



등록특허 10-2833272



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월10일

(11) 등록번호 10-2833272

(24) 등록일자 2025년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/06 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/06 (2013.01)

A61K 39/0011 (2025.01)

(21) 출원번호 10-2018-7006157

(22) 출원일자(국제) 2016년08월01일

심사청구일자 2021년06월23일

(85) 번역문제출일자 2018년03월02일

(65) 공개번호 10-2018-0054587

(43) 공개일자 2018년05월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/044977

(87) 국제공개번호 WO 2017/023840

국제공개일자 2017년02월09일

(30) 우선권주장

62/200,497 2015년08월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2014186047 A1

WO2012125998 A1

(73) 특허권자

글로브이문

미국 콜로라도 80027 루이스빌 인피니트 드라이브 1450

더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리프리젠티드 바이 더 세크레터리, 디파트먼트 오브 헬스 앤드 휴먼 서비스즈

미국, 메릴랜드 20892, 메서스다, 엠에스 7788, 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스티튜츠 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼

(72) 발명자

킹 토마스 에이치.

미국 80212 콜로라도주 덴버 페리 스트리트 4105

귀 지민

미국 80027 콜로라도주 수페리어 휴론 피크 애비뉴 3130

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

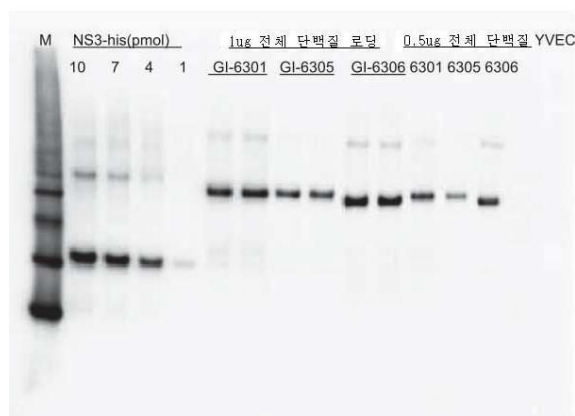
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 변형된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물

(57) 요약

변형된 브라큐리 항원을 포함하는 개선된 효모-기반의 면역치료학적 조성물 및 브라큐리의 발현 또는 과발현이 특징적인 암을 예방 및/또는 치료하는 방법이 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/82 (2013.01)

A61K 2039/51 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

A61K 2039/6006 (2024.08)

(72) 발명자

슈름 제프리

미국 20854 메릴랜드주 포토맥 소렐 애비뉴 10301

팔레나 클라우디아

미국 20854 메릴랜드주 포토맥 파우더 혼 드라이브
11136

명세서

청구범위

청구항 1

브라큐리를 발현하는 암을 치료하는데 사용하기 위한, 주사용 현탁액으로 제형화된 효모-브라큐리 조성물 (yeast-Brachyury composition)로서,

상기 조성물이

- a) 효모;
- b) 효모에 의해 발현되는 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하며,

상기 변형된 브라큐리 항원이, 서열번호 10, 서열번호 10의 2-410번, 서열번호 13, 또는 서열번호 13의 2-410번을 포함하는 아미노산 서열을 가지고,

상기 변형된 브라큐리 항원이, 서열번호 4의 야생형 브라큐리의 198-222번 위치의 결손으로 인해 서열번호 4의 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가지고,

상기 브라큐리 항원이 야생형 브라큐리와 비교해 손상된 DNA 결합부를 가지며,

상기 효모는 야생형 브라큐리를 발현하는 효모와 비교해 감소된 응집 표현형 (flocculation phenotype)을 가지는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변형된 브라큐리 항원이 서열번호 12 또는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열을 가진 융합 단백질인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물이 개체에게 투여하기 위한 약제학적으로 허용가능한 부형제 중에 제형화된, 조성물.

청구항 4

브라큐리를 발현하는 암을 치료하는데 사용하기 위한, 주사용 현탁액으로 제형화된 효모-브라큐리 조성물로서,

- a) 불활성화된 전효모 (whole, inactivated yeast); 및
- b) 서열번호 10의 2-410번 위치의 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질을 포함하고,

상기 브라큐리 융합 단백질이 상기 효모에 의해 발현된 것이며,

상기 효모는 야생형 브라큐리를 발현하는 효모와 비교해 감소된 응집 표현형 (flocculation phenotype)을 가지는, 조성물.

청구항 5

브라큐리를 발현하는 암을 치료하는데 사용하기 위한, 주사용 현탁액으로 제형화된 효모-브라큐리 조성물로서,

- a) 불활성화된 전효모; 및
- b) 서열번호 13의 2-410번 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질을 포함하며,

상기 브라큐리 융합 단백질은 상기 효모에 의해 발현된 것이며,

상기 효모는 야생형 브라큐리를 발현하는 효모와 비교해 감소된 응집 표현형 (flocculation phenotype)을 가지는, 조성물.

는, 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 의거하여 2015년 8월 3일자로 출원된 미국 가출원 62/200,497에 대해 우선권을 주장한다. 2015년 8월 3일자로 출원된 미국 가출원 62/200,497의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] 정부의 권리

[0004] 본 발명은 보건 복지부의 기관인 국립 보건원과의 공동 연구 개발 협정의 성과로 달성되었다. 미국 정부는 본 발명에 대해 일정 권리를 가진다.

[0005] 공동 연구 계약에 대한 진술

[0006] 본 발명은 2008년 5월 8일에 서명한 공동 연구 개발 협정에 의해 그 당사자를 대행하여 행해졌다. 이 공동 연구 개발 협정의 당사자는 GlobeImmune, Inc. 및 국립 보건원의 기관, 센터 또는 부서인 국립 암 연구소로 대표되는 미국 보건 복지부이다.

