacter haemolyticus*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 예르시니아 슈도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 예르시니아 인터메디아(*Yersinia intermedia*), 보르데텔라 퍼투스(*Bordetella pertussis*), 보르데텔라 파라퍼투스(*Bordetella parapertussis*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 헤모필루스 헤몰리티쿠스(*Haemophilus haemolyticus*), 헤모필루스 파라헤몰리티쿠스(*Haemophilus parahaemolyticus*), 헤모필루스 두크레이(*Haemophilus ducreyi*), 파스퇴렐라 톨토시다(*Pasteurella multocida*), 파스퇴렐라 헤몰리티카(*Pasteurella haemolytica*), 브란하멜라 카타랄리스(*Branhamella catarrhalis*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 캄필로박터 페투스(*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 보렐리아 부르도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 네이세리아 고노로이애(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 킨겔라 모락셀라(*Kingella, Moraxella*), 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*), 박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*), 박테로이데스 디스타소니스(*Bacteroides distasonis*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 3452A 상동체 그룹, 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 박테로이데스 오발루스(*Bacteroides ovalus*), 박테로이데스 테타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*), 박테로이데스 유니포미스(*Bacteroides uniformis*), 박테로이데스 에거티(*Bacteroides eggerthii*), 박테로이데스 스플란츠니쿠스(*Bacteroides splanchnicus*), 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*), 마이코박테륨 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테륨 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테륨 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테륨 레프래(*Mycobacterium leprae*), 코리네박테륨 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테륨 울세란스(*Corynebacterium ulcerans*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 아갈락티애(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스탕필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스탕필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스탕필로코커스 하이쿠스 아종 하이쿠스(*Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*), 스탕필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스탕필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 또는 스탕필로코커스 사카롤리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*)로부터 선택되지만, 이들로 제한되지 않는다. 투여될 발현 벡터(들), 세포 또는 입자는 다른 분자, 분자 구조 또는 화합물의 혼합물, 예를 들어, 리포솜, 수용체 또는 세포 표적화 분자, 또는 경구 국소 또는 섭취, 분포 및/또는 흡수를 보조하기 위한 다른 제형과 혼합, 캡슐화, 컨쥬게이팅 또는 달리 관련될 수 있다. 일부 경우에, 발현 벡터는 대상체에 투여된 세포 내에 함유되거나 또는 바이러

스 또는 바이러스 유사 입자 내에 함유될 수 있다. 투여될 벡터, 세포 또는 입자는 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합될 수 있다.

[0138] 따라서 이 보고는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 분비된 gp96-Ig 융합 폴리펩타이드 및 T 세포 공동자극 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터를 함유하는 벡터 또는 종양 세포 또는 바이러스 입자를 생리적 및 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 함유하는 조성물을 제공한다. 생리적 및 약제학적으로 허용 가능한 담체는 면역화를 위해 유용한 임의의 잘 공지된 성분을 포함할 수 있다. 담체는 백신 중에 투여된 항체에 대한 면역 반응을 용이하게 하거나 또는 향상시킬 수 있다. 세포 제형은 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 조성물 중에서 개체에 대해 항원을 제시하는 바람직한 pH 범위, 염 또는 다른 성분을 유지하기 위해 완충제를 함유할 수 있다. 생리적으로 허용 가능한 담체는 또한 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 하나 이상의 애주번트를 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는, 예를 들어, 약제학적으로 허용 가능한 용매, 현탁제 또는 대상체에 화합물을 전달하기 위한 임의의 다른 약제학적으로 비활성인 비히클을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 액체 또는 고체일 수 있고, 하나 이상의 치료적 화합물 및 주어진 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분과 조합될 때, 목적으로 하는 벌크, 점조도 및 다른 적절한 수송 및 화학적 특성을 제공하기 위해 염두해 둔 계획된 투여 방식으로 선택될 수 있다. 전형적인 약제학적으로 허용 가능한 담체는 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 물, 식염수 용액, 결합제(예를 들어, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들어, 락토스 또는 텍스트로스 및 기타 당, 젤라틴 또는 황산칼슘), 윤활제(예를 들어, 전분, 폴리에틸렌 글리콜 또는 아세트산나트륨), 붕해제(예를 들어, 전분 또는 전분글리콜산나트륨) 및 습윤제(예를 들어, 라우릴 황산나트륨). 조성물은 피하, 근육내, 또는 피내 투여를 위해, 또는 면역화를 위해 허용 가능한 임의의 방식으로 제형화될 수 있다.

[0139] 애주번트는 면역원성 제제, 예컨대 분비된 백신 단백질(예를 들어, gp96-Ig) 및 T 세포 공동자극 융합 폴리펩타이드를 발현시키는 종양 세포에 첨가될 때, 혼합물에 대한 노출 시 수용자 숙주에서 제제에 대한 면역 반응을 비특이적으로 향상 또는 강화하는 물질을 지칭한다. 애주번트는, 예를 들어, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 명반(알루미늄염), 리포솜 및 마이크로입자, 예컨대 폴리스타이렌, 전분, 폴리포스파젠 및 폴리락타이드/폴리글리코사이드를 포함할 수 있다.

[0140] 애주번트는 또한, 예를 들어, 스쿠알렌 혼합물(SAF-I), 무라밀 펩타이드, 사포닌 유도체, 마이코박테리움 세포벽 제제, 모노포스포릴 지질 A, 마이콜산 유도체, 비이온성 블록 공중합체 계면활성제, Quil A, 콜레라 독소 B 서브유닛, 폴리포스파젠 및 유도체, 및 면역자극 복합체(ISCOM), 예컨대 문헌[Takahashi *et al.*, *Nature* 1990, 344:873-875]에 의해 기재되는 것을 포함할 수 있다. 수의학적 용도를 위해 그리고 동물에서의 항체 생성을 위해, 프로인트 애주번트의 마이토젠 성분(완전과 불완전 둘 다)이 사용될 수 있다. 인간에서, 불완전 프로인트 애주번트(IFA)는 유용한 애주번트이다. 다양한 적절한 애주번트가 당업계에 잘 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Warren and Chedid, *CRC Critical Reviews in Immunology* 1988, 8:83; 및 Allison and Byars, in *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, 1992, Ellis, ed., Butterworth-Heinemann, Boston] 참조). 추가적인 애주번트는, 예를 들어, 바실 칼멧-구에린(bacille Calmett-Guerin (BCG), DETOX(마이코박테리움 플레이(*Mycobacterium phlei*))(CWS) 및 살모넬라 미네소타(*Salmonella minnesota*)(MPL)로부터의 모노포스포릴 지질 A의 세포벽 골격을 함유) 등을 포함한다(예를 들어, 문헌[Hoover *et al.*, *J Clin Oncol* 1993, 11:390; 및 Woodlock *et al.*, *J Immunother* 1999, 22:251-259] 참조).

[0141] 일부 실시형태에서, 벡터는 대상체에게 1회 이상(예를 들어, 1회, 2회, 2회 내지 4회, 3회 내지 5회, 5회 내지 8회, 6회 내지 10회, 8회 내지 12회 또는 12회 초과)이 투여될 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같은 벡터는 1일 당 1회 이상, 1주 당 1회 이상, 격주마다, 1개월 당 1회 이상, 2 내지 3개월 당 1회, 3 내지 6개월마다 1회 또는 6 내지 12개월마다 1회로 투여될 수 있다. 벡터는 임의의 적합한 시간 기간, 예컨대 약 1일 내지 약 12개월의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 투여 기간은 약 1일 내지 90일; 약 1일 내지 60일; 약 1일 내지 30일; 약 1일 내지 20일; 약 1일 내지 10일; 약 1일 내지 7일일 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여기간은 약 1주 내지 50주; 약 1주 내지 50주; 약 1주 내지 40주; 약 1주 내지 30주; 약 1주 내지 24주; 약 1주 내지 20주; 약 1주 내지 16주; 약 1주 내지 12주; 약 1주 내지 8주; 약 1주 내지 4주; 약 1주 내지 3주; 약 1주 내지 2주; 약 2주 내지 3주; 약 2주 내지 4주; 약 2주 내지 6주; 약 2주 내지 8주; 약 3주 내지 8주; 약 3주 내지 12주; 또는 약 4주 내지 20주일 수 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, 벡터의 초기 용량(때때로 "프라이밍" 용량으로서 지칭됨)이 투여되고, 최대 항원 특이적 면역 반응이 달성된 후에, 본 명세서에 제공된 벡터의 하나 이상의 부스팅 용량이 투여될 수 있다. 예를 들어, 부스팅 용량은 프라이밍 용량 후 약 10 내지 30일, 약 15 내지 35일, 약 20 내지 40일, 약 25 내지 45일, 또는 약

30 내지 50일에 투여될 수 있다.

- [0143] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 고형 종양 성장(예를 들어, 유방, 전립선, 흑색종, 신장, 결장 또는 자궁경부 종양 성장) 및/또는 전이를 제어하는 데 사용될 수 있다. 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 벡터를 이것이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 포유류(예를 들어, 인간)이다.
- [0144] 본 명세서에 제공된 벡터 및 방법은 종양에 대해 면역 반응을 자극하는 데 유용할 수 있다. 이러한 면역 반응은 종양과 관련된 징후 또는 증상을 치료 또는 완화시키는데 유용하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "치료하는"은 치료 중이지 않은 개체의 증상에 비해 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터가 투여된 개체에서 증상을 감소, 예방 및/또는 반전시키는 것을 의미한다. 실행자는 본 명세서에 기재된 방법이 후속 요법을 결정하기 위해 숙련된 실행자(의사 또는 수의사)에 의한 지속적인 임상적 평가와 병존해서 사용된다는 것을 인식할 것이다. 이러한 평가는 특정 치료 용량, 투여 방식 등을 증가, 감소 또는 지속할지의 여부를 평가함에 있어서 도움을 주고 영향을 미칠 것이다.
- [0145] 따라서 본 명세서에 제공된 방법은, 예를 들어, 암을 포함하는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 상기 방법은, 예를 들어, 종양 성장을 추가로 예방하거나, 종양 성장을 늦추거나, 또는 종양 억제를 야기함으로써 종양 성장을 저해하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 방법은, 예를 들어, 폐암과 같은 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 화합물이 투여되는 대상체는 특정 외상 상태로 고통받을 필요가 없다는 것이 이해될 것이다. 사실, 본 명세서에 기재된 벡터는 증상의 발생 전에(예를 들어, 암으로부터의 관해에서의 환자) 예방적으로 투여될 수 있다. 용어 "치료적" 및 "치료적으로" 및 이들 용어의 뒤바뀐은 치료적, 고식적 및 예방적 용도를 포함하기 위해 사용된다. 따라서, 본 명세서에 사용된 바와 같은 "증상을 치료하는 또는 완화"는 치료적 유효량의 조성물이 투여된 개체의 증상을, 이러한 투여를 받지 않은 개체의 증상에 비해 감소, 예방 및/또는 반전시키는 것을 의미한다.
- [0146] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효량" 및 "치료적 유효량"은 대상체(예를 들어, 암 또는 감염을 갖는 것으로 진단된 인간)에서 목적으로 하는 치료(예를 들어, 항암, 항조양 또는 항감염) 효과를 제공하는 데 충분한 양을 지칭한다. 항종양 및 항암효과는 종양 성장의 조절(예를 들어, 종양 성장 지연), 종양 크기, 전이, 특정 항암제와 관련된 독성 및 부작용의 감소, 임상 장애 또는 암 증상의 개선 또는 최소화, 이러한 치료가 없이 달리 예상되는 것 이상으로 대상체 생존을 증가시키는 것, 및 투여 전 종양 형성이 없는 동물에서 종양 성장의 예방, 즉, 예방적 투여를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 유효량의 벡터 또는 벡터를 함유하는 조성물, 세포 또는 바이러스 입자의 투여는 대상체에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 대상체에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식은 투여 전 대상체에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식 수준에 비해 적어도 10%(예를 들어, 적어도 25%, 적어도 50%, 또는 적어도 75%)만큼 증가될 수 있다.
- [0147] 항감염 효과는, 예를 들어, 감염제 수의 감소(예를 들어, 바이러스 또는 박테리아)를 포함한다. 치료될 대상체에서의 임상 병태가 감염일 때, 본 명세서에 제공된 바와 같은 벡터의 투여는 대상체에서 병원성 항원 특이적 T 세포의 활성화 또는 증식을 자극할 수 있다. 예를 들어, 벡터의 투여는 gp96-Ig 백신접종 단독에 의해 달성되는 것보다 더 큰 수준으로 대상체에서의 항원-특이적 T 세포의 활성화를 야기할 수 있다.
- [0148] 당업자는 유효량의 벡터가 치료 효과를 향상시키기 위해(예를 들어, 상승적으로) 미세한 조율에 의해 그리고/또는 1회 초과 용량의 투여에 의해(예를 들어, 벡터를 함유하는 2회의 상이한 유전자 변형 종양 세포의 동시 투여에 의해), 또는 다른 제제(예를 들어, PD-1의 길항제)의 투여에 의해 저하 또는 증가될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서 이 보고는 주어진 포유류에 대해 특이적인 특정 사태에 대한 투여/치료를 위한 맞춤형 방법을 제공한다. 치료적 유효량은, 예를 들어, 상대적으로 소량에서 시작해서 그리고 유리한 효과의 동시 평가에 의한 단계적 증가를 이용하여 결정될 수 있다. 따라서 본 명세서에 제공된 방법은 종양을 갖는 환자를 치료하기 위해 단독으로 또는 다른 잘 공지된 종양 요법과 병용하여 사용될 수 있다. 당업자는, 예를 들어, 암 환자의 예상 수명을 연장시킴에 있어서 그리고/또는 암환자(예를 들어, 폐암 환자)의 삶의 질을 개선시키기 위해 본 명세서에 제공된 벡터 및 방법의 유리한 용도를 용이하게 이해할 것이다.
- [0149] *병용 요법 및 권주제이션*
- [0150] 일부 실시형태에서, 본 발명은 대상체에게 추가적인 제제를 투여하는 단계를 더 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 공동투여 및/또는 공동 제형화에 관한 것이다.

[0151] 일부 실시형태에서, 백신 단백질(예를 들어, gp96-Ig) 및 하나 이상의 공동자극 분자의 투여는 다른 제제와 공동 투여될 때 상승적으로 작용하고, 이러한 제제가 단일요법으로서 사용될 때 통상적으로 사용되는 용량보다 더 낮은 용량으로 투여된다.

[0152] 제한 없이, 암 용도를 포함하는 일부 실시형태에서, 본 발명은 추가적인 제제로서 화학요법에 관한 것이다. 화학치료제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이토크산(CYTOXAN) 사이클로스포스파마이드; 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 알트레타민을 포함하는 메틸아멜라민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포라미드, 트라이에틸렌티오포스포라미드 및 트라이메틸올로멜라민; 아세토게닌(예를 들어, 불라타신 및 불라타시논); 캄토테신(합성 유사체 토포테칸을 포함); 브리오스타틴; 칼리 스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 브리젤레신을 포함); 크립토피신(예를 들어, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB 1-TM1을 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디타인; 스폰지스타틴; 질소 머스터드, 예컨대 클로람부실, 클로르나프진, 클로로포스파마이드, 에스트라무스틴, 이포스파마이드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노베티신, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파마이드, 유라실 머스터드; 나이트로소유레아, 예컨대 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라닌누스틴; 항생제, 예컨대 엔다인 항생제(예를 들어, 칼케아미신, 특히 칼케아미신 감말 및 칼케아미신 오메갈(예를 들어, 문헌[Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네마이신 A를 포함하는 다이네마이신; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신;뿐만 아니라 네오크리노스타틴 발색단 및 관련된 색소 단백질 엔다인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신 독소루비신(몰폴리노- 독소루비신, 사이아노몰폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시 독소루비신), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 마이토마이신, 예컨대 마이토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대 메토타렉세이트 및 5-플루오로유라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트라이메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시딘, 6-아자유리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 다이데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예컨대 미노글루테티마이드, 미토탄, 트릴로; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파마이드 글리코사이드; 아미노레블린산; 엔일유라실; 암사크린; 베스트라뷰실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데메콜신; 다이아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시유레아; 렌티난; 로니다인; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK 다당류 복합체(오리건주 유겐에 소재한 JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products)); 라족산; 리족신; 시조퓨란; 스피로게르마늄; 테뉴아존산; 트라이아지쿠온; 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 트라이코테센(예를 들어, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 유레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파마이드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 탁솔 파클리탁셀(뉴저지주 프린스턴에 소재한 브리스톨-마이어스 스퀴브 옹콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)), 아브락산 무 크레모포, 파클리탁셀의 알부민 조작된 나노입자 제형(샤움베르크 111에 소재한 아메리칸 파마슈티칼 파트너사(American Pharmaceutical Partners)), 및 탁소텔 도세탁셀(프랑스 안토니에 소재한 론-폴랑 로어(Rhone-Poulenc Rorer)); 클로람부실; 겐자르 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토타렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라стин; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파마이드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE), 비노렐빈; 노반트론; 테니포사이드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(캄프토사르(Camptosar), CPT-11)(5-FU 및 류코보린과 함께 이리노테칸의 치료 요법을 포함); 토포아이스머라제 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티논산; 카파세타빈; 캄브레타스타틴; 류코보린(LV); 옥살리플라틴 치료 요법을 포함하는 옥살리플라틴(FOLFOX); 라파티닙(TYKERB); PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR의 저해제(예를 들어, 에를로티닙(타르세바(Tarceva))) 및 세포증식을 감소시키는 VEGF-A 및 억제학적으로 허용 가능한 염, 임의의 상기의 산 또는 유도체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 추가로, 치료 방법은 방사선의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 추가로, 치료 방법은 광역동 치료의 사용을 추가로 포함할 수 있다.