[0007] 서열 목록에 대한 참조

[0008] 본원은 EFS-Web에 의한 텍스트 파일로서 전자 제출되는 서열목록을 포함한다. "7797-3-PCT_ST25"로 명명되는 상기 텍스트 파일은 50 KB 크기를 가지며, 2016년 7월 26일에 기록되었다. 상기 텍스트 파일에 포함되는 정보는 37 CFR § 1.52(e)(5)에 의거하여 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0009] 기술 분야

[0010] 본 발명은 일반적으로 개선된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물 및 브라큐리의 발현 또는 과발현을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료 방법과 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 제조 및 이용을 개선하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0011] "T"라고도 알려진 브라큐리 (Brachyury)는 중배엽 전사 인자로서, 유전자의 T-박스 컴플렉스의 일원이다. 브라큐리를 코딩하는 유전자 (인간에서 T 유전자 또는 브라큐리 유전자로 표시됨)는 이형접합성 동물의 꼬리 길이와 천추 (sacral vertebrae)에 영향을 미치는 돌연변이를 통해 마우스에서 1927년에 Nadine Dobrovolskaia-Zavadskaia에 의해 최초로 동정되었다. 이 브라큐리 유전자는 Hermann 그룹에 의해 1990년 마우스에서 클로닝되었고 (Herrmann et al., 1990, *Nature* 343:617-622), Edwards 그룹에 의해 1996년에 인간에서 클로닝되었으며, Edwards 그룹은 인간 브라큐리에 대한 추론된 아미노산 서열을 개시하였다 (Edwards et al., 1996, *Genome Res.* 6:226-223).

[0012] 전사 인자의 T-박스 패밀리의 일원으로서, 브라큐리는 회문 구조 (pallindromic)의 컨센서스 서열에 결합하는 "T-박스" 또는 T-도메인으로 불리우는 고도로 보존된 DNA-결합 도메인 모티프를 포함한다. 브라큐리는 다른 T-박스 단백질과 마찬가지로 초기 발생에 어떤 역할을 하는 것으로 확인된 바 있으며, 척추동물에서 후미측 중배엽 (posterior mesoderm)의 형성 및 분화와 축 발생에 있어 필수적이다 (예, Wilkinson et al., 1990, *Nature* 343(6259):657-659); Beddington et al., 1992, *Development* (Suppl.):157-165; Schulte-Merker et al., 1994, *Development* 120: 1009-1015; Kispert and Herrmann, 1994, *Dev. Biol.* 161:179-193; Showell et al., 2004, *Dev Dyn* 229:201-218). 최근 들어, Palena 그룹에서는 브라큐리가 다양한 인간 종양 조직과 암 세포주에서 발현됨을 입증하였으며, 브라큐리 펩타이드를 이용하여 정상 공여자와 암 환자에서 브라큐리-특이적인 T 세포주를 생성할 수 있음을 입증하였다 (Palena et al., 2007, *Clin. Cancer Res.* 13(8):2471-2478). Fernando 등의 연구에서는, 브라큐리가 인간 종양 세포에서 상피-중배엽 전이 (EMT)를 촉진하여, 종양 세포 상에 중배엽 표현형 뿐만 아니라 이동력 및 침습력을 부여하면서, 종양 세포 주기 진행을 약화시키는 것으로 밝혀졌다 (Fernando et al., 2010, *J. Clin. Invest.* 120(2):533-544). 즉, 브라큐리는 암의 전이성 진행에 관여한다.

[0013] 암은 전세계적으로 주된 사망 원인이며, 효과적인 암 요법의 개발은 계속적으로 연구 및 임상적 개발이 가장 활발한 영역 중 하나이다. 암을 치료 및 예방하기 위한 다양한 혁신적인 방식들이 제안되었으나, 다수의 암들이 아직 사망율이 높고, 치료가 어렵거나 또는 통례적인 치료법에 비교적 미-반응성일 수 있다. 브라큐리 발현과 관련된 암은 유방, 소장, 위, 신장, 방광, 자궁, 난소, 고환, 폐, 대장, 뼈 (척색종) 및 전립선을 포함하는 다양한 조직들에서 발견될 수 있으며, 전이성 암과 말기암을 포함한다. 또한, 브라큐리는 만성 림프구성 백혈병 (CLL), Epstein-Barr 바이러스 형질전환된 B 세포, 버킷 림프종 및 호지킨 림프종과 같은, B 세포 기원의 종양에서 발현된다. 따라서, 브라큐리는 많은 인간 암에서 어떤 역할을 하는 것으로 보인다. 브라큐리가 암 면역요법의 표적으로 제안되었지만 (예, Palena et al., *supra*, Fernando et al., *supra*, 및 WO 2008/106551 참조), 이는 비교적 새로운 암 표적이므로, 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련된 암을 효과적으로 치료 및/또는 예방하는 새로운 면역치료학적 제제에 대한 요구가 당업계에 남아 있다.