- [0153] 감염성 질환 용도를 포함하지만, 제한되지 않는 일부 실시형태에서, 본 발명은 추가제로서 항감염체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 항감염제는 아바카비어(Abacavir), 아사이클로비어(Acyclovir), 아데포비어(Adefovir), 암프레나비어(Amprenavir), 아타자나비어(Atazanavir), 시도포비어(Cidofovir), 다루나비어(Darunavir), 델라비르딘, 엘라비르딘, 다이다노신, 도코산올, 에파비렌즈, 엘비테그라비어(Elvitegravir), 엠트리시타빈, 엔푸비르타이드(Enfuvirtide), 에타비린, 팜시클로비어(Famciclovir) 및 포스카넷(Foscarnet)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 항바이러스제이다. 일부 실시형태에서, 항감염제는, 세팔로스포린 항생제(세팔렉신, 세푸록심, 세파드록실, 세파줄린, 세팔로틴, 세파클로르, 세파만돌, 세폭시틴, 세프프로질 및 세프트비프롤); 플루오로퀴놀론 항생제(시프로, 레바퀴, 플록신, 테킨, 아벨록스 및 노르플록스); 테트라사이클린 항생제(테트라사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린 및 독시사이클린); 페니실린 항생제(아목시실린, 암피실린, 페니실린 V, 다이클록사실린, 카베니실린, 반코마이신 및 메티실린); 모노박탐 항생제(아르트레오남); 및 카르바페넴 항생제(에르타페넴, 도리페넴, 이미페넴/실라스타틴 및 메로페넴)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 항박테리아제이다. 일부 실시형태에서, 항감염제는 항말라리아제(예를 들어, 클로로퀸, 퀴닌, 메플로퀸, 프리마퀸, 독시사이클린, 아르테메터/루메판트린, 아토바쿠온/프로구아닐 및 설파독신/피리메타민), 메트로니다졸, 티니다졸, 이버멕틴, 피란텔, 파모에이트 및 알벤다졸을 포함한다.
- [0154] 면역의 "면역 관문" 분자에 대해 표적화된 차단 항체를 포함하는 다른 추가적인 제제는 본 명세서의 다른 곳에 기재된다.
- [0155] *대상체 및/또는 동물*
- [0156] 본 명세서에 기재된 방법은 이들 방법의 이점을 경험할 수 있는 임의의 대상체와 의한 용도로 의도된다. 따라서, "대상체", "환자" 및 "개체"(상호 호환적으로 사용됨)는 인간뿐만 아니라 비인간 대상체, 특히 가축 동물을 포함한다.
- [0157] 일부 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 포유류, 예컨대, 인간, 마우스, 래트, 기네피크, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 토끼, 양 또는 비인간 영장류, 예컨대 원숭이, 침팬지 또는 개코원숭이이다. 다른 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 비포유류, 예를 들어, 제브라피쉬이다. 일부 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 (예를 들어, GFP로) 형광 표지된 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 형광 세포를 포함하는 유전자이식 동물이다.
- [0158] 일부 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 인간이다. 일부 실시형태에서, 인간은 소아 인간이다. 다른 실시형태에서, 인간은 성인 인간이다. 다른 실시형태에서, 인간은 노인 인간이다. 다른 실시형태에서, 인간은 환자로 지칭될 수 있다.
- [0159] 특정 실시형태에서, 인간은 약 0개월 내지 약 6개월령, 약 6 내지 약 12개월령, 약 6 내지 약 18개월령, 약 18 내지 약 36개월령, 약 1 내지 약 5세, 약 5 내지 약 10세, 약 10 내지 약 15세, 약 15 내지 약 20세, 약 20 내지 약 25세, 약 25 내지 약 30세, 약 30 내지 약 35세, 약 35 내지 약 40세, 약 40 내지 약 45세, 약 45 내지 약 50세, 약 50 내지 약 55세, 약 55 내지 약 60세, 약 60 내지 약 65세, 약 65 내지 약 70세, 약 70 내지 약 75세, 약 75 내지 약 80세, 약 80 내지 약 85세, 약 85 내지 약 90세, 약 90 내지 약 95세 또는 약 95 내지 약 100세 범위의 연령이다.
- [0160] 다른 실시형태에서, 대상체는 비인간 동물이고, 따라서 본 발명은 수의학 용도에 관한 것이다. 구체적 실시형태에서 비인간 동물은 애완동물이다. 다른 구체적 실시형태에서, 비인간 동물은 가축 동물이다. 특정 실시형태에서, 대상체는 화학요법을 받을 수 없는 인간 암 환자이고, 예를 들어 환자는 화학요법에 비반응성이거나 또는 화학요법을 위한 적합한 치료적 창을 갖기에 너무 아프다(예를 들어, 너무 많은 용량- 또는 요법 제한적 부작용을 경험함). 특정 실시형태에서, 대상체는 진행되고/되거나 전이성인 질환을 갖는 인간 암이다.
- [0161] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "동종이계 세포"는 세포가 투여될 개체로부터 유래되고, 개체와 상이한 유전자 구조를 갖는 세포를 지칭한다. 동종이계 세포는 일반적으로 세포가 투여될 개체와 동일한 종으로부터 얻는다. 예를 들어, 동종이계 세포는 암 환자와 같은 인간 환자에게 투여하기 위해 본 명세서에 개시된 바와 같은 인간 세포일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "동종이계 종양 세포"는 동종이계 세포가 투여될 개체로부터 유래되지 않은 종양 세포를 지칭한다. 일반적으로, 동종이계 종양 세포 세포가 투여될 개체에서 종양에 대해 면역 반응을 자극할 수 있는 하나 이상의 종양 항원을 발현시킨다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "동종이계 암세포", 예를 들어, 폐 암세포는 동종이계 세포가 투여될 개체로부터 유래되지 않은 암세포를 지칭한다.
- [0162] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "유전자 변형된 세포"는, 예를 들어, 형질감염 또는 형질도입에 의해 외인

성 핵산을 발현시키도록 유전자 변형된 세포를 지칭한다.

[0163] 본 명세서에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 달리 정의되지 않는 한 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가진다.

[0164] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 단수 형태는 또한 문맥에서 달리 명확하게 표시되지 않는 한 그들이 지칭하는 용어의 복수 형태를 구체적으로 포함한다. 달리 구체적으로 표시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 단어 "또는"은 "및/또는"의 포괄적 의미로 사용되며, "둘 중 하나/또는"의 "배타적" 의미가 아니다. 본 명세서 및 첨부되는 청구범위에서, 단수 형태는 달리 명확하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0165] 용어 "약"은 본 명세서에서 대략, 근처, 거의 또는 주변을 의미하기 위해 사용된다. 용어 "약"은 수치적 범위와 함께 사용될 때, 제시한 수치적 값 초과 및 미만의 경계를 연장시킴으로써 해당 범위를 변형시킨다. 일반적으로, 용어 "약"은 본 명세서에서 20%의 분산에 의해 언급된 값 초과 및 미만으로 수치적 값을 변형하기 위해 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 이행적 어구에서 또는 청구범위 본문에서, 용어 "포함하다" 및 "포함하는"은 열린 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 어구 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"과 동의어로 해석되어야 한다. 공정과 관련하여 사용될 때, 용어 "포함하는"은 상기 공정이 적어도 인용된 단계를 포함하지만, 추가적인 단계들을 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 화합물 또는 조성물과 관련하여 사용될 때, 용어 "포함하는"은 화합물 또는 조성물이 적어도 인용된 특징 또는 성분을 포함하지만, 또한 추가적인 특징 또는 성분을 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0166] 본 발명은 다음의 예에 추가로 기재될 것이며, 청구범위에 기재된 본 발명의 범주를 제한하지 않는다.

[0167] 실시예

[0168] 실시예 1 - gp96-Ig 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 혼입하는 벡터 조작 면역요법은 우수한 항원-특이적 CD8+ T 세포 반응을 유발한다

[0169] 선택 가능한 열충격 단백질 gp96-Ig 기반 동종이계 세포 백신은 생체내 항원 교차 프라이밍을 통해 펩토이드 농도의 중앙 항원에 대해 고빈도 다클론성 CD8+ T 세포 반응을 달성할 수 있다. 확립된 중앙에 의해 전개되는 다중 면역억제 메커니즘은 본 백신 접근의 활성을 둔화시킬 수 있다. 이하에 기재하는 바와 같이, 오래 확립된 B16-F10 흑색종의 마우스 모델에서 PD-1, PD-L1, CTLA-4 및 LAG-3 차단 항체의 체계적 비교는 다른 면역관문에 비해 gp96-Ig 백신접종과 PD-1 차단 사이의 우수한 조합을 입증하였다. OX40, ICOS 또는 4-1BB 작용제를 이용하는 gp96-Ig 백신접종, PD-1 차단, 및 T 세포 공동자극의 삼중 조합물은 상승적 항종양 이점을 제공하였다.

[0170] gp96-Ig 발현 벡터는 ICOSL-Ig, 4-1BBL-Ig, 또는 OX40L-Ig를 동시에 공동발현시키기 위해 재조작되고, 따라서, 추가적인 항체 요법에 대한 필요 없이 공동자극 이점을 제공한다. 이하에 기재되는 바와 같은, 동종이계 세포주에서 gp96-Ig 및 이들 공동자극 융합 단백질의 공동 분비는 항원-특이적 CD8+ T 세포의 향상된 활성화를 초래하였다. 따라서, 병용 면역요법은 벡터 재조작에 의해 달성되어 백신/항체/융합 단백질 요법에 대한 필요를 분명하게 할 수 있고, 중요하게는 요법의 비용과 전신 독성의 위험을 둘 다 제한할 수 있다.

[0171] 실시예 2 - 백신 + 공동자극제 벡터 재조작

[0172] 벡터 재조작 전략은 백신 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 단일 벡터 내로 혼입하기 위해 사용하였다. 구체적으로, gp96-Ig 융합 단백질과 다양한 T 세포 공동자극 융합 단백질을 둘 다 분비하는 세포 기반 조합 IO 산물을 생성하도록 본래의 gp96-Ig 벡터를 재조작하였다(도 1 및 도 2). 백신 및 공동자극 융합 단백질의 조합된 국소 분비(도 3)는 중앙 항원 특이적 T 세포를 활성화시킬 수 있고, 특히 중앙 세포에 의해 생성된 면역억제 분자를 저해하는 제제(예를 들어, PD-1에 대한 항체)의 투여와 조합될 때, 제한된 비용 및 전신 독성으로 항원-특이적 면역을 향상시키는 것으로 예상된다.

[0173] 실시예 3 - ImPACT 대 ComPACT의 생체내 연구

[0174] 물질 및 방법

[0175] 세포 배양물 및 백신 세포주 생성: 37°C, 5% CO₂에서 글루타민 및 10% 소 성장 혈청(BGS)을 지니는 IMDM 중에서 3T3 세포를 유지하였다. 제조업자의 지시에 따라 4D-NUCLEOFECTOR(상표명) 및 세포주 뉴클레오펙터(Cell Line NUCLEOFECTOR)(상표명) 키트 SE(론자사(Lonza))를 이용하여 뉴클레오펙션을 통해 닭 오브알부민(Ova)을 암호화하는 하이그로마이신 내성 플라스미드 골격 pcDNA3.1을 이용하여 3T3-오브알부민-하이그로 모 세포주를 확립하였다. 고수준 Ova를 분비하는 단일 세포 클론을 ELISA에 의해 선별하였고, 뮤린 Gp96-Ig 또는 Gp96-Ig 및

OX40L-Fc의 세포외 도메인 중 하나를 각각 암호화하는 G418 내성 플라스미드 pB45의 뉴클레오텍션을 통해 3T3-Ova-Gp96-Ig(ImPACT) 및 3T3-Ova-Gp96-Ig/OX40L-Fc(ComPACT)를 생성하는 데 사용하였다. 또한, 항생제 선택을 통해 ImPACT와 ComPACT 둘 다의 단일 세포 클론을 생성하고 나서, 유사한 수준의 마우스 IgG를 분비하는 클론을 추가로 선별하고, 후속적 분석을 위해 사용하였다. OX40L mRNA 발현을 qRT-PCR에 의해 확인하고 나서, 웨스턴 블롯에 의해 단백질 수준을 평가하였다.

[0176] 37°C, 5% CO₂에서 글루타민 및 10% 소 태아 혈청(BGS)을 지니는 IMDM 중에서 CT26 세포를 유지하였다. ImPACT(CT26-Gp96-Ig) 및 ComPACT(CT26-Gp96-Ig/OX40L-Fc)의 CT26 버전을 상기와 동일한 발현 플라스미드를 이용하여 생성하였지만, 그러나 제조업자의 지시에 따라 이펙텐(EFFECTENE)(등록상표) 형질감염 시약(퀴아젠(Qiagen))을 이용하여 CT26 세포주 내로 형질감염시켰다. 단일 세포 클론을 항생제 선택 하에 단리시키고 나서, ELISA에 의해 마우스 IgG 분비에 대해 선별하였다. qRT-PCR에 의해 OX40L mRNA 발현을 확인하였다.

[0177] B16.F10 세포주를 ova 모 클론(B16.F10-ova: 3T3 세포에 대해 상기 기재한 바와 같음)을 생성함으로써 처음 확립하였다. 이어서, ImPACT(B16.F10-ova-gp96-Ig) 및 ComPACT(B16.F10-ova-gp96-Ig/Fc-OX40L)의 B16.F10-ova 버전을 다시 상기 기재한 바와 동일한 플라스미드를 이용하여 형질감염시키고 나서, 고수준 gp96-Ig 분비에 대해 선택하였다.

[0178] *마우스 모델, OT-I/OT-II 전달 및 분석:* OT-I/EGFP 마우스의 비장으로부터 항원 특이적 CD8 T 세포를 단리시켜, T 세포 수용체 이식유전자 TCR α -V2 및 TCR β -V5를 운반하였는데, 이들은 H2K^b MHC 클래스 I 항원 교차 제시 동안 오브알부민 잔기 257 내지 264를 인식한다. 항원 특이적 CD4 T 세포를 OT-II 마우스의 비장으로부터 단리시켜, CD4 공동수용체와 상보성이고, I-A^b MHC 클래스 II 항원 교차 제시 동안 닭 오브알부민 잔기 323 내지 339에 대해 특이적인 마우스 α - 및 β -쇄 T 세포 수용체를 발현시켰다.

[0179] 간략하게, 마우스를 CO₂ 질식 다음에 경추파열법을 통해 희생시키고 나서, 비장을 멸균 PBS + 2mM EDTA 내로 해부하였다. 비장세포를 조직으로부터 해부하고 나서, 100 μ M 스트레이터를 통과시켰다. 세포를 1,200 RPM에서 5분 동안 펠렛화시키고 나서, 1 내지 2분 동안 실온에서 5ml 1X ACK 용해 완충제(150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ 및 1mM EDTA)를 첨가함으로써 적혈구 세포를 용해시켰다. 용해 다음에, 동일한 용적의 1X PBS를 첨가하고 나서, 세포를 다시 1,200 RPM에서 5분 동안 펠렛화시켰다. 제조업자의 지시에 따라 스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies)로부터의 CD4 및 CD8 단리 키트를 이용하여 총 비장세포로부터 OT-I(CD8) 및 OT-II(CD4)를 단리시켰다. (조절 T 세포: Treg를 추적하기 위해) FOXP3-RFP에 대한 유전자 이식 마우스에 정맥내(IV) 꼬리 정맥 주사를 통해 OT-I(0.5x10⁶ 개 세포/마우스) 및 OT-II(1x10⁶ 개 세포/마우스)를 전달하였다. IV 주사일은 실험 -제 1일에 대응하였다.

[0180] 제0일 및 제35일에(부스팅한 마우스의 경우에), 마우스를 비처리하거나, 대조군으로서 3T3-Ova 모 클론을 이용하여 백신접종하거나, ImPACT(단독으로 또는 ICOS(바이오레전드(BioLegend) #313512), 4-1BB(3H3 항체, 바이오-X-셀(Bio-X-Cell)) 또는 OX40(OX86 항체, Bio-X-Cell)에 대해 100 μ g의 작용제 항체와 병용하여) 백신접종하거나, 또는 ComPACT를 이용하여 백신접종하였다. 백신접종은 1x10⁶개의 세포로 이루어졌고, 복강내 주사(IP)에 의해 투여하였다. 말초 혈액으로부터 채취한 림프구를 시간 과정 전체적으로 유세포분석에 의해 분석하였다.

[0181] *CT26 종양 모델 및 분석:* CT26 종양 연구를 위해, BALB/C 마우스를 뒤쪽 옆구리 내로 피하 주사를 통해 2x10⁵ 개 또는 5x10⁵ 개 종양 세포로 접종하고, 제0일로 표시하였다. B16.F10-ova 연구를 위해, C57BL/6 마우스를 뒤쪽 옆구리에 5x10⁵ 개 종양 세포로 접종하고, 제0일로 표시하였다. 백신접종일에, 종양 보유 마우스를 비처리 또는 ImPACT, ImPACT + 100mg 항-OX86(전체적으로 OX40(ab)으로서 지칭함) 또는 ComPACT 세포로 처리한 마이트마이신-C(시그마사(Sigma))로 백신접종하였다. 종양 면적(mm²) 및 전체 생존을 시간 과정 전체적으로 평가하였다. 30-일 생존 기준은 종양 제거 징후가 없이 175mm² 미만의 총 종양 면적을 포함하였다. 종양이 확립되고 후속적으로 처리 후 거부된 완전한 반응자를 도 12, 패널 D 및 도 11, 패널 E에 열거한다. 2x10⁵ 개 세포로 접종한 마우스의 코호트를 종양 접종 후 제11일에 희생시켰다. 종양을 이들 마우스로부터 절제하고 나서, 37°C에서 10분 동안 트립신처리하고, 해부하고 나서, 100 μ M 세포 스트레이터를 통과시켰다. 세포를 펠렛화하고 나서, 적혈구 세포를 용해시키고 나서(상기 기재한 바와 같음), RNA를 단리시키고, 역전사시키고 나서, qPCR에 의해 분석하였다(이하 참조). CT26 실험 마우스의 코호트를 비장세포에서 AH1-4량체 분석 및 종양 조직의 유전자 분석을 위해 제12일에 안락사시켰다. 종양을 이들 마우스로부터 절제하고 나서, 37°C에서 10 내지 15분 동안

트립신처리하고, 해부하고 나서, 100mM 스트레이너를 통해 균질화시켰다. 세포를 펠렛화하고 나서 RNA 단리를 위해 가공하였다(이하 참조).

[0182] **유세포 분석기:** 소니(Sony) SH800 상에서 유세포 분석기 및 세포 분류를 수행하였다. 세포의 염색을 위해, 세포 펠렛을 1% 소 혈청 알부민(BSA), 0.02% 아자이드 나트륨 및 2mM EDTA, 및 적절한 항체를 함유하는 1X PBS 완충제 중에서 재현탁시키고 나서, 30분 동안 암실에서 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 유세포 분석기 완충제 중에서 세척하고 나서, 재현탁시키고, 이어서 분석하였다. 세포의 염색을 위해, 세포를 고정시키고, 바이오레전드사로부터의 FOXP3 Fix/Perm 키트를 이용하여 침투시키고 나서, 상기 기재한 바와 같이 염색하고, 유세포 분석기 완충제 중에서 세척하고 나서, 재현탁시키고, 이어서 분석하였다. 사용한 항체는 PE/Cy7-CD4(소니사, 1102640), AF700-CD8a(소니사, 1103650), APC-TCR Vβ5.1,5.2 (소니사, 1297530), 퍼시픽블루(PacificBlue)-TCR Vα2(소니사, 1239080), APC-KLRG1(바이오레전드사, 138412), BV421-CD44(바이오레전드사, 103039), BV605-CD127 (바이오레전드사, 135025), APC-Ki67 (바이오레전드사, 652406), PE/Cy7-IFNγ(바이오레전드사, 505826) 및 BV421-IL2 (바이오레전드사, 503825)였다.