발명의 내용

- [0014] 본 발명의 일 구현예는, a) 효모; 및 b) 효모에 의해 발현되는 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물에 관한 것으로서, 변형된 브라큐리 항원은 야생형 브라큐리의 42-229번 중 임의의 하나 이상의 위치에서 아미노산의 결손 또는 치환으로부터 선택되는 하나 이상의 변형에 의해 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가지며, 브라큐리 항원은 야생형 브라큐리와 비교해 손상된 DNA 결합부를 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 야생형 브라큐리와 비교해 손상된 DNA 결합 활성을 가진다. 또 다른 측면에서, 효모는 야생형 브라큐리를 발현하는 효모와 비교해 감소된 응집 표현형을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 야생형 브라큐리의 66-217번 중 임의의 하나 이상의 위치에서 아미노산의 결손 또는 치환으로부터 선택되는 하나 이상의 변형에 의해 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 야생형 브라큐리의 198-222번 중 임의의 하나 이상의 위치에서 아미노산의 결손 또는 치환으로부터 선택되는 하나 이상의 변형에 의해 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216 및/또는 Phe217로부터 선택되는 야생형 브라큐리 아미노산 잔기들 중에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 잔기의 결손 또는 치환으로부터 선택되는 하나 이상의 변형에 의해 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 Met87, Pro127, Asp128, Ser129, Pro130, Asn131, Phe132 및/또는 Val175로부터 선택되는 야생형 브라큐리 아미노산 잔기들 중에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 아미노산 잔기의 결손 또는 치환으로부터 선택되는 하나 이상의 변형에 의해 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다. 또 다른 측면에서, 변형은 결손이다. 또 다른 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 변형 차이를 가진다. 또 다른 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은, 야생형 브라큐리의 66-217번 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연속적인 아미노산의 결손에 의해, 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은, 야생형 브라큐리의 198번-222번 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연속적인 아미노산의 결손에 의해, 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은, 야생형 브라큐리의 198-222번의 결손에 의해, 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가진다.
- [0015] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들의 일 측면 또는 측면들에서, 변형된 브라큐리 항원은 하나 이상의 작용제 T 세포 에피토프를 더 포함하는 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 작용제 에피토프는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가진다.
- [0016] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들의 일 측면 또는 측면들에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 10 또는 서열번호 13과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 10 또는 서열번호 13과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 10 또는 서열번호 13과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 또 다른 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 10 또는 서열번호 10의 2-410번을 포함하는 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 13 또는 서열번호 13의 2-410번을 포함하는 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 12 또는 서열번호 15와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진 융합 단백질이다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 12 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 가진 융합 단백질이다.
- [0017] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들에 대한 임의의 전술한 측면들에서, 효모는 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 유래이다. 일 측면에서, 효모는 사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 유래한다. 일 측면에서, 효모는 전효모 (whole yeast)이다. 일 측면에서, 전효모는 사균이다. 일 측면에서, 전효모는 열에 의해 불활성화된다.
- [0018] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들에 대한 일 측면에서, 조성물은 개체에게 투여하기 적합한 약제학적으로 허용가능한 부형제 중에 제형화된다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예는 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물로서, a) 불활성화된 전효모; 및 b) 서열번호 10의 2-415번 위치의 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질을 포함하며, 브라큐리 융합 단백질이 상기 효모에 의해 발현되며, 조성물이 브라큐리-특이적인 T 세포 반응을 발생시키는, 면역치료학적 조성물에 관한

것이다. 일 측면에서, 융합 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열을 가진다. 본 발명의 또 다른 구현예는 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물로서, a) 불활성화된 전효모; 및 b) 서열번호 13의 2-415번 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질을 포함하며, 브라큐리 융합 단백질이 상기 효모에 의해 발현되며, 조성물이 브라큐리-특이적인 T 세포 반응을 발생시키는, 면역치료학적 조성물에 관한 것이다. 일 측면에서, 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 가진다.

[0020] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들 또는 측면들에서, 브라큐리 융합 단백질의 발현은 프로모터 *CUP1*의 통제 하에 배치된다. 일 측면에서 효모는 사카로마이세스로부터 유래된다. 일 측면에서, 효모는 사카로마이세스 세레비지에로부터 유래된다. 일 측면에서, 상기 조성물은 개체에게 투여하기 적합한 약제학적으로 허용가능한 부형제 중에 제형화된다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예는 브라큐리를 발현하는 암의 치료 방법에 관한 것이다. 일 측면에서, 상기 방법은 본원의 전술한 또는 도처에 언급된 바와 같은 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 브라큐리를 발현하는 암을 앓고 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예는, 전이가 진행 중인 암을 앓고 있거나, 전이 진행 위험이 있거나 또는 전이성 진행을 겪기 시작할 것으로 예상되는 개체에게 본원의 전술한 또는 도처에 언급된 면역치료학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 개체에서 암의 전이성 진행을 감소, 중지, 퇴행, 지연 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예는 본원의 전술한 또는 도처에 언급된 면역치료학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 브라큐리-발현성 암의 개시를 예방 또는 지연하는 방법에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예는 본원의 전술한 또는 도처에 언급된 면역치료학적 조성물을 척색종을 앓고 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 척색종 치료 방법에 관한 것이다.

[0025] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들의 일 측면 또는 측면들에서, 개체는 또 다른 암 요법으로 치료 중이거나 또는 치료받은 적이 있는 개체이다. 일 측면에서, 요법은 방사선 치료, 외과적 종양 절제, 화학요법, 표적 암 요법, 입양 T 세포 이식 (adoptive T cell transfer) 또는 하나 이상의 부가적인 면역치료학적 조성물의 투여로부터 선택된다.

[0026] 본 발명의 다른 구현예는 암에 걸렸으며 화학요법 및/또는 방사선 치료를 받고 있는 개체에게 본원의 전술한 또는 도처에 언급된 면역치료학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 환자에서 종양 세포의 화학요법-내성 또는 방사선-내성을 줄이거나 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0027] 전술한 또는 본원의 도처에 기술된 본 발명의 임의의 구현예들의 일 측면 또는 측면들에서, 본 방법은 개체에서 종양 크기 (tumor burden)를 줄이거나, 개체의 생존성을 높이거나, 및/또는 개체에서 종양 성장을 저해한다. 일 측면에서, 암은 유방암, 골암, 척색종, 소장암, 위암, 췌장암, 신장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 고환암, 폐암, 대장암, 전립선 암, 만성 림프성 백혈병 (CLL), 버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 이들의 전이암이다.

[0028] 본 발명의 다른 구현예는 본원의 전술한 또는 도처에 언급된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 감염과 관련있는 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예는 브라큐리를 발현하는 암을 치료하기 위한; 암을 앓고 있는 개체에서 암의 전이성 진행을 감소시키거나, 중단하거나, 퇴행하거나 또는 예방하기 위한; 브라큐리-발현성 암의 개시를 예방 또는 지연하거나; 또는 암 환자에서 종양 세포의 화학요법-내성 또는 방사선-내성을 줄이거나 또는 예방하기 위한, 본원에 기술된 임의의 면역치료학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예는 브라큐리를 발현하는 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어 본원에 기술된 임의의 면역치료학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 GI-6306 (또는 6306)으로 명명된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 항원 발현을 GI-6301 (또는 6301) 및 GI-6305 (또는 6305)로 명명된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물에서의 항원 발현과 비교한 웨스턴 블롯의 디지털 사진이다. ("ug"는 마이크로그램임). "YVEC"는 빈 벡터 효모이다.

도 2는 GI-6306으로 명명된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물이 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물, 즉 GI-

6301 및 GI-6305와 비교해 저하된 응집 표현형을 나타냄을 보여주는 디지털 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 일반적으로 개선된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물, 상기한 조성물의 제조 방법 및 상기한 조성물을 이용해 브라큐리를 발현 또는 과발현하는 암을 예방 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 면역요법에 사용하기 위해 DNA 결합 활성이 저하 또는 손상된 새로운 브라큐리 항원을 만드는 브라큐리 항원에 대한 특이적인 변형을 포함한다. 본 발명자들은, 브라큐리 항원에 대한 상기한 변형이 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 제조 및 이용을 둘다 개선한다는 놀랍고 예상치 못한 성과를 달성하였다. 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 DNA 결합력을 상실하여 천연 (native) 브라큐리와 같이 전사 인자로 작용하지 못할 뿐만 아니라, 놀랍고 예상치 못하게도, 제조와 투여가 용이하며, 심지어 다른 변형 (작용제 돌연변이)이 도입된 경우에도 브라큐리 항원을 높은 수준으로 발현한다.
- [0033] 보다 구체적으로, 본 발명은 개선된 효모-기반의 면역치료학적 조성물 (본원에서는 "효모-기반의 면역요법", "효모-브라큐리 면역요법", "효모-브라큐리 면역치료학적 조성물", "효모-기반의 면역요법 제제", "효모-기반의 백신" 또는 이들 표현의 유사어로도 지칭됨)을 포함하며, 이 조성물은 효모 비히클 및 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원 (브라큐리 작용제 항원 등)을 포함하며, 이 브라큐리 항원의 DNA 결합 활성은 돌연변이에 의해 (예, 브라큐리 단백질의 천연적인 DNA 결합 활성을 감소 또는 없애는데 충분한 브라큐리 DNA 결합 영역에서의 결손, 치환, 삽입 또는 기타 변형에 의해) (야생형 브라큐리 단백질과 비교해) 감소 또는 제거된다. 본 발명은 암을 치료 또는 예방하기 위한 이러한 개선된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 용도 뿐만 아니라 이러한 개선된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 제조 방법을 포함한다. 본 발명자들은, 본원에, 정상인 및 암 환자로부터 유래되는 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ CTL 등의 브라큐리-특이적인 T 세포를 증식하도록 설계된, 새로운 효모-브라큐리 면역요법 제품의 구축 및 제조를 기술한다. 본 발명의 새로운 조성물을 이용한 효모-브라큐리 면역요법은 브라큐리-특이적인 세포성 면역 반응 ($CD4^+$ 및 $CD8^+$)을 유발하고, 브라큐리-발현성 종양을 앓고 있는 개체에게 투여하여, 비-제한적인 예로, 척색종, 전이암 및 관련 병태 등의 브라큐리를 발현하는 암을 예방 및/또는 치료하기 위한 새로운 요법을 제공하는데 유용하다.
- [0034] 브라큐리는 대부분의 정상 (비-종양) 조직에서 발현되지 않고, 전형적으로 종양 세포에서 과발현되므로, 정상 조직에 대한 임의의 "오프 타겟"은 문제가 되지 않으며, DNA 결합 서열을 가진 브라큐리 항원을 생체내에서 사용한 본 발명에서는 관찰되지 않았다. 그러나, 본 발명의 개선된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은, 천연 브라큐리의 DNA 결합 기능을 없애, 브라큐리 항원이 전사 인자로서 작용하는 능력을 제거하며, 따라서 이러한 활성의 임의의 하류 작용들을 제거하는, 변형을 포함한다. 본 발명에서, 브라큐리는 면역원으로서만 작용하여야 하며, 그래서 mRNA 전사에 있어 본래 역할의 불활성화는 문제가 되지 않는다.
- [0035] 본 발명자들은, DNA 결합 활성이 제거된 브라큐리를 효모에서 발현시켰을 때, 효모가 변형되지 않은 브라큐리를 발현하는 효모와 비교해 상이한 구조 특징을 가진다는 것을, 예상치 못하게 그리고 예측치 못하게도 발견하게 되었다. 보다 상세하게는, 본 발명에 언급된 변형이 가해지지 않은 효모-브라큐리 조성물은 제조 공정 중에 강력한 "응집" 표현형을 나타내는데, 이는 효모 세포가 증식하여 브라큐리 항원을 발현함에 따라, 세포가 증식 배지 또는 PBS 중에 비-응집된 세포 보다 더 밀도 높은 거대한 다세포성 구조로 응집된다는 것을 의미한다 (아래에서 보다 상세하게 기술됨). 이와는 대조적으로, 본 발명의 변형된 브라큐리 항원을 발현하는 효모는 응집 표현형을 나타내지 않거나, 또는 실질적으로 저하된 응집 표현형을 나타낸다. 즉, 브라큐리의 DNA 결합 기능의 제거로, 항원의 면역원성은 유지하면서도 천연적인 브라큐리의 생물 활성은 결핍된 효모-기반의 면역요법 제품이 제공될 뿐만 아니라, 새로운 항원의 놀랍고 예측하지 못한 특성은 변형된 항원을 발현하는 효모에서 응집 표현형의 상실이었다. 응집 표현형의 상실은 효모-브라큐리에 이러한 특징을 제공하기 위해 사용되는 제조 공정의 단계의 수를 줄이거나 및/또는 단계를 수정가능하게 한다.
- [0036] 또한, 본 발명의 변형을 포함하는 예시적인 브라큐리 항원 (실시예 참조)은, 새로운 변형을 제외하고는 서열이 동일한 브라큐리 항원의 발현과 비교해, 효모에서 실질적으로 더 다량으로 발현되었다. 이 결과는, 본 발명에 따른 브라큐리 항원의 변형이 또한 효모에서 브라큐리 항원의 발현을 강화할 수 있다는 것을 의미한다. 왕성한 항원 발현은 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물에 매우 긍정적인 특징이다.
- [0037] 본 발명에서 사용가능한 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 가동성을 획득하여 다른 조직을 침입하기 시작하는 시기 이전에 또는 그 시기에 종양 세포를 표적하여, 전이암의 개시 및/또는 암의 진행, 특히 전이암을 예방, 저해, 정지, 퇴행 또는 지연한다. 또한, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 초기 단계 암을 앓고