[0183] **ELISA:** 1×10^6 개 세포를 1ml의 배양 배지에서 플레이팅하고 나서, 24시간 후 상청액을 분석하도록, 표준 ELISA 조건을 설정하였다. 고결합 ELISA 플레이트를 중탄산나트륨 완충제 중에서 $10 \mu\text{g/ml}$ 마우스 IgG(잭슨 래버러토리즈사 # 115-005-062)로 코팅하였다. 코팅 플레이트를 밤새 4°C에서 인큐베이션시켰다. 다음날 아침에, 플레이트를 TBS-T(50mM 트리스, 150mM NaCl 및 0.05% 트윈 20)으로 3회 세척하고 나서, 카제인 차단 완충제(시그마사)를 이용하여 1시간 동안 차단하고, 또한 TBS-T로 3회 세척하였다. 플레이트에, 샘플의 11-점 마우스 IgG 표준 세트와 함께 $50 \mu\text{l}$ 의 세포 상청액을 코팅 ELISA 플레이트에 첨가하고 나서, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였고, $50 \mu\text{l}$ 의 검출 항체(잭슨 래버러토리즈(Jackson Laboratories) #115-035-071)를 첨가하고 나서, 1시간 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하고 나서, $100 \mu\text{l}$ 의 슈어블루(SUREBLUE)(상표명) TMB 마이크로웰 페록시다제 기질(Microwell Peroxidase Substrate)(KPL)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 20분 동안 암실에서 인큐베이션시켰다. 반응을 중단시키기 위해, $100 \mu\text{l}$ 의 황산을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 플레이트를 바이오텍(BioTek) 플레이트 판독기 상에서 즉시 판독하였다. 샘플을 다회 희석으로 적어도 3회 중복해서 실행하였다.

[0184] **RNA 단리 및 qRT-PCR:** 칼럼상의 DNase 처리를 포함하는 제조업자의 권고에 따라 RNeasy 및 RNeasy 마이크로 키트(키아젠)를 이용하여 총 RNA를 준비하였다. 오리진사(OriGene)로부터의 포스트-스트랜드(First-strand) cDNA 합성 키트를 이용하여 cDNA를 합성하기 위해 총 $1 \mu\text{g}$ (RNeasy를 이용) 또는 100ng(RNeasy 마이크로 이용)을 사용하였다. KAPA SYBR FAST, SYBR 그린 마스터 믹스(카파 바이오시스템즈(Kapa Biosystems))를 이용하여 qPCR을 수행하고 나서, 로슈 라이트사이클러(Roche Lightcycler) 상에서 분석하였다. 값을 18S mRNA에 대해 정규화시키고 나서, 최소 3가지 생물학적 복제물에 대해 평균 \pm 표준 오차(SEM)를 나타내고, 모두 3회 실행하였다. 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0185] IFN-감마: F: 5'-CTGCCACGGCACAGTCATTG-3' (서열번호 14)

[0186] R: 5'-gccagttctctccagatatcc-3' (서열번호 15)

[0187] TNF-알파: F: 5'-CCACGCTCTTCTGTCTACTG-3' (서열번호 16)

[0188] R: 3'-gccatagaactgatgagaggg-3' (서열번호 17)

[0189] 그랜자임-B F: 5'-CTACTGCTGACCTTGCTCTG-3' (서열번호 18)

[0190] R: 3'-agtaaggccatgtagggtcg-3' (서열번호 19)

[0191] IL-2 F: 5'-CTGCGGCATGTTCTGGATTGACT-3' (서열번호 20)

[0192] R: 5'-AGTCCACCACAGTTGCTGACTCAT-3' (서열번호 21)

[0193] 퍼포린-1 F: 5'-GACACAGTAGAGTGTCGCATG-3' (서열번호 22)

[0194] R: 5'-aagcatgctctgtggagctg-3' (서열번호 23)

[0195] 베타-액틴 F: 5'-aaggccaaccgtgaaaagat-3' (서열번호 24)

[0196] R: 5'-gtggtagcaccagaggcatcac3' (서열번호 25)

[0197] **웨스턴 블롯 분석:** ImPACT 및 ComPACT 세포를 브레펠딘-A로 16시간 동안 처리하여 단백질 수송 및 분비를 저해

하였다. 이어서, 세포를 1X 완전 프로테아제 저해제 카테일(로슈사)을 함유하는 RIPA 완충제(25mM 트리스-HCL, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Na데옥시콜레이트 및 0.1% SDS) 중에서 얼음 상에서 10분 동안 용해시켰다. DC 단백질 분석 키트(바이오-래드사(Bio-Rad))를 이용하여 단백질 농도를 결정하고 나서, 20 μ g의 단백질을 프로빙하였다. 항체는 다음과 같았다: CD252(OX40L, 에이비캠사(Abcam) #ab156285, 1:1000 희석), 히스톤 H3(액티브 모티프사(Active Motif) #61278, 1:10,000), 히스톤 H4(액티브 모티프사 #61300, 1:10,000), 및 베타 액틴(에이비캠 #ab8226, 1:10,000).

[0198] *레전드플렉스(LEGENDplex) 사이토카인 분석*: 실험 마우스를 CO₂ 질식 및 경추파열법을 통해 안락사시키고 나서, 전혈을 심장천자를 통해 수집하였다. 적혈구를 중력에 의해 1시간 동안 실온에서 침강시키고 나서, 남아있는 세포를 1,200 RPM에서 5분 동안 펠렛화하였다. 이어서, 혈청을 새로운 1.5mL 에펜드르프관에 옮겼다. 제조업자 권장에 따라 레전드플렉스사(LEGENDPLEX)(상표명) 사이토카인 분석 키트(바이오레전드사)를 이용하여 사이토카인 분석을 수행하고 나서, 소니 SH800 상에서 분석하였다.

[0199] *통계학적 분석*: 실험 복제물(N)을 도면에 나타낸다. 달리 언급되지 않는 한, 플롯팅한 값은 3회 별개의 실험의 최소값으로부터의 평균을 나타내고, 오차는 SEM이다. 웰치 보정(Welch's correction)을 이용하는 독립표본 모수 t-검정을 이용하여 통계학적 유의도(p-값)을 결정하였다. 유의한 p-값을 별표(*)를 이용하여 표지하고 나서, 대응하는 p-값을 각각의 도면에서 표지한다.

[0200] *결과*

[0201] 다수의 새로운 시도는 치료적 백신 또는 T 세포 공동자극 항체를 첨가하는 것이 반응하는 환자의 비율 및 임상 반응의 내구성을 증가시키는 유효한 전략인지의 여부를 조사할 것이다. 이러한 전략의 실행은 어떠한 제제가 상승적 이점을 제공할 수 있는지의 불완전한 이해, 이러한 조합의 독성이 용인 가능한지의 여부 및 종국적으로 건강관리 시스템이 이러한 조합을 관리하는 방법을 포함하는 몇몇 인자에 의해 제한된다.

[0202] 백신과 개개 T 세포 공동자극 분자 사이의 잠재적인 상승효과를 조사하기 위해, 일련의 전임상 마우스 모델에서 직접 대면하는 연구를 수행하였다. 변형된 분비 가능한 gp96-Ig 융합 단백질을 발현시키는 세포 기반 백신을 이용하여(도 4A), OX40, 4-1BB 또는 ICOS를 표적화하는 작용제 항체의 공동 투여가 항원-특이적 CD8+ T 세포의 추가적인 공동 자극을 제공하는지의 여부를 조사하기 위한 연구를 수행하였다(도 5a-5C). 3T3-ova-gp96-Ig 백신을 이용하여 오브알부민-특이적 CD8+ T 세포(OT-I)로 입양 전달된 C57BL/6 마우스의 면역화는 말초 혈액 CD8+ T 세포의 10%까지 OT-I 세포의 증식을 야기하였다. 이 반응은 OX40 작용제 항체의 추가적인 투여에 의해 2배로 될 수 있지만, 4-1BB 또는 ICOS 공동자극 항체는 그렇지 않다(도 5d).

[0203] 2 내지 5일 과정에 걸쳐 항원 제시 세포에 의해 공간적으로 제한된 미세환경에서 국소 염증에 의해 OX40L에 의한 T 세포 공동자극을 촉발한다. OX40 수용체 작용제 항체의 투여는 몇 주 동안 지속될 수 있는 전신 공동자극을 제공한다. 백신은 전형적으로 국소로 투여되기 때문에, 전신 공동자극을 제한하고 단일 화합물과의 병용 면역요법을 가능하게 하는 전략으로서 OX40L 융합 단백질(Fc-OX40L)이 gp96-Ig 함유 플라스미드의 제2 카세트에서 공동발현될 수 있었는지의 여부를 결정하는 실험을 수행하였다(도 6a). 개념의 증거로서, 3T3 세포 공동 발현 가능성 오브알부민 및 gp96-Ig 단독("ImPACT") 또는 Fc-OX40L, ICOSL 또는 4-1BBL과 함께 gp96-Ig를 생성하였다. 유사한 양의 ova과 gp96-Ig를 둘 다 분비하기 위해 이들 세포주를 안정적으로 선택하였다(도 7A 및 도 7B). Fc-OX40L, ICOSL 또는 4-1BBL의 발현을 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 평가하고 나서(도 7C 및 도 7d), 1차 비장세포로부터의 IL-2 분비에 의해 세포 배양 상청액에서 기능적으로 활성이 되는 것으로 나타낸다.

[0204] 단독으로 또는 OX40 작용제 항체와 병용하여 ImPACT의 생체내 활성을 도 5에 기재한 OT-I 모델을 이용하여 CompACT와 비교하였다. 상기 기재한 공동-형질감염이 도 5에서 ova를 발현시키는 네오마이신 내성 카세트에 의해 가능하지 않기 때문에 이 실험에서 별개의 세포주를 사용하였다. CompACT를 국소로 투여하였기 때문에, 전신으로 투여한 OX40 작용제 항체와 ImPACT의 조합물에 대해 극적인 프라이밍 및 부스팅 효과는 예상할 수 없었다. 그러나 도 6b 및 도 6c에 나타난 바와 같이, CompACT 면역화는 ImPACT 단독에 의해 또는 OX40 작용제 항체와의 조합에 의해 1차 면역화 후 OT-I 세포의 놀랍게도 그리고 유의하게 개선된 증식을 제공하였다. 말초 혈액 중의 최대 확장은 CompACT에 의해 제5일에 증가되었지만, 더 중요하게는, 그에 따른 제6일 내지 제20일의 반응의 지속 기간이었다.

[0205] 백신 접종과 조합한 OX40 작용제 항체에 대한 기억 반응은 항원 특이적 CD8 구획 내에서 상대적으로 약하다. 1차 면역화 후 제35일에 마우스를 재면역화함으로써 부스트 반응을 평가하였다(도 6c). OX40 작용제 항체의 조합물이 OT-I 반응의 상대적으로 약한 부스트를 제공하였지만, CompACT 처리 마우스는 1차 반응의 규모와 거의 매

칭되는 부스트 반응을 보여주었다(도 6c). ComPACT를 받은 마우스로부터의 비장세포 및 복막 세포의 유세포 분석은 다른 그룹에 비해 CD127⁺KLRG1⁻ 세포에서 현저한 증가를 나타내었는데, 이는 기억 전구체 세포의 증가를 나타낸다(도 8b). ComPACT(OX40L), ComPACT(ICOSL) 및 ComPACT(4-1BBL)를 포함하는 다양한 ComPACTs에 의해 이 효과를 관찰하였지만, OX40 작용제 항체 처리에 의해서는 그렇지 않았다. 다양한 ComPACT는 OX40 작용제 항체 처리와 같이 단명 효과기 세포의 증가를 유도하지 않았다(CD127⁺KLRG1⁺, 도 8b). 그러나, ComPact는 비장 내에서 기억 T 세포(CD127⁺KLRG1⁺)를 증가시켰다(도 8b). 이들 데이터는 OX40L, ICOSL 또는 4-1BBL 작용제 융합 단백질의 국소 투여가 항원-특이적 CD8 구획에서 1차 반응과 부스트 반응을 둘 다 상당히 증가시켰는데, 이는 프라이밍 후 기억 전구체 세포의 증가 및 연장된 수축기와 상관 관계가 있다는 것을 나타낸다. 추가로, 이들 데이터는 또한 ImPACT +/- OX40 작용제 항체에 비해 ComPACT 처리 마우스에 대한 신규하고 예상치 못한 메커니즘을 나타내었다.

[0206] 국소 제공된 OX40L을 이용하는 항원-특이적 CD8 구획에서의 증가된 1차 및 부스트 반응에 대한 이유는 OX40 작용제 항체의 전신 투여에 의해 제공되는 감소된 표적을 벗어난 활성화에 기인할 수 있었다. 이 가설을 시험하기 위해, 복막 세포, 비장세포 및 종양 배수 림프절(TDLN) 세포를 ImPACT +/- OX40 작용제 항체 또는 ComPACT로 면역화한 마우스로부터 제8일에 분리시키고 나서, 유세포분석 및 정량적 RT-PCR(qRT-PCR)에 의해 분석하여 표적을 벗어난 면역 활성화와 항원-특이적 반응 간을 구별하였다. 1차 면역화 후 제8일에 분리시킨 복막 세포의 분석은 ComPACT 처리 마우스에서 총 단핵, OT-I 및 OT-II 세포의 증가된 수뿐만 아니라 OX40 작용제 항체로 처리한 마우스에서 총 CD4 세포의 증가된 수를 나타내었다(도 8a). 총 CD4⁺ 세포 및 FOXP3⁺ 조절 T 세포(Treg)의 증가된 수는 OX40 작용제 항체로 처리한 마우스의 복막강, 비장 및 TDLN에서 검출되었다(도 8a 및 도 8e). 대조적으로, ComPACT 처리 마우스는 Treg 세포의 분명한 자극이 없는 항원-특이적 OT-I (CD8⁺) 및 OT-II (CD4⁺) 세포를 특이적으로 증폭시켰다(도 8a 및 도 8e). 비장 및 림프절에서 유사한 발견을 또한 관찰하였는데, 이는 총 CD4 세포뿐만 아니라 항원-특이적 CD4 세포의 전신 확장을 나타낸다(도 9A 및 도 9B). CD4⁺FoxP3⁺ 조절 T 세포(Treg)는 또한 OX40 작용제에 대해 증가되었지만, ComPACT 처리 동물은 그렇지 않았다. 혈청 사이토카인 분석은 OX40 작용제 항체로 처리한 마우스에서 IFN γ , TNF α , IL-5 및 IL-6의 전신 증가를 추가로 입증하였다(도 8c). 전신 사이토카인 증가의 세포 공급을 조사하기 위해, 면역화 후 8일에 총 CD8⁺ 세포 또는 OT-I 세포 중 하나에 대해 RT-PCR을 수행하였다. ComPACT 처리 마우스는 OT-I 집단으로 분리시킨 IFN γ , TNF α 및 그랜자임-B에서 증가를 나타낸 반면, OX40 작용제 항체로 처리한 마우스는 OT-I와 총 CD8 집단 둘 다에서 증가를 나타내었다(도 8d).

[0207] 이들 데이터는 OX40L 융합 단백질이 열 충격 단백질 gp96-Ig 기반 백신을 공동발현시키는 플라스미드의 안정한 형질감염에 의해 국소로 제공될 수 있다는 것을 나타낸다. 충분한 농도의 Fc-OX40L이 공동자극을 제공하기 위해 분비되었는지의 여부에 관한 초기 가능성은 공동자극을 제공하도록 분비되었는데, 이것은 달성 가능하며, 놀랍게도 OX40 작용제 항체의 전신 투여보다 더 효과적이라는 것을 입증하였다. 공동자극된 OT-I 세포는 OX40 항체 공동자극된 OT-I 세포와 동등한 수준의 효과기 사이토카인을 생성하였고, 표적 세포에 대해 증가된 세포독성 활성을 발휘하는 것으로 예상되었다.

[0208] 무린 종양 모델에서 ComPACT에 대한 ImPACT +/- OX40 항체의 기능적 활성을 연구하기 위해, 도 7의 3T3 세포에 대해 약술한 바와 같이 CT26 세포를 이들 작체물로 안정하게 형질감염시켰다(도 10a 내지 도 10c). 실험의 일 세트에서, 마우스를 제0일에 CT26 세포로 접종시키고, 이어서, 종양 접종 후 제6일 및 제11일에 OX40 작용제 항체와 또는 CT26 ComPACT와 조합한 미토마이신-C 처리 CT26 세포, CT26-gp96-Ig, CT26-gp96-Ig로 처리하였다. 실험의 제2 세트에서, 마우스를 제0일에 CT26 세포로 접종하고 나서, 이어서, 종양 접종 후 제4일, 제7일 및 제10일에 OX40 작용제 항체와 또는 CT26-ComPACT 세포와 조합한 미토마이신-C 처리 CT26 세포, CT26-ImPACT, CT26-ImPACT로 면역화하였다(도 11A). 종양 접종 후 제12일에 분리시킨 종양 조직에 대한 정량적 RT-PCR은 OX40 작용제 항체, ImPACT, ComPACT 및 ImPACT+OX40 작용제 항체 조합물 처리 그룹에서 CD8a, IL-2 및 IFN γ 의 증가된 발현을 나타내었는데, 이는 면역 세포 활성화 및 종양 침윤을 나타낸다. 예상한 바와 같이, OX40 작용제 항체(단독으로 또는 ImPACT와 함께)를 받은 마우스만이 종양 내에서 증가된 CD4 및 FoxP3 발현을 나타내었다(도 11B). AH1-4량체 염색에 의해 검출되는 바와 같은 CT26 항원-특이적 CD8⁺ 확장은 비처리 그룹에 비해 ImPACT + OX40 항체에서 대략 4배 그리고 ComPACT 처리 마우스에서 대략 5배로 상당히 상승되었다(도 11B). 종양 진행은 대조군 또는 단일요법 아암(arm)에 비해 ImPACT + OX40 작용제 또는 ComPACT 처리 중 하나를 받은 마우스에서 강하게 차단된 것으로 나타났다(도 11D). 이는 본 발명자가 B16.F10 종양 모델에 의해 관찰한 것에 비해 ComPACT 처리 마우스에서 장기간 생존의 상당한 증가 및 더 높은 비율의 완전한 종양 거부를 야기하였다(도 11E, 각각 80% 및 대략 47%). 따라서, ComPACT는 종양 성장 및 상당한 생존 이점에서 강한 항원-특이적 T 세포

확장 및 종양 침윤을 생성한다.