있는 개체, 또는 전암성 (전-악성) 병변 또는 종양을 앓고 있는 개체, 암, 특히 전이율이 높은 암 발병 위험성이 높은 개체 및 심지어 정상 개체에서 암을 예방하기 위한 예방제로서 전이암 또는 암의 진행을 예방 또는 지연시키는데 이용될 수 있으며, 본원에 기술된 바와 같이 암에 대한 다른 예방학적 면역요법과 조합하여 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 또한 화학요법 및 방사선 치료 등의 다른 암 치료를 받고 있는 개체에게 유용하다. 전이암은 원발성 암에 비해 화학요법 및/또는 방사선 치료에 내성이 더 강한 것으로 몇몇 사례들에서 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 이용해, 암에서 브라큐리를 발현하는 종양을 저해함으로써 (이로써 항-증식성 영향을 저해함) 전이암에서 발생할 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 저해, 축소 또는 없앨 수 있으며, 본 발명의 조성물은 개체에서 화학요법 또는 방사선 치료의 효능을 강화할 수 있다.

[0039] 최근 수년간, 브라큐리는 척색종으로 알려진 회귀 골암을 식별하는 바이오마커가 되었다. 이를 사이토케라틴 염색과 조합하면, 브라큐리를 이용한 척색종 검출의 민감성 및 특이성은 각각 98% 및 100%이었다 (Oakley *et al.* (2008), *Mod Path* 21, 1461-1469). 이에, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 척색종을 예방 및/또는 치료하는데 유용하다.

[0040] 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 본래 비-발암성일 수 있거나 또는 악성 변환을 선행할 수 있는 브라큐리 발현과 관련있는 병태 또는 질환을 치료하는데 이용할 수 있다. 예를 들어, 브라큐리는 감염성 물질, 예를 들어, 엡스타인-바 바이러스 (EBV)와 같은 바이러스로 감염된 세포에서 상향 조절될 수 있다. 이에, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법은, 비-제한적인 예로, EBV-관련 병태 (예, 단핵구증) 등의 바이러스 감염과 같은 질환 등의 브라큐리 발현과 관련있는 임의의 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0041] 본원에 언급된 효모-브라큐리 조성물은, 대부분 독성 문제가 있는 외인성 보강제, 사이토카인 또는 기타 면역자극성 분자를 사용하지 않고도, 선천적인 면역 반응 뿐만 아니라, 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응을 포함하는 CD4⁻의존적인 TH17 및 TH1 T 세포 반응 및 항원-특이적인 CD8⁺ T 세포 반응 등의 타겟 항원 (브라큐리)에 대한 후천적인 면역 반응을 유도한다. 또한, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 조절성 T 세포 (Treg) 수 및/또는 기능을 저해하여, 예를 들어, 종양의 존재에 의해 정상적으로 억제될 수 있는 작동성 T 세포 반응을 강화한다. 또한, 항체 반응을 발생시킴으로써 면역화하는 면역치료학적 조성물과 비교해, 효모-브라큐리 면역요법에 의해 유발되는 항원-특이적인, 광범위한 강력한 세포성 면역 반응은 종양 세포를 타겟팅하는데 특히 유효한 것으로 생각된다. 실제, 다수의 연구들에서, 면역치료학적 방법이 MHC 클래스 I 분자에서 종양 펩타이드를 인지하는 CD8⁺ CTL을 통해 종양 세포를 타겟팅하는 경우에 강화되는 것으로 입증된 바 있다.

[0042] 효모-브라큐리 면역요법은 항원 제시 세포를 활성화하는데 매우 능숙하며, 면역 반응을 교차-촉발하는 고유한 능력을 가지고 있어, 억제성 환경일 수 있는 상황에서도 종양에 전형적으로 효과적인 CD8⁺ CTL 반응을 발생시킨다. 이런 타입의 면역요법은 항원 제시 세포의 고유한 관련 면역원 제시 능력을 이용하기 때문에, 본 발명에 따른 효과적인 면역요법을 달성하기 위해서 브라큐리의 CTL 에피토프 또는 MHC 클래스 II 에피토프의 정확한 정체 파악이 필연적이진 않다. 실제, 멀티플 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 에피토프는 단일한 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물에서 타겟이 될 수 있으며, 그래서 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법은 짧은 펩타이드의 사용으로 한정되지 않으며, 실제 이들 조성물에 더 긴 폴리펩타이드 및 융합 단백질을 사용하는 것이 효과적이다. 이에, 효모-브라큐리 면역요법을 이용함으로써, 추정의 T 세포 에피토프를 동정하기 위한 알고리즘과 복잡한 공식의 사용이 생략된다.