- [0209] B16.F10 마우스 흑색종 종양 모델은 공격적 종양이며, 전형적으로 OX40 작용제 항체에 의해 효과적으로 처리되지 않는다. B16.F10 종양 모델에서 gp96-Ig 기반 백신을 평가하기 위해, B16.F10-ova 세포주를 생성하였다. 추가로, B16.F10-ova-ImPACT 및 - ComPACT 백신을 후속적으로 각각 gp96-Ig 및 gp96-Ig-Fc-OX40L 백터의 안정한 형질감염에 의해 생성하였다. B16.F10- ImPACT 및 - ComPACT 세포주로부터의 비슷한 수준의 gp96-Ig 분비를 ELISA에 의해 확인하였고, B16.F10-ova-ComPACT 세포주에서의 Fc-OX40L 발현을 또한 qRT-PCR에 의해 확인하였다. B16.F10-ova 종양 접종 전날에 마우스에 OT-I 세포로 입양 전달하였다(-제1일로 표시, 도 12A). 다음에, 미토마이신-C 처리 B16.F10-ova 세포, B16.F10-ova-ImPACT, OX40 작용제 항체와 또는 B16.F10-ova-ComPACT와 조합한 B16.F10-ova-ImPACT로 제4일, 제7일 및 제10일에 백신접종 후 마우스에서 OT-I 세포의 항원 특이적 반응을 조사하였다(도 12B). 3T3-ova 모델 시스템에 의해 얻은 데이터와 일치되게, B16.F10-ova-ComPACT 처리 마우스는 제10일 내지 제19일에 OT-I 세포의 강한 확장을 나타내었는데(이는 초기 백신접종 후 제6일 내지 제15일에 대응함), 이는 ImPACT +/- OX40 작용제 항체에 의해 보이는 것보다 더 컸고, 이전에 관찰한 것에 대한 수축기의 지속적 역학과 유사하다. 따라서, B16.F10-ova-ComPACT 백신접종 마우스는 ImPACT +/- OX40 작용제 항체 백신접종 둘 다보다 더 강한 항종양 효과를 나타내었다(도 12C). ComPACT 처리 마우스에서의 장기간 생존은 대략 78% 였는데, 마우스의 11%는 그들의 공격적 종양의 완전한 거부를 보여주었다. ImPACT 단독 백신접종 마우스에 비해, ImPACT + OX40 작용제 Ab 처리 마우스는 각각 50% 및 62.5%의 전체 생존 래트를 나타내었다(도 12D).
- [0210] 앞서 기재한 면역 분석뿐만 아니라 OT-I 전달 분석을 이용하여 추가적인 ComPACT의 기능적 활성을 조사하였다. 구체적으로, OT-1/GFP 세포를, 제0일에 초기 백신접종 및 제35일에 부스트로 46일에 걸쳐 백신 없음, Ova 단독 대조군 세포, ComPACT(gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A) 또는 ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)(이는, ComPACT-OX40L 세포주와 ComPACT-TL1A 세포주의 혼합물임)로 처리한 마우스에서 유세포분석에 의해 분석하였다(도 13). 프라이밍과 기억 반응은 둘 다 ComPACT (gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A) 또는 ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)로 처리한 마우스에서 강하였다. ComPACT 또는 ComPACT² 마우스는 또한 놀랍게도 시간 과정(대략 제7일 내지 제20일) 전체적으로 상승된 OT-1 수준을 보유하였다. 추가적으로, 제0일에 C57BL/6 마우스를 ImPACT 단독 또는 ComPACT(gp96-OX40L, gp96-Ig/4-1BBL 또는 gp96-Ig/ICOS-L)로 면역화시켰다(도 14). 결과는 다양한 ComPACTs가 ImPACT에 비해 OTI 세포의 증식을 향상시켰다는 것을 나타낸다.
- [0211] 추가적인 ComPACTs의 생체내 활성을 CT26 결장직장 암종 모델에서 추가로 조사하였다. 구체적으로, 마우스를 비 처리하거나 또는 CT26 모 세포, ImPACT 단독, ImPACT + TNFRSF25 작용제(4C12 ab), 4C12(ab) 단독, PD-1(ab) 단독, 4C12(ab) 및 PD-1(ab), ComPACT(gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A), ComPACT(gp96-Ig/OX40L) + PD-1(ab), 또는 ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)로 제4일, 제7일 및 제10일에 백신접종하였다(도 15). 결과는 ComPACT 처리 단독(gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A) 그리고 PD-1와 조합이 종양 성장을 상당히 감소시켰다는 것을 나타낸다. 도 16에서 나타내는 바와 같이, ComPACT 처리 단독(gp96-Ig/OX40L 또는 gp96-Ig/TL1A) 및 PD-1과의 조합은 또한 마우스 생존을 상당히 향상시켰다.
- [0212] 인간 암 세포주에서 ComPACT의 발현을 시험하였다. 구체적으로, ComPACT(gp96-Ig/OX40L)를 인간 전립선암 세포주(예를 들어, PC-3) 또는 인간 폐 선암종 세포주(예를 들어, AD100) 내로 형질감염시켰다. 각각 도 17 및 도 18 참조. 결과는 세포주 생성되고 OX40L을 분비하였다는 것을 나타낸다.
- [0213] 종합하면, 이들 데이터는 다수의 상보적 양상, 이 경우에 단일 화합물 중에 백신 및 T 세포 공동자극 융합 단백질을 혼입함으로써 병용 면역요법을 접근할 수 있다는 것을 입증하였다. 백터-암호화 및 세포-분비된 Fc-OX40L에 의한 T 세포 공동자극의 제공은 실현 가능하였고, OX40 작용제 항체에 비해 프라이밍과 부스팅 둘 다의 시간에서 항원-특이적 CD8+ T 세포의 향상된 증식을 야기하였다. 조합된 백신 및 공동자극제에 의해 활성화된 T 세포는 IFN γ , IL-2, TNF α 및 그랜자임-B를 생성하였고, 표적을 벗어난 T 세포 증식에 의해 동반되지 않았으며, 전신 염증 사이토카인 증가가 OX40 작용제 항체에 의해 관찰되었다. 중요하게는, 이 접근은 또한 확립된 뮤린 결장암 모델에서 치료적 종양 면역을 향상시켰다. 종합하면, 이들 결과는 이중 또는 삼중 항체 조합에 의존하지 않을 수 있고, 감소된 표적을 벗어난 T 세포 활성화에 기인하여 환자에 대해 더 큰 안전성 및 효능을 제공할 수 있는 병용 면역요법을 실행하기 위한 전략을 제공한다.
- [0214] 다른 실시형태
- [0215] 본 발명은 이들의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 앞서 언급한 설명은 예시를 위해 의도되고, 첨부하는 청구

범위의 범주에 의해 한정되지 않는 본 발명의 범주를 제한하지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 다른 양상, 이점 및 변형은 다음의 청구범위의 범주 내이다.

[0216] 임의의 개개 부분의 내용은 모든 부분에 대해 동일하게 적용 가능할 수 있다.

[0217] 참고문헌에 의한 포함

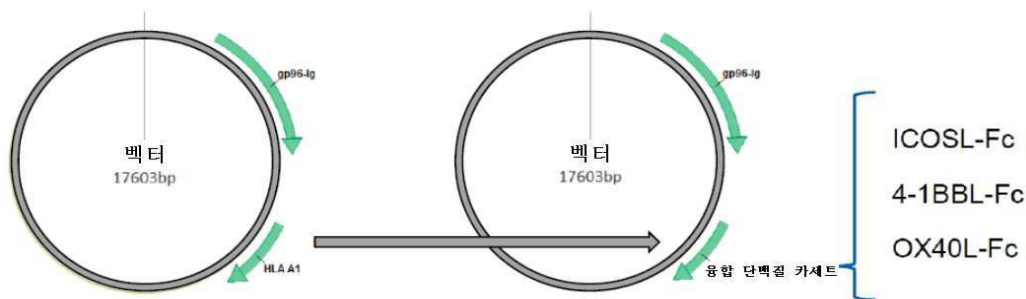
[0218] 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0219] 본 명세서에 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 전의 그들의 개시내용에 대해서만 제공된다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명 때문에 이러한 간행물보다 선행한다는 자격이 부여되지 않는다는 용인으로서 해석되어서는 안 된다.

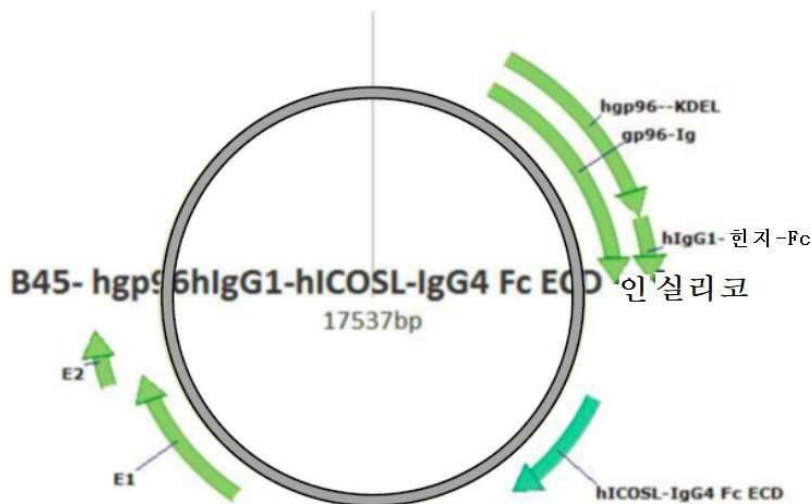
[0220] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 모든 표제는 단순히 조직화를 위한 것이며, 본 개시내용을 임의의 방법으로 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