[0043] 효모-브라큐리는 외인성 보강제, 면역자극성 물질 또는 분자, 공-자극 분자 또는 사이토카인을 사용하지 않고도 면역화 프로토콜 (예방학적 또는 치료학적)에서 효과적일 수 있지만, 이들 물질들은 필요에 따라 포함될 수도 있다. 또한, 효모-브라큐리 면역요법은 다른 타입의 면역요법에서 문제일 될 수 있는 효능 상실 없이 반복적으로 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물

[0045] 본 발명의 일 구현에는 브라큐리 발현 또는 과발현이 특징적인 암 또는 기타 질환 (검출가능한 브라큐리를 발현하는 세포를 포함하진 않지만, 암 발생의 후기 단계에 브라큐리를 발현하는 세포를 포함할 수 있거나 또는 포함하게 될 암 등)을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있는 효모-기반의 면역치료학적 조성물에 관한 것이다. 이 조성물은, (a) 효모 비히클; 및 (b) 하나 이상의 브라큐리 항원(들)을 포함하는 암 항원을 포함하며, 브라큐

리 항원이 (예, 야생형 브라큐리 단백질과 비교해) 변형된 브라큐리 항원인, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 변형된 Brachyury 항원은 최소한 브라큐리 단백질의 DNA 결합 활성이 (브라큐리 단백질의 천연 DNA 결합 활성을 감소 또는 없애는데 충분한 브라큐리 DNA 결합 영역의 결손, 치환, 삽입 또는 기타 변형에 의해) 돌연변이에 의해 감소 또는 없어지는, 변형을 포함한다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 최소한 야생형 브라큐리 단백질을 발현하는 효모와 비교해 감소된 응집 표현형을 가진 변형된 브라큐리 항원을 발현하는 효모 (효모는 거대 다세포 구조로 응집되는 경향이 감소됨)를 생성하는 변형을 포함한다. 변형된 브라큐리 항원은 (보다 상세하게 후술된) 브라큐리 항원에 하나 이상의 작용제 에피토프를 구축하기 위해 단백질내 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환하는 등의, 부가적인 변형 (즉, 야생형 브라큐리 단백질과의 차이)을 포함할 수 있다. 마지막으로, 변형된 브라큐리 항원은, 변형되더라도, 면역 반응, 바람직하게는 천연적인 브라큐리 단백질, 예를 들어 종양 세포에 의해 발현된 브라큐리 단백질에 대해 세포-매개 면역 반응 (T 세포 반응)을 유발하는 능력을 유지한다. 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원이 효모 비히클내에 로딩되거나 또는 본원에 기술된 바와 같이 효모 비히클과 복합체를 형성하거나, 여기에 부착되거나, 혼합되거나 또는 함께 투여되어 본 발명의 조성물을 형성할 수 있지만, 변형된 브라큐리 항원은 가장 전형적으로는 효모 비히클에 의해 (예를 들어, 선택적으로 효모 사이토플라스트, 효모 고스트, 효모 막 추출물 또는 이의 분획으로 추가로 가공될 수 있는, 온전한 (전)효모 또는 효모 스페로플라스트에 의해) 제조된 단백질로서 발현된다.

[0046] 본 발명에서, "효모-브라큐리 면역치료학적 조성물"은, 효모 비히클 및 하나 이상의 브라큐리 항원 또는 이의 면역원성 도메인을 포함하며, 본 발명에서, 본원의 상기 및 도처에 기술된 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는, 특정 타입의 "효모-기반의 면역치료학적 조성물"이다. "면역치료학적 조성물"은 개체에서 한가지 이상의 치료학적 이점을 달성하는데 충분한 면역 반응을 발생시키는 조성물이다. 본원에서, 효모-기반의 면역치료학적 조성물은 개체에서 한가지 이상의 치료학적 이점을 달성하기에 충분한 면역 반응을 발생시키는 효모 비히클 성분을 포함하는 조성물을 지칭한다. 보다 상세하게는, 효모-기반의 면역치료학적 조성물은 효모 비히클 성분과 전형적으로 항원 성분을 포함하는 조성물이며, 이는 비-제한적인 예로, T 세포-매개 세포성 면역 반응 등의 세포성 면역 반응과 같은 면역 반응을 발생 또는 유발할 수 있다. 일 측면에서, 본 발명에 사용가능한 효모-기반의 면역치료학적 조성물은 특히 타겟 항원 (예, 암 항원)에 대해 $CD8^{+}$ 및/또는 $CD4^{+}$ T 세포-매개 면역 반응, 일 측면에서, $CD8^{+}$ 및 $CD4^{+}$ T 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있다. $CD4^{+}$ 면역 반응은 TH1 면역 반응, TH2 면역 반응, TH17 면역 반응 또는 이들의 임의 조합을 포함할 수 있다. 효모-기반의 면역요법은 특히 TH1 및 TH17 반응을 형성할 수 있다. $CD8^{+}$ 면역 반응은 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응을 포함할 수 있으며, 효모-기반의 면역요법은 이러한 반응을 형성할 수 있다. 일 측면에서, 효모-기반의 면역치료학적 조성물은 개체에서 조절성 T 세포 (Treg)의 수 및/또는 기능을 조절한다. 효모-기반의 면역요법은 또한 예를 들어 사이토카인의 부가, 항체 및/또는 효모에 대한 제조 과정의 조절에 의해, 다른 것에 비해 한가지 유형의 반응을 촉진하도록 변경될 수 있다. 선택적으로, 효모-기반의 면역치료학적 조성물은 체액성 면역 반응을 유발할 수 있다.

[0047] 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 "예방적" 또는 "치료적"일 수 있다. 예방학적으로 제공되는 경우, 본 발명의 조성물은 브라큐리-발현성 종양의 진행 예방, 저해 또는 지연; 및/또는 다른 조직으로의 종양 이동 및/또는 종양 침습 (전이)의 예방, 저해 또는 지연, 및/또는 일반적으로 개체에서 암의 진행을 예방 또는 저해하기 위한 목적으로, 브라큐리를 발현하는 암의 발생 전에 또는 발생의 검출 전에 제공된다. 본원에 논의된 바와 같이, 브라큐리는 말기 단계 암 등의 수종의 암들에서 발현되며, 전이암과 같은 종양의 침습 및 이동과 관련된 과정인 EMT 프로세스에 참여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 예방학적 조성물은 암을 가지지 않는 것으로 보이(건강한, 또는 정상인 개체)고, 암이 없고 아직 브라큐리가 검출되지 않은 (즉, 암에서 종양 세포에 의한 브라큐리 발현 전에) 개체에 투여될 수 있다. 암, 특히 브라큐리 발현 및/또는 전이가 전형적으로 연관된 암의 발병 위험성이 있는 개체는 본 발명의 조성물을 사용해 예방적으로 처치될 수 있다. 치료학적으로 사용되는 경우, 면역치료학적 조성물은, 개체에서 종양 크기를 감소시키고; 개체의 종양 증식을 저해하고; 개체의 생존율을 높이고; 다른 조직으로의 종양 이동 및/또는 종양 침습 (전이) 발생을 예방, 저해, 퇴행 또는 지연시키고, 및/또는 개체에서 암의 진행을 예방, 저해, 퇴행 또는 지연시킴으로써와 같이, 암을 완화시킬 목적으로, 브라큐리-발현성 암을 가진 개체에게 제공된다. 일 측면에서, 효모-브라큐리 면역요법은 암에서 브라큐리 발현을 저해함으로써 전이암에서 발생할 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 저해, 저하 또는 없애기 위해 치료학적으로 사용되며, 본 발명의 조성물은 개체에서 화학요법 또는 방사선 치료의 성능을 강화할 수 있다.

[0048] 전형적으로, 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 효모 비히클과, 본 발명의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 하나 이상의 암 항원을 포함하며, 여기서 암 항원은 효모 비히클에 부착, 부하 또는 혼합됨으로써 발현된다. 일부

구현예에서, 암 항원은 융합 단백질로서 제공된다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 적합한 몇가지 변형된 브라큐리 단백질 및 융합 단백질은 아래에 기술된다. 일부 구현예에서, 암 항원과 변형된 브라큐리 항원은 동일한 요소이다. 일부 구현예에서, 암 항원은 변형된 브라큐리 항원 외에도 다른 암 항원 등의 다른 항원을 포함한다. 본 발명의 일 측면에서, 암 항원으로서 사용가능한 융합 단백질은 2 이상의 항원, 예를 들어, 변형된 브라큐리 항원 및 브라큐리 항원이 아닌 다른 암 항원, 또는 2 이상의 서로 다른 브라큐리 항원들 (예, 서로 다른 작용제 에피토프를 가진 2종의 변형된 브라큐리 항원)을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 융합 단백질은, 변형된 브라큐리 항원의 2 이상의 면역원성 도메인과 같은 하나 이상의 항원의 2 이상의 면역원성 도메인을 포함할 수 있다 (면역원성 도메인은 본 발명의 변형을 포함함).

[0049] 본 발명에서, 본원에 사용되는 용어 "항원"은 자연 발생 또는 합성에 의해 유도 또는 설계된 단백질의 임의의 일부 (예를 들어, 펩타이드, 부분 단백질, 전장 단백질), 세포성 조성물 (전체 세포, 세포 용해물 (cell lysate) 또는 파괴된 세포), 유기체 (전체 유기체, 세포 용해물 또는 파괴된 세포) 또는 탄수화물 또는 기타 분자 또는 그의 일부를 의미한다. 항원은 면역계의 인자 (예를 들어, T 세포, 항체)가 대면하는 동일 또는 유사 항원에 대하여 항원-특이적인 면역 반응 (예를 들어, 체액성 및/또는 세포-매개 면역 반응)을 유발할 수 있다. 항원은 단일 에피토프, 단일 면역원성 도메인과 같이 작거나 더 클 수 있으며, 복수의 에피토프 또는 면역원성 도메인을 포함할 수 있다. 이와 같이, 항원의 크기는 아미노산 약 8-11개 (즉, 펩타이드)와 같이 작을 수 있고, 전장 단백질, 다량체, 융합 단백질, 키메라 단백질, 전체 세포, 전체 미생물, 또는 그의 일부 (예를 들어, 미생물 추출물, 또는 전체 세포의 단백질 단편 (폴리펩타이드) 용해물)와 같이 클 수 있다. 또한, 항원은 탄수화물을 포함할 수 있으며, 이것은 효모 비히클내에 또는 본 발명의 조성물내에 로딩 (loading)될 수 있다.