도면

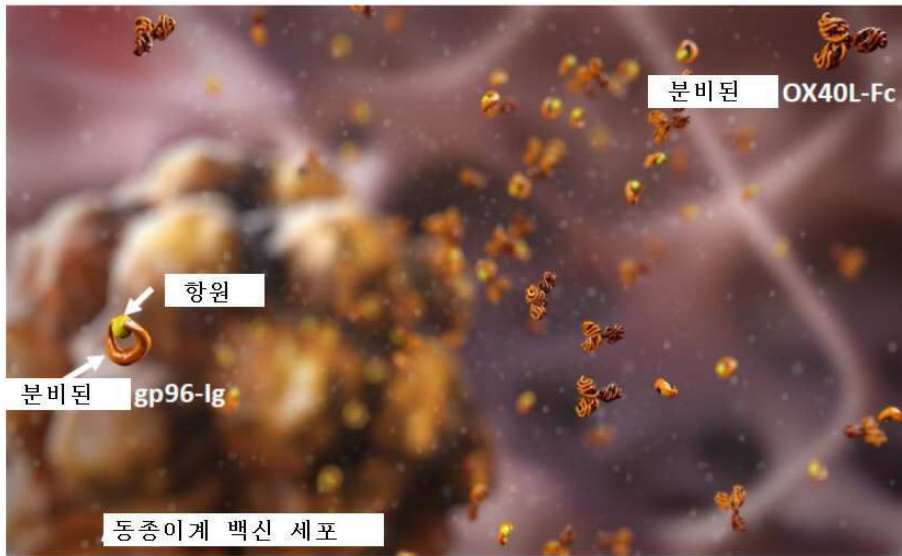
도면1



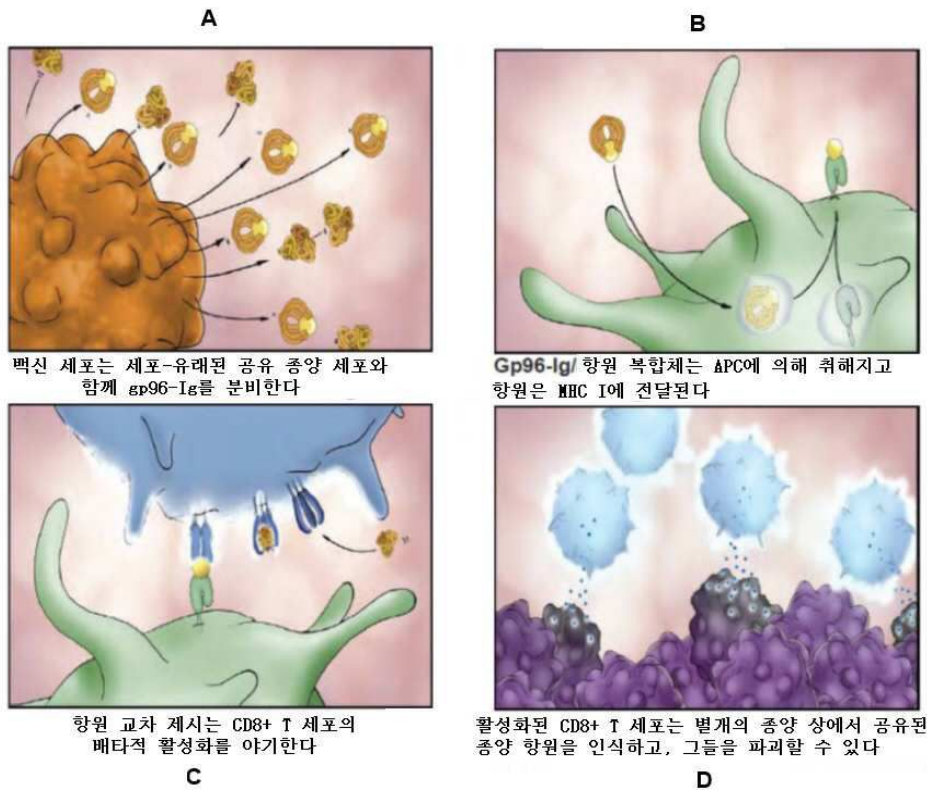
도면2



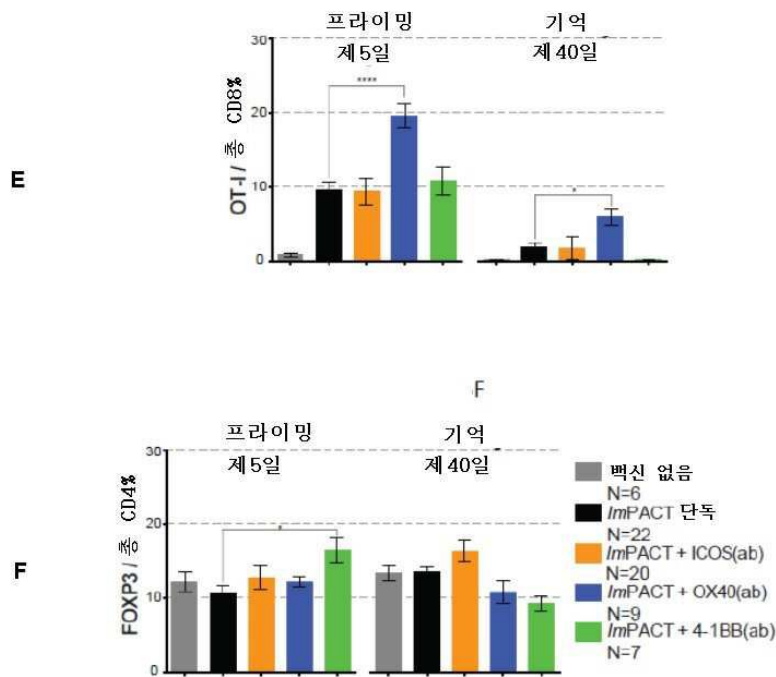
도면3



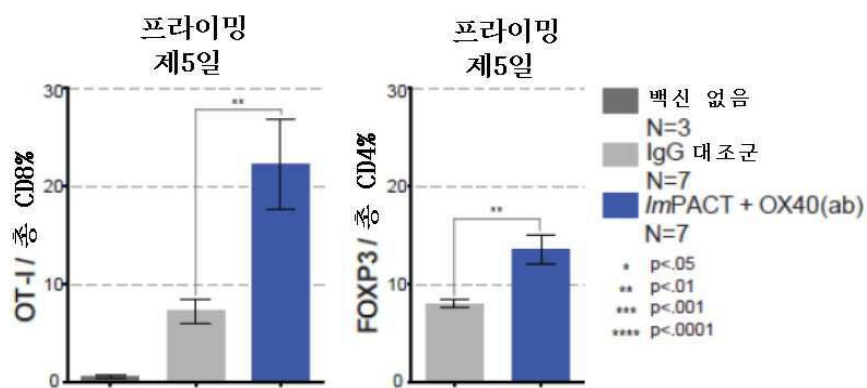
도면4ad



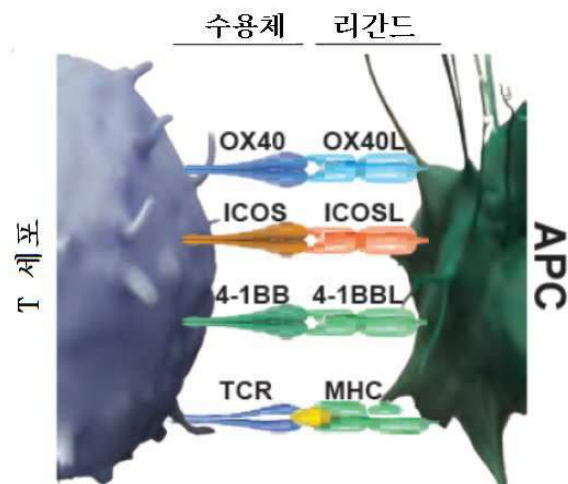
도면4ef



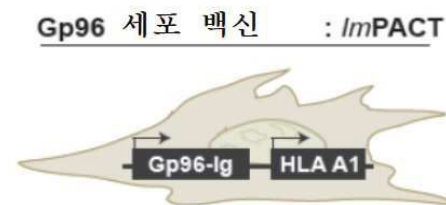
도면4g



도면5a



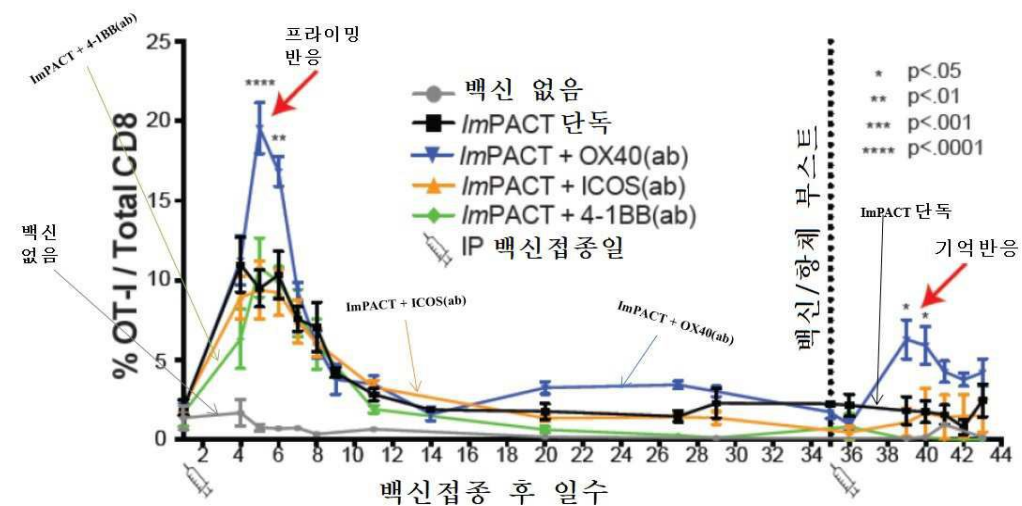
도면5b



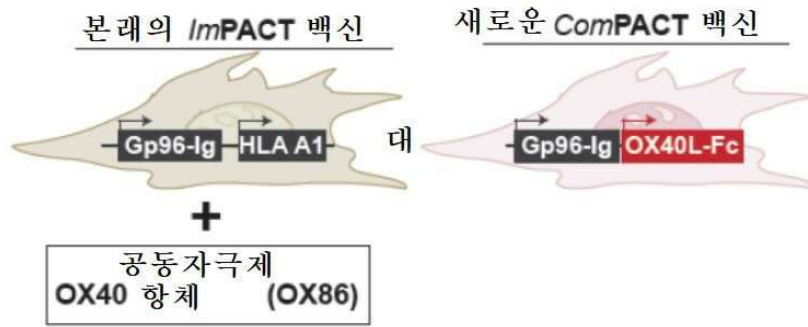
도면5c

공동 자극제	작용제 항체(ab)
OX40	OX86
ICOS	C398.4A
4-1BB	3H3

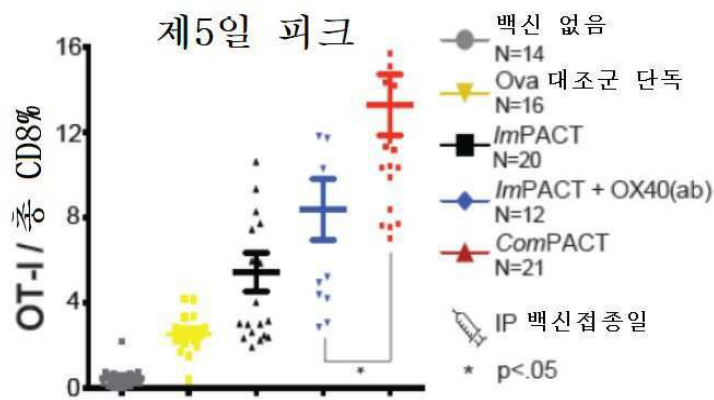
도면5d



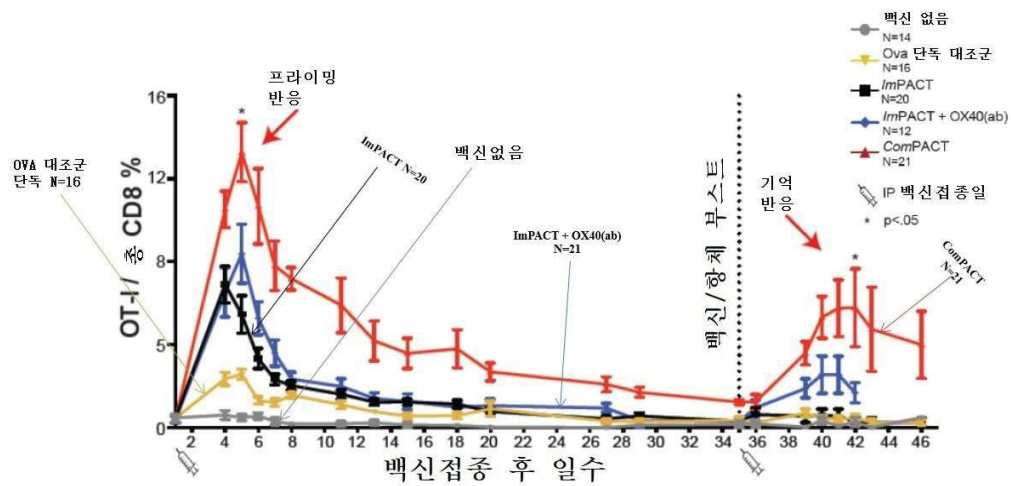
도면6a



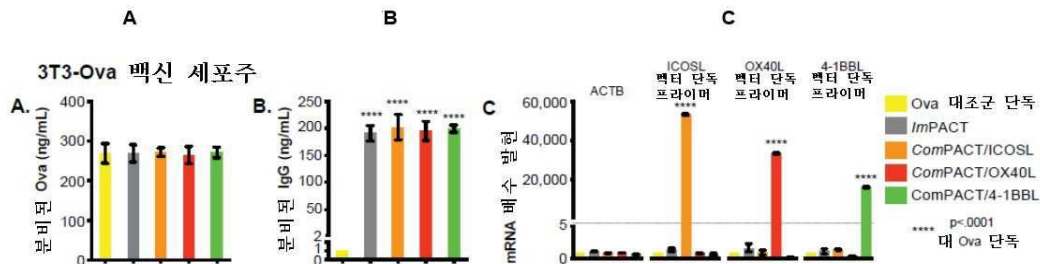
도면6b



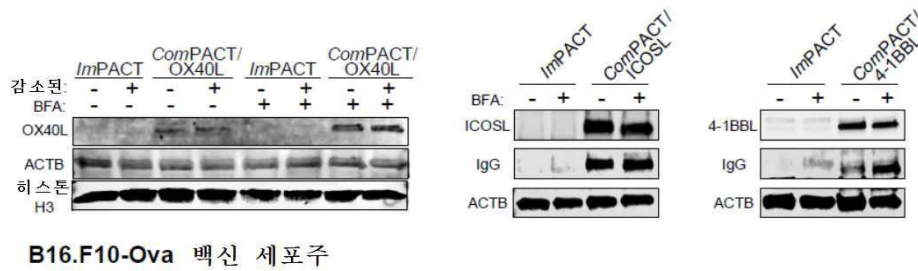
도면6c



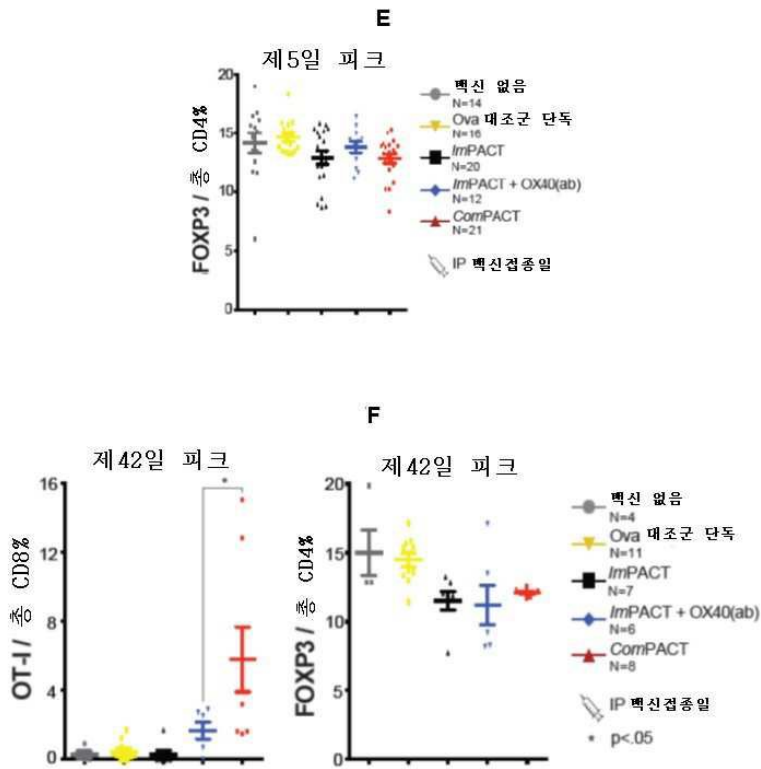
도면7ac



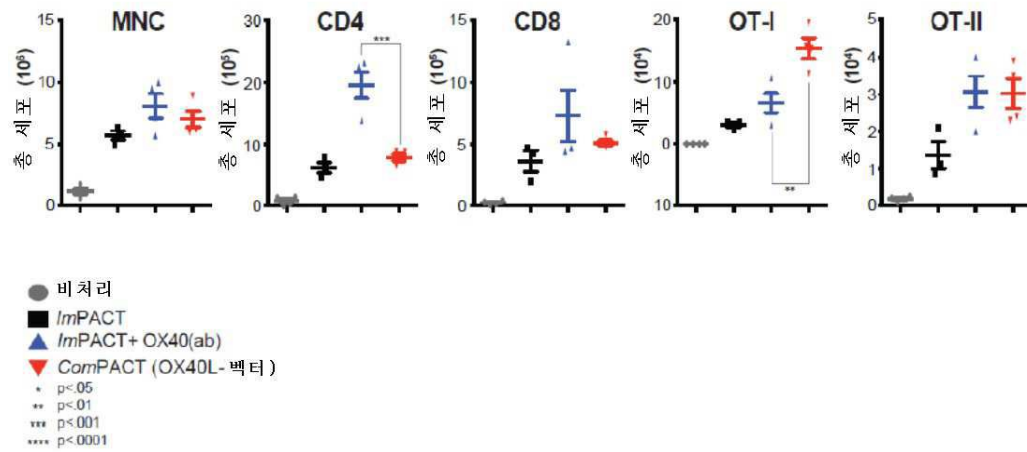
도면7d



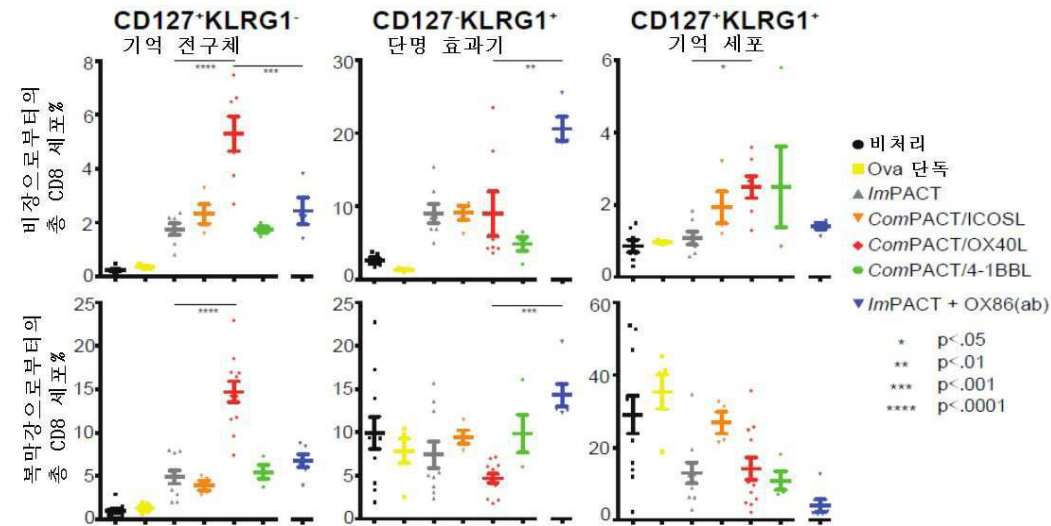
도면7ef



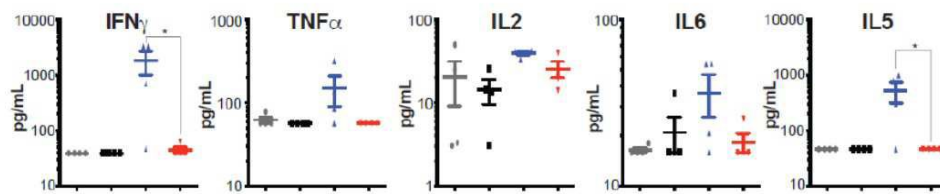
도면8a



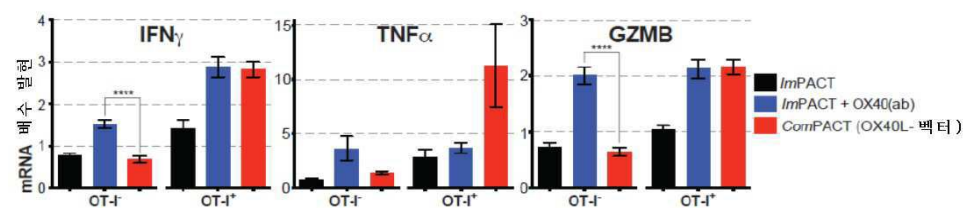
도면8b



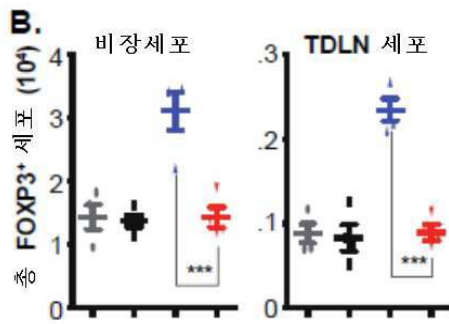
도면8c



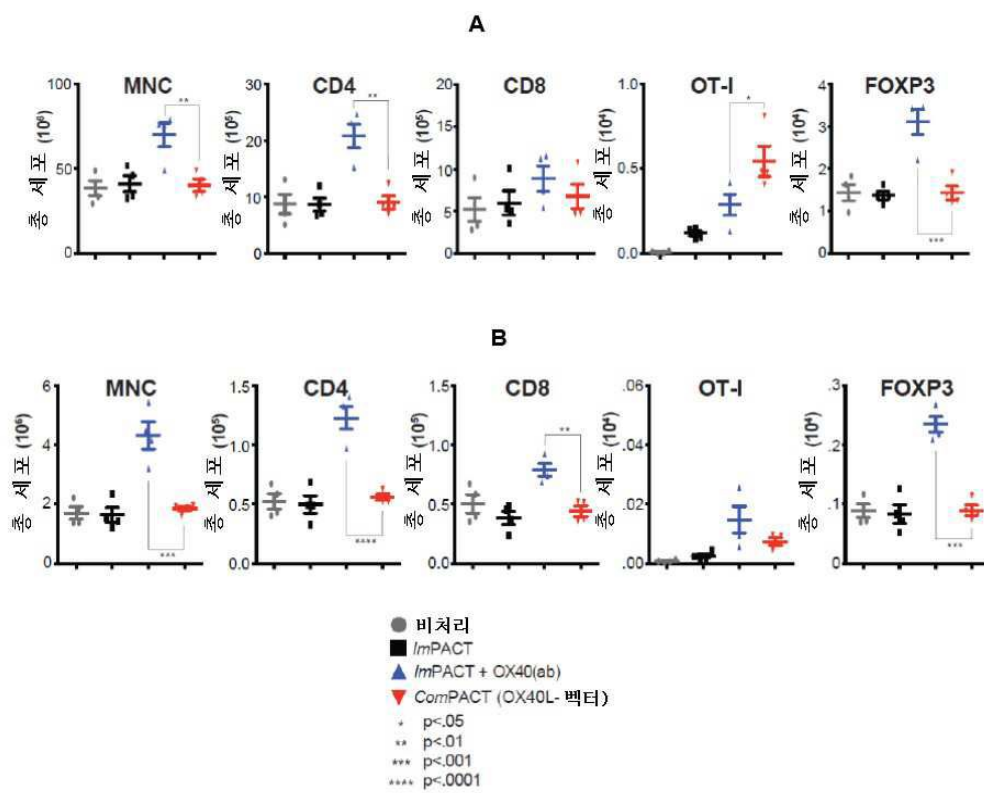
도면8d



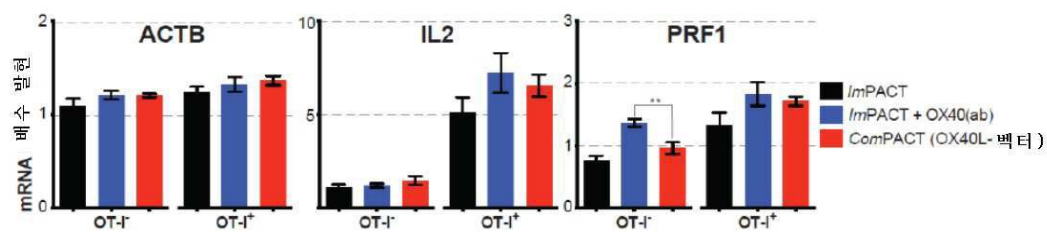
도면8e



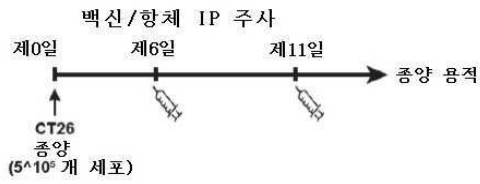
도면9ab



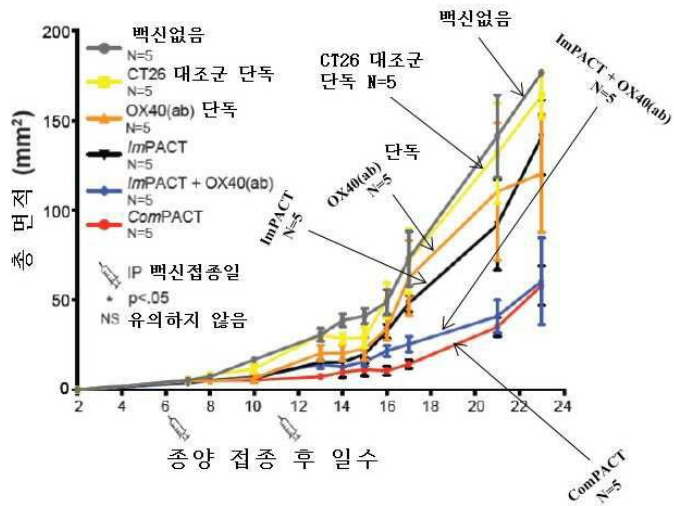
도면9c



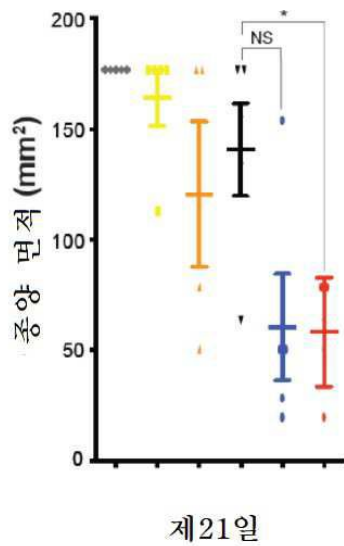
도면10a



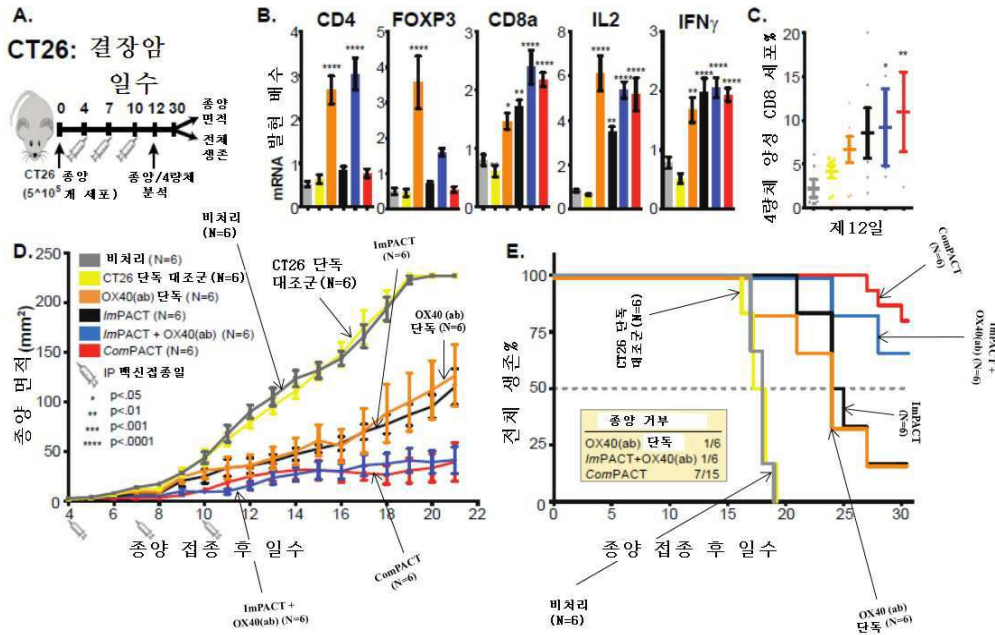
도면10b



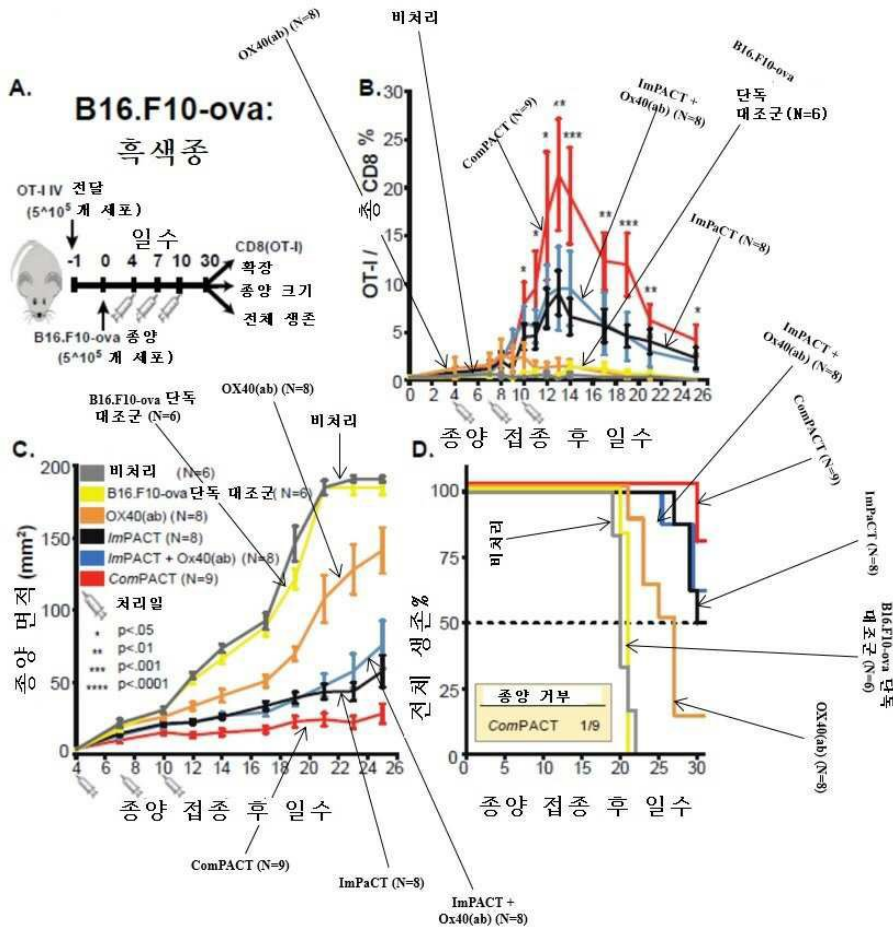
도면10c



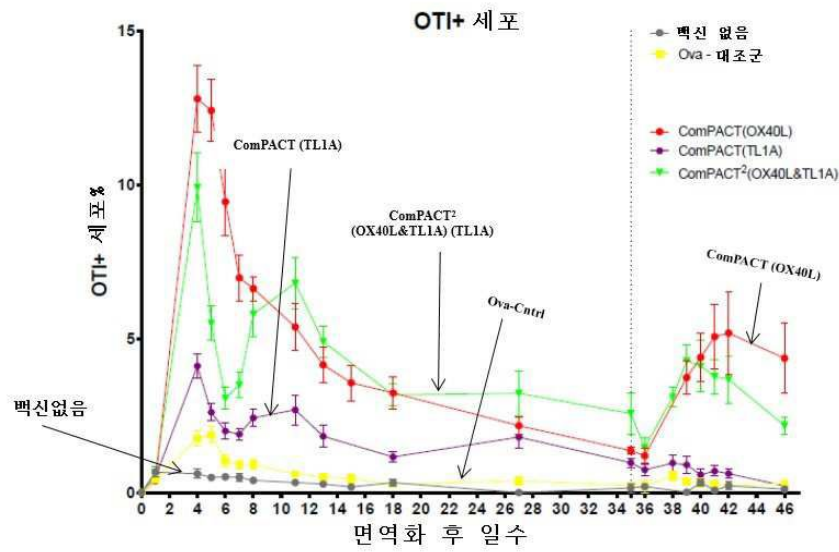
도면11



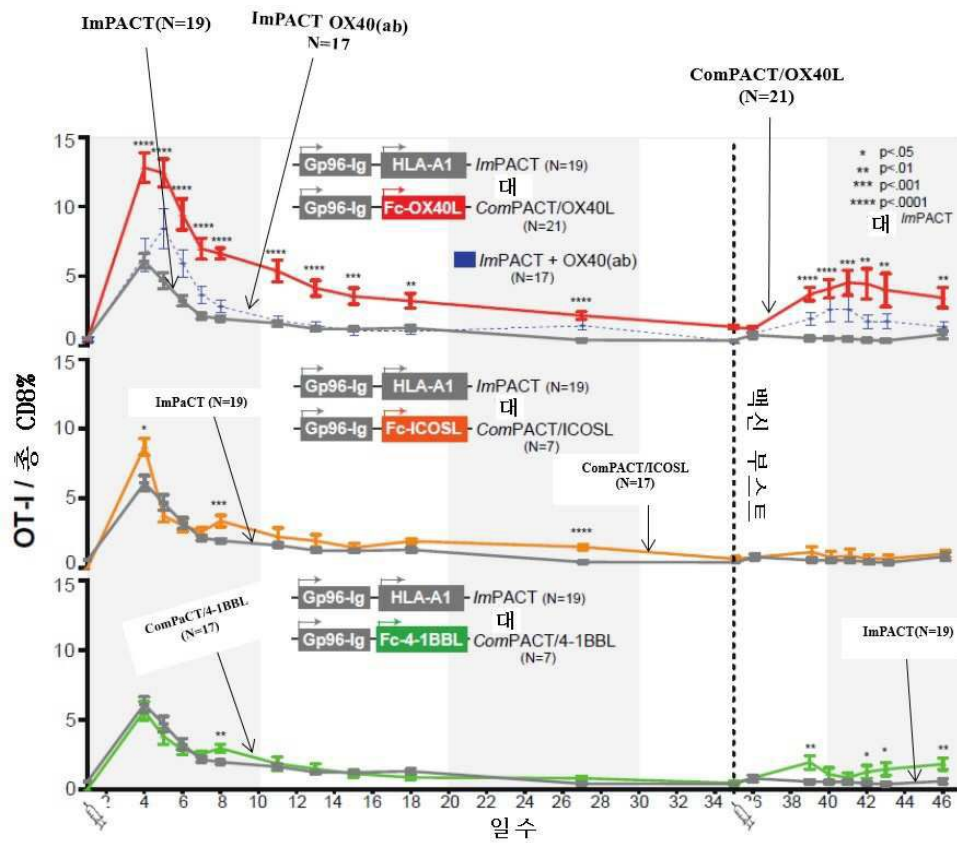
도면12



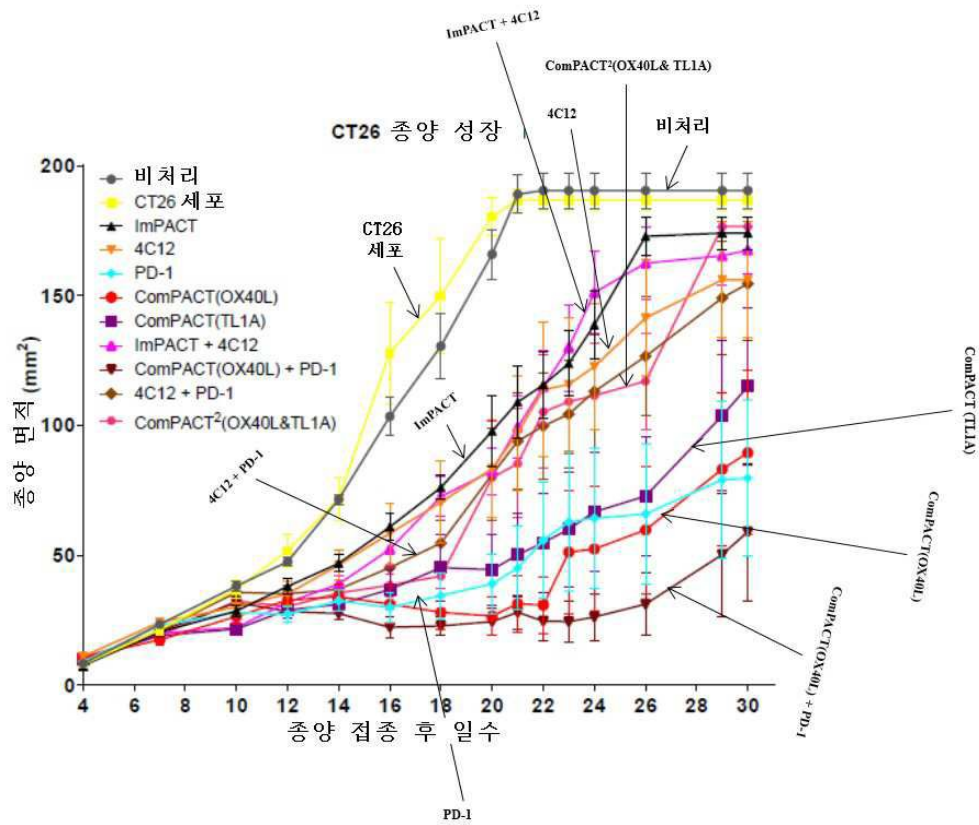
도면13



도면14

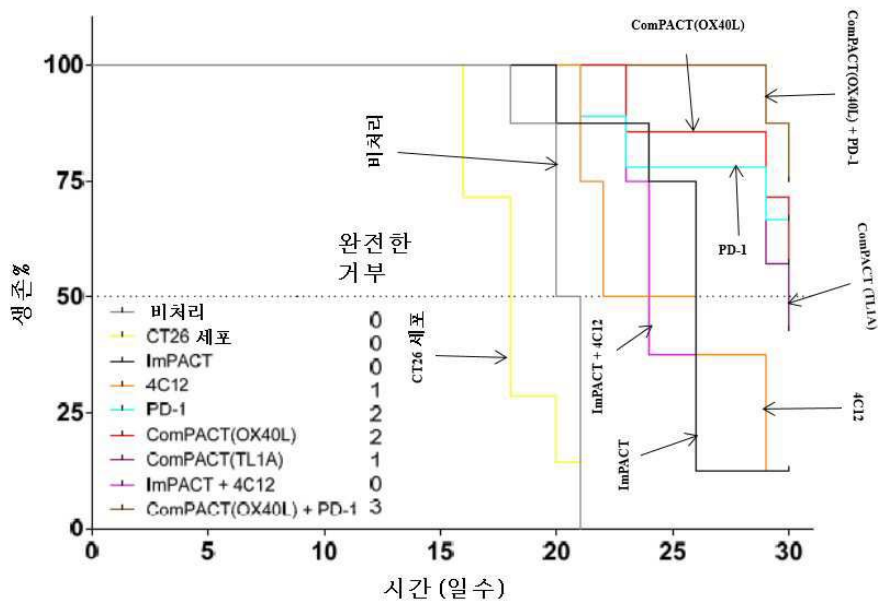


도면15

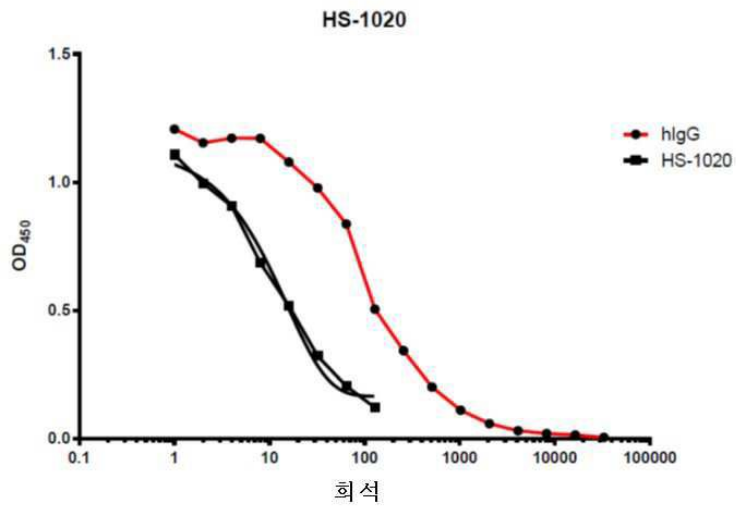


도면16

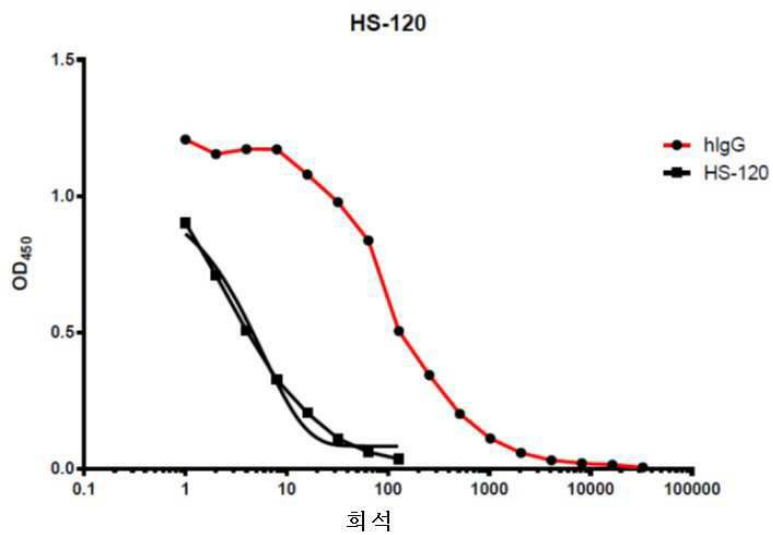
500,000 개 세포 접종
제4일, 제7일 및 제10일에 처리
생존 비율: 생존의 생존 #1



도면17



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Heat Biologics, Inc.

<120> VECTOR CO-EXPRESSING VACCINE AND COSTIMULATORY MOLECULES

<130> WO/2016/127015

<140> PCT/US2016/016682

<141> 2016-02-05

<150> US 62/113,153

<151> 2015-02-06

<150> US 62/174,942

<151> 2015-06-12

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2412

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgagggccc tgtgggtgct gggcctctgc tgcgtcctgc tgaccttcgg gtcggtcaga	60
gctgacgatg aagttgatgt ggatgggtaca gtagaagagg atctgggtaa aagtagagaa	120
ggatcaagga cggatgatga agtagtacag agagaggaag aagctattca gttggatgga	180
ttaaattgat cacaataaag agaacttaga gagaagtcgg aaaagtttgc cttccaagcc	240
gaagttaaca gaatgatgaa acttatcatc aattcatgtg ataaaaataa agagattttc	300
ctgagagAAC tgatttcaaa tgcttctgat gctttagata agataaggct aatatcactg	360
actgatgaaa atgctctttc tggaaatgag gaactaacag tcaaaattaa gtgtgataag	420
gagaagaacc tgctgcattg cacagacacc ggtgtaggaa tgaccagaga agagttggtt	480
aaaaaccttg gtaccatagc caaatctggg acaagcgagt ttttaacaa aatgactgaa	540
gcacaggaag atggccagtc aacttctgaa ttgattggcc agtttggtgt cggtttctat	600
tccgccttcc ttgtagcaga taaggttatt gtcacttcaa aacacaacaa cgataccag	660
cacatctggg agtctgactc caatgaattt tctgtaattg ctgaccaag aggaaacact	720
ctaggacggg gaacgacaat tacccttgtc ttaaaagaag aagcatctga ttaccttgaa	780
ttggatacaa ttaaaaatct cgtcaaaaaa tattcacagt tcataaactt tcctatttat	840
glatggagca gcaagactga aactgttgag gagcccatgg aggaagaaga agcagccaaa	900
gaagagaaag aagaatctga tgatgaagct gcagtagagg aagaagaaga agaaaagaaa	960
ccaaagacta aaaaagttga aaaaactgtc tgggactggg aacttatgaa tgatatcaaa	1020
ccaatatggc agagaccatc aaaagaagta gaagaagatg aatacaaacg tttctacaaa	1080
tcattttcaa aggaaagtga tgaccccatg gcttatattc actttactgc tgaaggggaa	1140
gttaccttca aatcaatttt atttgtacc acatctgctc cacgtggtct gtttgacgaa	1200
tatggatcta aaaaagcgca ttacattaag ctctatgtgc gccgtgtatt catcacagac	1260
gacttccatg atatgatgcc taaatactc aattttgtca aggtgtggt ggactcagat	1320
gatctccctt tgaatgtttc ccgcgagact cttcagcaac ataaactgct taaggtgatt	1380

aggaagaagc ttgttcgtaa aacgctggac atgatcaaga agattgctga tgataaatac 1440
aatgatactt ttggaaaga atttggtagc aacatcaagc ttggtgtgat tgaagaccac 1500
tcgaatcgaa cagctcttgc taaacttctt aggttccagt cttctcatca tccaactgac 1560
attactagcc tagaccagta tgtggaaaga atgaaggaaa aacaagacaa aatctacttc 1620
atggctgggt ccagcagaaa agagcctgaa tcttctccat ttgttgagcg acttctgaaa 1680
aaggctatg aagtatttta cctcacagaa cctgtggatg aatactgtat tcaggccctt 1740
cccgaatttg atgggaagag gttccagaat gttgccaagg aaggagtga gttcgatgaa 1800

agtgagaaaa ctaaggagag tcgtgaagca gttgagaaag aatttgagcc tctgctgaat 1860
tgatgaaag ataaagccct taaggacaag attgaaaagg ctgtggtgtc tcagcgcctg 1920
acagaatctc cggtgtcttt ggtggccagc cagtacggat ggtctggcaa catggagaga 1980
atcatgaaag cacaagcgt acaaacgggc aaggacatct ctacaaatta ctatgcgagt 2040
cagaagaaaa catttgaaat taatcccaga caccgctga tcagagacat gcttcgacga 2100
attaaggaag atgaagatga taaaacagtt ttggatcttg ctgtggtttt gtttgaaaca 2160
gcaacgcttc ggtcagggta tcttttacca gacactaaag catatggaga tagaatagaa 2220

agaatgcttc gcctcagttt gaacattgac cctgatgcaa aggtggaaga agagcccgaa 2280
gaagaacctg aagagacagc agaagacaca acagaagaca cagagcaaga cgaagatgaa 2340
gaaatggatg tggaacaga tgaagaagaa gaaacagcaa aggaatctac agctgaaaaa 2400
gatgaattgt aa 2412

<210> 2

<211> 803

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Ala Leu Trp Val Leu Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Thr Phe

1 5 10 15

Gly Ser Val Arg Ala Asp Asp Glu Val Asp Val Asp Gly Thr Val Glu

20 25 30

Glu Asp Leu Gly Lys Ser Arg Glu Gly Ser Arg Thr Asp Asp Glu Val

35 40 45

Val Gln Arg Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala Ser

50 55 60

Gln Ile Arg Glu Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Phe Ala Phe Gln Ala

65				70				75				80			
Glu	Val	Asn	Arg	Met	Met	Lys	Leu	Ile	Ile	Asn	Ser	Leu	Tyr	Lys	Asn
				85				90				95			
Lys	Glu	Ile	Phe	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Leu
				100				105				110			
Asp	Lys	Ile	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Thr	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly
				115				120				125			
Asn	Glu	Glu	Leu	Thr	Val	Lys	Ile	Lys	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu
				130				135				140			
Leu	His	Val	Thr	Asp	Thr	Gly	Val	Gly	Met	Thr	Arg	Glu	Glu	Leu	Val
145				150				155				160			
Lys	Asn	Leu	Gly	Thr	Ile	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu	Phe	Leu	Asn
				165				170				175			
Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Gln	Glu	Asp	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile
				180				185				190			
Gly	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Phe	Tyr	Ser	Ala	Phe	Leu	Val	Ala	Asp	Lys
				195				200				205			
Val	Ile	Val	Thr	Ser	Lys	His	Asn	Asn	Asp	Thr	Gln	His	Ile	Trp	Glu
210				215				220							
Ser	Asp	Ser	Asn	Glu	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Asp	Pro	Arg	Gly	Asn	Thr
225				230				235				240			
Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Thr	Ile	Thr	Leu	Val	Leu	Lys	Glu	Glu	Ala	Ser
				245				250				255			
Asp	Tyr	Leu	Glu	Leu	Asp	Thr	Ile	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	Lys	Tyr	Ser
				260				265				270			
Gln	Phe	Ile	Asn	Phe	Pro	Ile	Tyr	Val	Trp	Ser	Ser	Lys	Thr	Glu	Thr
275				280				285							
Val	Glu	Glu	Pro	Met	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Lys	Glu
290				295				300							
Glu	Ser	Asp	Asp	Glu	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys
305				310				315				320			

Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met
325 330 335

Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu
340 345 350

Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp
355 360 365

Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys
370 375 380

Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu
385 390 395 400

Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
405 410 415

Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe
420 425 430

Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg
435 440 445

Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu
450 455 460

Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr
465 470 475 480

Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val
485 490 495

Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe
500 505 510

Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val
515 520 525

Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser
530 535 540

Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys
545 550 555 560

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

565 570 575
 Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala
 580 585 590
 Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg

 595 600 605
 Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp
 610 615 620
 Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu
 625 630 635 640
 Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly
 645 650 655
 Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp

 660 665 670
 Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn
 675 680 685
 Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp
 690 695 700
 Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr
 705 710 715 720
 Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly

 725 730 735
 Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp
 740 745 750
 Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu
 755 760 765
 Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val
 770 775 780
 Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu Lys

 785 790 795 800
 Asp Glu Leu

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 4

<211> 1455

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 4

atgagactgg gaagccctgg cctgtgttt ctgtgttca gcagcctgag agccgacacc	60
caggaaaaag aagtgcgggc catggtggga agcgacgtgg aactgagctg cgcctgtcct	120
gagggcagca gattcgacct gaacgacgtg tacgtgtact ggcagaccag cgagagcaag	180
accgtcgtga cctaccacat cccccagaac agctccctgg aaaacgtgga cagccggtac	240
agaaaccggg ccctgatgtc tctgccggc atgtgagag gcgacttcag cctgcggctg	300
ttcaactga cccccagga cgagcagaaa ttccactgcc tggctgtgag ccagagcctg	360
ggcttccagg aagtgtgag cgtggaagtg accctgcacg tggccgcaa tticagcgtg	420
ccagtgggtg ctgccccca cagcccttct caggatgagc tgaccttcac ctgtaccagc	480
atcaacggct accccagacc caatgtgtac tggatcaaca agaccgaca cagcctgctg	540
gaccaggccc tgcagaacga taccgtgttc ctgaacatgc ggggcctgta cgacgtggtg	600
tccgtgctga gaatgccag aacccccagc gtgaacatcg gctgtgcat cgagaacgtg	660
ctgtgcagc agaacctgac cgtgggcagc cagaccggca acgacatcg cgagagagac	720
aagatcaccg agaaccctgt gtccaccggc gagaagaatg ccgccacctc taagtacggc	780
cctccctgcc cttcttgccc agccccgaa ttcttgggcg gacctccgt gtttctgttc	840
ccccaaagc ccaaggacac cctgatgac agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg	900
gtggatgtgt ccaggaaga tcccagggtg cagttcaatt ggtacgtgga cggggtggaa	960
gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gaacagtta acagcaccta ccgggtggtg	1020
tctgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgagcggca aagagtacaa gtgcaaggtg	1080
tccagcaagg gcctgccag cagcatcgaa aagaccatca gcaacgccac cggccagccc	1140

agggaacccc aggtgtacac actgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1200
 tccctgacct gtctcgtgaa gggctttctac cctccgata tcgccgtgga atgggagagc 1260
 aacggccagc cagagaacaa ctacaagacc accccccag tgctggacag cgacggctca 1320
 ttcttctgt actccccgct gacagtggac aagagcagct ggcaggaagg caacgtgttc 1380
 agctgcagcg tgatgcacga agccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtctctg 1440

tccctgggca aatga 1455

<210> 5

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 5

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu

1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp

20 25 30

Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn

35 40 45

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr

50 55 60

Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr

65 70 75 80

Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe

85 90 95

Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His

100 105 110

Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val

115 120 125

Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser

130 135 140

Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser

145 150 155 160

Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp

165 170 175

Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn

180 185 190

Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr

195 200 205

Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln

210 215 220

Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp

225 230 235 240

Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

245 250 255

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu

260 265 270

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

275 280 285

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

290 295 300

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

305 310 315 320

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

325 330 335

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser

340 345 350

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

355 360 365

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

370 375 380

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

385 390 395 400

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

405 410 415
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

420 425 430
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

435 440 445
Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

450 455 460
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

465 470 475 480
Ser Leu Gly Lys

<210> 6

<211> 1305

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 6

atgtctaagt acggccctcc ctgccctagc tgcctgccc ctgaatttct gggcggaccc 60
agcgtgttcc tgttccccc aaagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgaa 120
gtgacctgcg tgggtgtgga tgtgtcccag gaagatcccg aggtgcagtt caattggtac 180
gtggacggcg tgggaagtga caacccaag accaagcca gagaggaaca gttcaacagc 240
acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgag cggcaaagag 300
tacaagtga aggtgtccag caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaac 360

gccaccggcc agcccaggga accccaggtg tacacactgc cccctagcca ggaagagatg 420
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaagggt tctaccctc cgatatcgcc 480
gtggaatggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc cccagtgtg 540
gacagcgacg gctcattctt cctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagctggcag 600
gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 660
aagtcctgt ctctgagcct gggcaaggcc tgtccatggg ctgtgtctgg cgctagagcc 720
tctctggat ctgccgccag cccagactg agagagggac ctgagctgag ccccgatgat 780

cctgccggac tgctggatct gagacagggc atgttcgcc agctgggtggc ccagaacgtg 840

ctgctgacg atggccccct gagctggtac agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg 900
acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc aaagaactgg tggcggccaa ggccggcgtg 960
tactactgt tctttcagct ggaactgcgg agagtgggtg ccggcgaagg atccggctct 1020
gtgtctctgg ctctgcatct gcagccccctg agatctgctg ctggcgctgc tgctctggcc 1080
ctgacagtgg acctgcctcc tgcctctagc gaggccagaa acagcgcatc cgggtttcaa 1140
ggcagactgc tgcacctgtc tgccggccag agactgggag tgcatctgca cacagaggcc 1200

agagccaggc acgcctggca gctgactcag ggcgctacag tgctgggcct gttcagagt 1260
acccccgaga ttccagccgg cctgcctagc cccagatccg aatga 1305

<210> 7

<211> 434

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 7

Met Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala
225 230 235 240

Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu
245 250 255

Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
260 265 270

Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser
275 280 285

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
290 295 300

Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
305 310 315 320

Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
325 330 335

Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
340 345 350

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
355 360 365

Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
370 375 380

His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala

385 390 395 400
 Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
 405 410 415

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
 420 425 430
 Ser Glu

<210> 8

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 8

atgtctaagt acggccctcc ctgccctagc tgcctgccc ctgaatttct gggcggaccc	60
agcgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgaa	120
gtgacctgcg tgggtgtgga tgtgtcccag gaagatcccg aggtgcagtt caattggtac	180
gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccca gagaggaaca gttcaacagc	240
acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgag cggcaaagag	300
tacaagtgca aggtgtccag caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaac	360
gccaccggcc agcccaggga accccagggtg tacacactgc cccctagcca ggaagagatg	420
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaagggt tctacccctc cgatatcgcc	480
gtggaatggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc cccagtgtctg	540
gacagcgacg gctcattctt cctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagctggcag	600
gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag	660
aagtcctgt ctctgagcct gggcaagatc gagggccgga tggatagagc ccagggcgaa	720
gcctgcgtgc agttccaggc tctgaagggc caggaattcg ccccagcca ccagcaggtg	780
tacgcccctc tgagagccga cggcgataag cctagagccc acctgacagt cgtgcggcag	840
acctctacce agcacttcaa gaatcagttc cccgccctgc actgggagca cgaactgggc	900
ctggccttca ccaagaacag aatgaactac accaacaagt ttctgctgat ccccagagac	960
ggcgactact tcattctacg ccaagtgacc ttccggggca tgaccagcga gtgcagcgag	1020
atcagacagg ccggcagacc taacaagccc gacagcatca ccgtcgtgat caccaaagtg	1080

accgacagct accccgagcc caccagctg ctgatgggca ccaagagcgt gtgcgaagtg 1140
 ggcagcaact ggttccagcc catctacctg ggcgccatgt ttagtctgca agagggcgac 1200
 aagctgatgg tcaacgtgtc cgacatcagc ctggtggatt acaccaaaga ggacaagacc 1260
 ttcttcggcg cctttctgct ctga 1284

<210> 9

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 9

Met Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Arg Ala Gln Gly Glu
225 230 235 240

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
245 250 255

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
260 265 270

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
275 280 285

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
290 295 300

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
305 310 315 320

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
325 330 335

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
340 345 350

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
355 360 365

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
370 375 380

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
385 390 395 400

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
405 410 415

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu

420

425

<210> 10

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 10

atgtctaagt acggccctcc ctgccctagc tgcctgccc ctgaatttct gggcggaccc 60

agcgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgaa 120

gtgacctgcg tgggtgggga tgtgtcccag gaagatcccg aggtgcagtt caattggtac 180

gtggacggcg tggaagtgca caacccaag accaagccca gagaggaaca gttcaacagc 240

acctaccggg tgggtgtccgt gctgacctg ctgcaccagg attggctgag cggcaaagag 300

tacaagtgca aggtgtccag caaggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaac 360

gccaccggcc agcccaggga accccaggtg tacacactgc cccctagcca ggaagagatg 420

accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaagggt tctaccctc cgatatcgcc 480

gtggaatggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc cccagtgtg 540

gacagcgacg gctcattctt cctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagctggcag 600

gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 660

aagtccctgt ctctgagcct gggcaagatc gagggccgga tggatcaggt gtcacacaga 720

tacccccgga tccagagcat caaagtgcag ttaccgagt acaagaaaga gaagggttt 780

atcctgacca gccagaaaga ggacgagatc atgaagggtc agaacaacag cgtgatcatc 840

aactgcgacg ggttctacct gatcagcctg aagggtact tcagtcagga agtgaacatc 900

agcctgcaat accagaagga cgaggaaccc ctgttcagc tgaagaaagt gcggagcgtg 960

aacagcctga tgggtggcctc tctgacctac aaggacaagg tgtacctgaa cgtgaccacc 1020

gacaacacca gcctggacga ctccacgtg aacggcggcg agctgatcct gattcaccag 1080

aaccccggcg agttctgcgt gctctga 1107

<210> 11

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 11

Met Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95
Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190
Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Gln Val Ser His Arg
225 230 235 240
Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys

245 250 255
 Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
 260 265 270
 Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
 275 280 285

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
 290 295 300
 Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
 305 310 315 320
 Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
 325 330 335
 Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
 340 345 350

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 355 360 365

<210> 12

<211> 1588

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

tcccaagtag ctgggactac aggagccac caccacccc ggctaatttt ttgtattttt	60
agtagagacg gggtttcacc gtgttagcca agatggtctt gatcacctga cctcgtgatc	120
caccgcctt ggctcccaa agtgctggga ttacagcat gagccaccgc gcccggcctc	180
cattcaagtc ttattgaat atctgctatg ttctacacac tgttctaggt gctggggatg	240
caacagggga caaataggc aaaatccctg tccttttggg gttgacattc tagtgactct	300
tcatgtagtc tagaagaagc tcagtgaata gtgtctgtgg ttgttaccag ggacacaatg	360
acaggaacat tcttgggtag agtgagaggc ctggggaggg aagggtctct aggatggagc	420
agatgctggg cagtcttagg gagccctcc tggcatgcac cccctcatcc ctcaggccac	480
ccccgtccct tgcaggagca ccctggggag ctgtccagag cgctgtgccg ctgtctgtgg	540
ctggaggcag agtaggtggt gtgctgggaa tgcgagtggg agaactggga tggaccgagg	600
ggaggcgggt gaggaggggg gcaaccaccc aacaccacc agctgctttc agtgttctgg	660

gtccagggtgc tcttggctgg ccttgtggtc ccctcctgc ttggggccac cctgacctac 720
acataccgcc actgctggcc tcacaagccc ctggttactg cagatgaagc tgggatggag 780
gctctgacct caccaccggc caccatctg tcacccttgg acagcgccca cacccttcta 840
gcacctcctg acagcagtga gaagatctgc accgtccagt tgggtggtaa cagctggacc 900
cctggctacc ccgagaccca ggaggcgtc tgcccgcagg tgacatggtc ctgggaccag 960
ttgccagca gagctcttgg ccccgctgct gcgcccacac tctcgccaga gtccccagcc 1020
ggctcgccag ccatgatgct gcagccgggc ccgcagctct acgacgtgat ggacgcggtc 1080

ccagcgccgc gctggaagga gttcgtgcgc acgtggggc tgcgcgaggc agagatcgaa 1140
gccgtggagg tggagatcgg ccgcttccga gaccagcagt acgagatgct caagcgctgg 1200
cgccagcagc agcccgcggg cctcggagcc gtttacgcgg ccctggagcg catggggctg 1260
gacggctgcg tgggaagactt gcgcagccgc ctgcagcgcg gccctgaca cggcgccac 1320
ttgccaccta ggcgctctgg tggcccttgc agaagcccta agtacggtta cttatgcgtg 1380
tagacatttt atgtcactta ttaagccgct ggcacggccc tgcgtagcag caccagccgg 1440
ccccaccct gctgcacct atcgctccag ccaaggcgaa gaagcacgaa cgaatgtcga 1500

gagggggtga agacatttct caacttctcg gccggagttt ggctgagatc gcggtattaa 1560
atctgtgaaa gaaaacaaaa caaaacaa 1588

<210> 13

<211> 426

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg

20 25 30

Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys

35 40 45

Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro

50 55 60

Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala

65 70 75 80

Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp

85 90 95
Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp

100 105 110
Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser

115 120 125
Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys

130 135 140
Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr

145 150 155 160
Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys

165 170 175
Val Ser Cys Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Ala Gly Ala Pro Trp Gly

180 185 190
Ala Val Gln Ser Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Gly Gly Arg Val Gly

195 200 205
Val Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu

210 215 220
Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys

225 230 235 240
Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro

245 250 255
Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala

260 265 270
Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn

275 280 285
Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln

290 295 300
Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala

305 310 315 320
Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met

325 330 335

Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro

340 345 350

Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala

355 360 365

Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln

370 375 380

Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly

385 390 395 400

Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu

405 410 415

Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro

420 425

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 14

ctgccacggc acagtcattg 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 15

gccagttcct ccagatatcc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 16

ccacgtcttt ctgtctactg	20
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic sequence	
<400> 17	
gccatagaac tgatgagagg g	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic sequence	
<400> 18	
ctactgctga ccttgtctct g	21
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic sequence	
<400> 19	
agtaaggcca tgtagggtcg	20
<210> 20	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic sequence	
<400> 20	
ctgcggcatg ttctggattt gact	24
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Synthetic sequence

<400> 21

agtcaccac agttgctgac tcat 24

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 22

gacacagtag agtgcgcat g 21

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 23

aagcatgctc tgtggagctg 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 24

aaggccaacc gtgaaaagat 20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 25

gtggtacgac cagaggcata c 21

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 6

<

212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 30

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 31

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 32

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 33

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 34

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 35

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 36

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr

1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 37

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 38

<211> 852

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

```
atggagcctc ctggagactg ggggcctcct ccttgagat ccaccccaa aaccgacgtc      60
ttgaggctgg tgctgtatct caccttcctg ggagccccct gctacgcccc agctctgccg    120
tcctgcaagg aggacgagta cccagtgggc tccgagtgtt gcccgaagtg cagtccaggt    180
tatcgtgtga aggaggcctg cggggagctg acgggcacag tgtgtgaacc ctgccctcca    240
ggcacctaca ttgcccacct caatggccta agcaagtgtc tgcagtgcc aatgtgtgac      300
ccagccatgg gcctgcgcgc gagccggaac tgctccagga cagagaacgc cgtgtgtggc     360
tgcagcccag gccatttctg catcgtccag gacggggacc actgcgccgc gtgccgcgct     420
```

```
tacgccacct ccagcccggg ccagagggtg cagaaggag gcaccgagag tcaggacacc      480
ctgtgtcaga actgcccccc ggggaccttc tctccaatg ggaccctgga ggaatgtcag     540
caccagacca agtcagctg gctggtgacg aaggccggag ctgggaccag cagctcccac     600
tgggtatggt gggtttcttc agggagcctc gtcacgttca ttgtttgtc cacagtggc      660
ctaatacatat gtgtgaaaag aagaaagcca aggggtgatg tagtcaaggt gatcgtctcc     720
gtccagcgga aaagacagga ggcagaaggt gagggcacag tcattgaggc cctgcaggcc     780
cctccggacg tcaccacggt ggccgtggag gagacaatac cctcattcac ggggaggagc     840
```

```
ccaaaccatt aa                                                                852
```

<210> 39

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

```
Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro
1           5           10           15
Lys Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala
          20           25           30
Pro Cys Tyr Ala Pro Ala Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro
          35           40           45
Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys
```

50 55 60
 Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro
 65 70 75 80
 Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys
 85 90 95
 Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser
 100 105 110

 Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile
 115 120 125
 Val Gln Asp Gly Asp His Cys Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Ala Thr Ser
 130 135 140
 Ser Pro Gly Gln Arg Val Gln Lys Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Cys Gln Asn Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Pro Asn Gly Thr Leu
 165 170 175

 Glu Glu Cys Gln His Gln Thr Lys Cys Ser Trp Leu Val Thr Lys Ala
 180 185 190
 Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ser His Trp Val Trp Trp Phe Leu Ser Gly
 195 200 205
 Ser Leu Val Ile Val Ile Val Cys Ser Thr Val Gly Leu Ile Ile Cys
 210 215 220
 Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val Ser
 225 230 235 240

 Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile Glu
 245 250 255
 Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu Thr
 260 265 270
 Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
 275 280

 <210> 40
 <211> 4900
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

taaagtcac	aaaacaacgt	tatatcctgt	gtgaaatgct	gcagtcagga	tgccttgtgg	60
tttgagtgc	ttgatcatgt	gccctaaggg	gatggtggcg	gtggtggtgg	ccgtggatga	120
cggagactct	caggccttgg	cagggtgcgtc	tttcagtcc	cctcacactt	cgggttcctc	180
ggggaggagg	ggctggaacc	ctagcccatc	gtcaggacaa	agatgctcag	gtgctcttg	240
gctctcaact	tattcccttc	aattcaagta	acaggaaaca	agattttgg	gaagcagtcg	300
cccatgcttg	tagcgtacga	caatgcggtc	aaccttagct	gcaagtatc	ctacaatctc	360
ttctcaaggg	agttccgggc	atcccttcac	aaaggactgg	atagtgtgt	ggaagtctgt	420
gttgtatatg	ggaattactc	ccagcagctt	caggtttact	caaaaacggg	gttcaactgt	480
gatgggaaat	tgggcaatga	atcagtga	ttctacctcc	agaatttga	tgtaaccaa	540
acagatattt	acttctgcaa	aattgaagt	atgtatcctc	ctccttacct	agacaatgag	600
aagagcaatg	gaaccattat	ccatgtgaaa	gggaaacacc	tttgtccaag	tcccctattt	660
cccggacctt	ctaagccctt	ttgggtgctg	gtggtggttg	gtggagtcct	ggcttgctat	720
agcttgctag	taacagtggc	ctttattatt	ttctgggtga	ggaglaagag	gagcaggctc	780
ctgcacagtg	actacatgaa	catgactccc	cgcgcgcccg	ggcccaccg	caagcattac	840
cagccctatg	ccccaccag	cgacttcgca	gcctatcgct	cctgacacgg	acgcctatec	900
agaagccagc	cggctggcag	cccccatctg	ctcaatatca	ctgctctgga	taggaaatga	960
ccgccatctc	cagccggcca	cctcaggccc	ctgttgggcc	accaatgcca	atttttctcg	1020
agtgactaga	ccaaatatca	agatcatttt	gagactctga	aatgaagtaa	aagagatttc	1080
ctgtgacagg	caaagtctta	cagtgccatg	gcccacattc	caacttacca	tgtacttagt	1140
gacttgactg	agaagttagg	gtagaaaaca	aaaaggaggt	ggattctggg	agcctcttcc	1200
ctttctcact	cacctgcaca	tctcagtcaa	gcaaagtgtg	gtatccacag	acattttagt	1260
tgcagaagaa	aggctaggaa	atcattcctt	ttggttaa	gggtgtttaa	tcttttggtt	1320
agtgggttaa	acggggtaag	ttagagtagg	gggagggata	ggaagacata	tttaaaaacc	1380
attaaaacac	tgctctccac	tcatgaaatg	agccacgtag	ttcctattta	atgctgtttt	1440
ccttttagttt	agaaatacat	agacattgtc	ttttatgaat	tctgatcata	tttagtcatt	1500
ttgaccaa	atgaggatttg	gtcaaatgag	ggattccctc	aaagcaatat	caggtaaacc	1560
aagttgcttt	cctcactccc	tgatcatgaga	cttcagtgtt	aatgttcaca	atatactttc	1620
gaaagaataa	aatagttctc	ctacatgaag	aaagaatatg	tcaggaaata	aggctcattt	1680
atgtcaaaat	tatttgagta	ctatgggacc	tggcgagtg	gctcatgctt	gtaatcccag	1740

cactttggga ggccgaggtg ggcagatcac ttgagatcag gaccagcctg gtcaagatgg	1800
tgaactccg tctgtactaa aaatacaaaa tttagcttgg cctggtggca ggcacctgta	1860
atcccagctg cccaagaggc tgaggcatga gaatcgcttg aacctggcag gcggaggttg	1920
cagttagccg agatagtgcc acagctctcc agcctgggcg acagagttag actccatctc	1980
aaacaacaac aacaacaaca acaacaacaa caaaccacaa aattatttga gtactgtgaa	2040
ggattatttg tctaacagtt cattccaatc agaccaggta ggagctttcc tgtttcatat	2100
gtttcaggtg tgcacagttg gtctctttta tgcggtgtg gagatccaaa gtgggttgtg	2160
gaaagagcgt ccataggaga agtgagaata ctgtgaaaaa gggatgttag cattcattag	2220
agtatgagga tgagtcccaa gaaggttctt tggaaggagg acgaatagaa tggagtaatg	2280
aaattcttgc catgtgtcga ggagatagcc agcattaggt gacaatcttc cagaagtgg	2340
caggcagaag gtgccctggt gagagctcct ttacaggac tttatgtggt ttagggctca	2400
gagctccaaa acitctgggt cagctgctcc tgtaccttg aggtccattc acatgggaaa	2460
gtattttgga atgtgtcttt tgaagagagc atcagagttc ttaagggact gggtaggcc	2520
tgacctgaa atgacctgg atatttttct acctacagtt tgagtcaact agaatatgcc	2580
tggggacctt gaagaatggc ccttcagtgg cctcaccat ttgttcatgc ttcagttaat	2640
tcagggtgtg aaggagctta ggttttagag gcacgtagac ttggttcaag tctcgttagt	2700
agttgaatag cctcaggcaa gtcactgccc acctaatg atggttcttc aactataaaa	2760
tggagataat ggttacaaat gtctcttctc atagtataat ctccataagg gcatggccca	2820
agtctgtctt tgactctgcc taccctgac atttagtagc atgcccga tacaatgtta	2880
gctatttggt tttattgcat atagataaat tatgtataaa aattaaactg ggcaatagcc	2940
taagaagggg ggaatatgt aacacaaatt taaaccact acgcaggat gaggtgctat	3000
aatatgagga ccttttaact tccatcattt tctgtttct tgaaatagtt tatcttgtaa	3060
tgaatatata ggcacctccc acttttatgt atagaaagag gtcitttaat tttttttaa	3120
tgtgagaagg aaggaggag taggaatctt gagattccag atcgaaaata ctgtactttg	3180
gttgattttt aagtgggctt ccattccatg gatttaatca gtccaagaa gatcaaaactc	3240
agcagtactt ggtgtctgaa gaactgttgg atttaccctg gcacgtgtgc cacttgccag	3300
cttcttgggc acacagagtt cttcaatcca agttatcaga ttgtatttga aaatgacaga	3360
gctggagagt tttttgaaat ggcagtggca aataaataaa tacttttttt taaatggaaa	3420
gacttgatct atggtaataa atgattttgt tttctgactg gaaaaatagg cctactaaag	3480

atgaatcaca cttagatgt ttttactca ctctgcacag aaacaaagaa gaaatgttat 3540
 acaggaagt ccgttttcat tattagtatg aaccaagaaa tgggtcaaaa acagtggtag 3600
 gagcaatgct ttcatagttt cagatatggt agttatgaag aaaacaatgt catttgctgc 3660
 tattattgta agagtcttat aattaatggt actcctataa tttttgattg tgagctcacc 3720
 tatttgggtt aagcatgcca atttaagag accaagtgtg tgtacattat gttctacata 3780
 ttcagtata aaattactaa actactatat gtctgcttta aatttgact ttaatatgt 3840
 cttttggtat taagaaagat atgctttcag aatagatatg cttcgctttg gcaaggaatt 3900

tggatagaac ttgtattta aaagaggtgt ggggtaaatc cttgtataaa tctccagttt 3960
 agcctttttt gaaaaagcta gactttcaaa tactaatttc acttcaagca gggtagcttt 4020
 ctggtttgtt tgcttgactt cagtcacaat tttttatcag accaatggct gacctctttg 4080
 agatgtcagg ctaggcttac ctatgtgttc tgtgtcatgt gaatgctgag aagtttgaca 4140
 gagatccaac ttcagccttg acccatcag tccctcgggt taactaactg agccaccggt 4200
 cctcatggct attttaatga gggattgat ggttaaatgc atgtctgac cttatccca 4260
 gccatttga ctgccagctg ggaactatac cagacctgga tactgatccc aaagtgttaa 4320

attcaactac atgctggaga ttagagatgg tgccaataaa ggaccagaa ccaggatctt 4380
 gattgctata gacttattaa taatccaggt caaagagagt gacacacact ctctcaagac 4440
 ctggggtgag ggagtctgtg ttatctgcaa ggccatttga ggctcagaaa gtctctcttt 4500
 cctatagata tatgcatct tctgacata taggaatgta tcaggaatac tcaaccatca 4560
 caggcatgtt cctacctcag ggcttttaca tgcctgttt actctgtcta gaatgtcctt 4620
 ctgtagatga cctggcttgc ctctgcaccc ttcaggctct tgcitcaagt tcattctctc 4680
 ccctagttaa actacccac accctgtctg ctttcttgc ttatttttct ccatagcatt 4740

ttaccatctc ttacattaga catttttctt atttattgt agtttataag cttcatgagg 4800
 caagtaactt tgctttgttt cttgctgtat ctccagtgcc cagagcagt cctggtatat 4860
 aataaatatt tattgactga gtgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4900

<210> 41

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

<210> 42

<211

> 1906

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

ccaagtcaca tgattcagga ttcaggggga gaatccttct tggaacagag atgggccag

60

aactgaatca gatgaagaga gataaggtgt gatgtgggga agactatata aagaatggac	120
ccagggtgc agcaagcact caacggaatg gccctcctg gagacacagc catgcatgtg	180
ccggcgggct ccgtggccag ccacctgggg accacgagcc gcagctatit ctatttgacc	240
acagccactc tggctctgtg ccttctcttc acggtggcca ctattatggt gttggctgtt	300
cagaggacgg actccattcc caactcacct gacaacgtcc ccctcaaagg aggaaattgc	360
tcagaagacc tcttatgtat cctgaaaaga gctccattca agaagtcatg ggcctacctc	420
caagtggcaa agcatctaaa caaaaccaag ttgtcttggga acaaagatgg cattctccat	480
ggagtcagat atcaggatgg gaatctggtg atccaattcc ctggttttga cttcatcatt	540
tgccaactgc agtttcttgt acaatgccc aataattctg tcgatctgaa gttggagctt	600
ctcatcaaca agcatatcaa aaaacaggcc ctggtgacag tgtgtgagtc tggaaatgcaa	660
acgaaacacg tataccagaa tctctctcaa ttcttctggtg attacctgca ggtcaacacc	720
accatatcag tcaatgtgga tacattccag tacatagata caagcacctt tcctcttgag	780
aatgtgttgt ccatcttctt atacagtaat tcagactgaa cagtttctct tggccttcag	840
gaagaaagcg cctctctacc atacagtatt tcatccctcc aaacacttgg gcaaaaagaa	900
aactttagac caagacaaac tacacagggt attaaatagt atacttctcc ttctgtctct	960
tggaaagata cagctccagg gttaaaaaga gagtttttag tgaagtatct ttcagatagc	1020
aggcagggaa gcaatgtagt gtgggtgggca gagccccaca cagaatcaga agggatgaat	1080
ggatgtccca gccaaccac taattcactg tatggtcttg atctatttct tctgttttga	1140
gagcctccag ttaaaatggg gcttcagtac cagagcagct agcaactctg ccctaattggg	1200
aaatgaaggg gagctgggtg tgagtgttta cactgtgccc ttcacgggat acttctttta	1260
tctgcagatg gcctaagtct tagttgtcca agtcgcgac aaggactctc tcacacagga	1320
aacttccta tactggcaga tacacttgtg actgaacat gccagttta tgcctgtctg	1380
actgtcactc tggcactagg aggctgatct tgtactccat atgacccac ccctaggaac	1440
ccccagggaa aaccaggctc ggacagcccc ctgttctga gatggaaagc acaaatttaa	1500
tacaccacca caatggaaaa caagttcaaa gacttttact tacagatcct ggacagaaag	1560
ggcataatga gtctgaaggg cagtctcct tctccaggtt acatgaggca ggaataagaa	1620
gtcagacaga gacagcaaga cagttaacaa cgtaggtaaa gaaatagggt gtggtcactc	1680
tcaattcact ggcaaatgcc tgaatggtct gtctgaagga agcaacagag aagtggggaa	1740
tccagtctgc taggcaggaa agatgcctct aagtcttgt ctctggccag aggtgtggtg	1800
tagaaccaga aaccatatac aagggtgact aagcccggt tccggtatga gaaattaaac	1860
ttgtatacaa aatggttgcc aaggcaacat aaaattataa gaattc	1906

<210> 43

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly

1 5 10 15
Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly

20 25 30
Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu

35 40 45
Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg

50 55 60
Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly

65 70 75 80
Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys

85 90 95
Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys

100 105 110
Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp

115 120 125
Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln

130 135 140
Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu

145 150 155 160
Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val

165 170 175
Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln

180 185 190
Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val

195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val

210

215

220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp

225

230

<210> 44

<211> 1629

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

tttcctgggc ggggccaagg ctggggcagg ggagtcagca gaggcctcgc tcgggcgccc 60
agtggctcgt ccgcctgggc tcacctcgtc atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc 120
tggggtcgtc tgcctgaccg tgtccatcca gaaccacca ctgcatgcag agaaaaacag 180

tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac 240
tgcacagagt tcaactgaac ggaatgcctt ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc 300
tggaacagag agacacactg ccaccagcac aaatactgcg accccaacct agggcttcgg 360
gtccagcaga agggcacctc agaaacagac accatctgca cctgtgaaga aggctggcac 420
tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg 480
gtcaagcaga ttgttacagg ggtttctgat accatctgcg agccctgccc agtcggcttc 540
ttctccaatg tgtcatctgc ttctgaaaaa tgtcacctt ggacaagctg tgagacaaaa 600

gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaaac aagactgatg ttgtctgtgg tccccaggat 660
cggctgagag ccctggtggt gatcccatc atcttcggga tctgtttgc catcctcttg 720
gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag aagccaacca ataaggcccc ccacccaag 780
caggaacccc aggagatcaa ttttccgac gatcttctg gctccaacac tgctgtcca 840
gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg gtcaccagg aggatggcaa agagagtcgc 900
atctcagtgc aggagagaca gtgaggctgc acccaccag gagtgtggcc acgtgggcaa 960
acaggcagtt ggccagagag cctggtgctg ctgctgctgt ggctgaggg tgaggggctg 1020

gcactgactg ggcatagctc cccgtttctg cctgcacccc tgcagtttga gacaggagac 1080
ctggcactgg atgcagaaac agttcacctt gaagaacctc tcacttcacc ctggagccca 1140
tccagtctcc caacttgtat taaagacaga ggcagaagtt tgggtggtgt ggtgttgggg 1200
tatggtttag taatatccac cagaccttcc gatccagcag tttggtgccc agagaggcat 1260
catggtggct tccttgcgcc caggaagcca tatacacaga tgccattgc agcattgttt 1320
gtgatagtga acaactggaa gctgcttaac tgtccatcag caggagactg gctaaataaa 1380

attagaatat attatataca cagaatctca aaaacactgt tgagtaagga aaaaaaggca 1440

tgctgctgaa tgatgggtat ggaacttttt aaaaaagtac atgcttttat gtatgtatat 1500

tgccatatgga tatatgtata aatacaatat gcatcatata ttgatataac aagggttctg 1560

gaagggtaca cagaaaaccc acagctcgaa gagtgggtgac gtctgggggtg gggaagaagg 1620

gtctggggg 1629

<210> 45

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr

1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val

35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu

50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr

100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly

115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu

130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys

145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln

165 170 175
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln

275

<210> 46

<211> 913

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

ccagagaggg gcaggctggt cccctgacag gttgaagcaa gtagacgccc aggagccccg 60
ggaggggggt gcagtttctt tcttctcttc tcggcagcgc tccgcgcccc catcgccctt 120
cctgcgctag cggaggtgat cgccgcggcg atgccggagg agggttcggg ctgctcggtg 180
cggcgcaggc cctatgggtg cgctctgcgg gctgctttgg tccattggt cgcgggcttg 240
gtgatctgcc tcgtggtgtg catccagcgc ttgcacagg ctcagcagca gctgccgctc 300
gagtcacttg ggtagggact agctgagctg cagctgaatc acacaggacc tcagcaggac 360

cccagctat actggcaggg gggcccagca ctgggccgct ccttcttgca tggaccagag 420
ctggacaagg ggcagctacg tatccatcgt gatggcatct acatggtaca catccaggtg 480
acgtggcca tctgctctc cagcagggc tccaggcacc acccaccac cctggccgtg 540
ggaatctgct ctccgcctc ccgtagcatc agcctgtgc gtctcagctt ccaccaaggt 600
tgtaccattg cctcccagcg cctgacgccc ctggcccag gggacacact ctgcaccaac 660
ctcactggga cacttttgcc ttccgaaac actgatgaga ccttctttgg agtcagtggt 720

gtgcgccct gaccactgct gctgattagg gttttttaaa ttttatttta ttttatttaa 780

gttcaagaga aaaagtgtac acacaggggc caccgggggt tggggtggga gtgtgggtggg 840

gggtagtggt ggcaggacaa gagaaggcat tgagcttttt ctttcatttt cctattaaaa 900

aatacaaaaa tca 913

<210> 47

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly

1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile

20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu

35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His

50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala

65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu

85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu

100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu

115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg

130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro

145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu

165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg

180

185

190

Pro

<210> 48

<211> 723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagt tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60
ttcacgaggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120
ggtctcttgc tgttgcctgat gggggccggg ctggccgtcc aaggttggtt cctcctgcag 180

ctgcactggc gtctaggaga gatggtcacc cgctgcctg acggacctgc aggtcctgg 240
gagcagctga tacaagagcg aaggtctcac gaggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300
gccaaactcca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca gctgggcctg 360
gccttcctga ggggcctcag ctaccacgat ggggccttg tggtcacaa agctggctac 420
tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgtggg cctggccagc 480
accatcacc acggcctcta caagcgaca ccccgctacc cagaggagct ggagctgttg 540
gtcagccagc agtcaccctg cggacgggcc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600

agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggagg aggtggtcgt ccgtgtgctg 660
gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggtctt acttcggggc tttcatggtg 720
tga 723

<210> 49

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln

1

5

10

15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser

20

25

30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Met Gly

35	40	45	
Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg			
50	55	60	
Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp			
65	70	75	80
Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala			
85	90	95	
His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu			
100	105	110	
Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr			
115	120	125	
His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr			
130	135	140	
Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser			
145	150	155	160
Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu			
165	170	175	
Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser			
180	185	190	
Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His			
195	200	205	
Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu			
210	215	220	
Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val			
225	230	235	240