[0050] 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료에 사용가능한 항원은 폴리펩타이드, 전장 단백질, 다량체, 융합 단백질 및 키메라 단백질이며, 이러한 측면들 중 임의의 측면에서, 항원은 본원에 기술된 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함한다. 효모에서 발현하는 경우, 단백질인 항원, 예를 들어, 변형된 브라큐리 항원은 효모에서 재조합에 의해 발현될 수 있으며, 이는 전형적으로, 25개 이상, 또는 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상, 29개 이상, 30개 이상, 31개 이상, 32개 이상, 33개 이상, 34개 이상, 35개 이상, 36개 이상, 37개 이상, 38개 이상, 39개 이상, 40개 이상, 41개 이상, 42개 이상, 43개 이상, 44개 이상, 45개 이상, 46개 이상, 47개 이상, 48개 이상, 49개 이상 또는 50개 이상, 또는 아미노산 25-50개 이상의 길이, 또는 아미노산 30-50개 이상의 길이, 또는 아미노산 35-50개 이상의 길이, 또는 아미노산 40-50개 이상의 길이, 또는 아미노산 45-50개 이상의 길이이 나, 더 작은 단백질로 발현될 수도 있으며, 현저히 더 큰 단백질 (예를 들어, 수백개의 아미노산 길이 또는 심지어 수천개의 아미노산 길이)로 발현될 수 있다. 일 측면에서, 전장 단백질 또는 N- 및/또는 C-말단으로부터 아미노산 1 내지 20개가 결손된 단백질이 발현될 수 있다. 융합 단백질 및 키메라 단백질 또한 본 발명에서 발현될 수 있는 항원이다. "표적 항원"은 본 발명의 면역치료학적 조성물에 의해 특이적으로 표적이 되는 항원이다 (즉, 이에 대한 면역 반응 유발이 요구되는 항원, 예를 들어, 본 발명에서 브라큐리). "암 항원"은, 항원의 표적화가 또한 암을 표적화하도록, 종양 세포에 의해 발현되는 항원과 같은 암과 관련있는 하나 이상의 항원을 포함하는 항원이다. 암 항원은 하나 이상의 종양-관련 단백질 등의 하나 이상의 단백질로부터 유래되는 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다. "브라큐리 항원"은 브라큐리 단백질로부터 유래, 설계 또는 생성되는 항원이다. 본 발명에 따른 "변형된 브라큐리 항원"은 대응되는 야생형 브라큐리 아미노산 서열과, 야생형 브라큐리 단백질과 비교해, 브라큐리 단백질의 천연적인 DNA 결합 활성을 낮추거나 또는 없애거나, 및/또는 변형된 브라큐리 항원을 발현하는 효모의 응집 표현형을 낮추거나 또는 없애는데 충분한 하나 이상의 변형 (예, 결손, 치환, 삽입 또는 기타 변형) 차이가 있는 아미노산 서열을 포함하는, 브라큐리 항원이다 (예, 변형된 항원을 발현하는 효모는 야생형 단백질을 발현하는 효모와 비교해 큰 다세포성 구조로 응집되는 경향이 낮음). 변형된 브라큐리 항원은 작용제 에피토프를 형성하는 하나 이상의 아미노산 치환 등의 부가적인 변형을 포함할 수 있다.

[0051] 면역 반응의 자극을 언급하는 경우, 용어 "면역원"은 용어 "항원"의 서브세트이며, 따라서, 일부 경우에, 용어 "항원"과 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본원에서, 면역원은, 개체에의 면역원 투여가, 그 개체의 면역계가 접촉한 동일 또는 유사 항원에 대한 항원-특이 면역 반응을 탑재하도록, 체액성 및/또는 세포-매개 면역 반응을 유발하는 (즉, 면역원성인) 항원을 가르킨다. 일 구현예에서, 면역원은 $CD4^+$ T 세포 반응 (예, TH1, TH2 및/또는 TH17) 및/또는 $CD8^+$ T 세포 반응 (예, CTL 반응)을 포함하는, 세포-매개 면역 반응을 유발한다.

[0052] 소정의 항원의 "면역원성 도메인"은 동물에 투여되었을 때 면역원으로 작용할 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 함유하는 항원의 임의의 일부, 단편 또는 에피토프 (예를 들어, 펩타이드 단편 또는 서브유닛 또는 항체 에피토프 또는 기타 구조적 에피토프)일 수 있다. 따라서, 면역원성 도메인은 단일 아미노산보다 크고, 적어도 면역

원으로 작용할 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 함유하기에 충분한 크기이다. 예를 들어, 단일 단백질은 복수의 여러가지 면역원성 도메인들을 함유할 수 있다. 면역원성 도메인은, 구조적 도메인이 고려되는 경우, 체액성 면역 반응의 경우에서와 같이, 단백질내 선형 서열이어야 하는 것은 아니다.

[0053] 본원에서 에피토프는 면역계의 적절한 공동-자극 신호 및/또는 활성화된 세포의 맥락에서 면역계에 제공되었을 때 면역 반응을 유발하기에 충분한 소정의 항원내 단일한 면역원성 부위로서 정의된다. 다시 말해, 에피토프는 면역계의 구성 요소에 의하여 인지되는 항원의 일부이며, 또한 항원 결정인자로도 언급될 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자는 T 세포 에피토프가 B 세포 또는 항체 에피토프와 크기 및 조성에 있어서 다르며, Class I MHC 경로를 통하여 제시되는 에피토프는 Class II MHC 경로를 통하여 제시되는 에피토프와 크기 및 구조적 특성에서 차이를 인지할 것이다. 예를 들어, Class I MHC 분자에 의하여 제시되는 T 세포 에피토프는 전형적으로 아미노산 8 내지 11개 길이인 반면, Class II MHC 분자에 의하여 제시되는 에피토프는 길이 제한이 거의 없고 아미노산 25개 이하 또는 그보다 길 수 있다. 또한, T 세포 에피토프는 에피토프에 결합되는 특정 MHC 분자에 따라 예측되는 구조적 특성을 가진다. 에피토프는 선형 서열 에피토프 또는 구조적 에피토프 (보존된 결합 영역)일 수 있다. 대부분의 항체는 구조적 에피토프 (conformational epitope)를 인지한다.

[0054] 브라큐리 (이는 또한 "T"로도 지칭될 수 있음)는 복수의 여러 동물 종들에서 고도로 보존된 단백질이며, 수종의 여러 단백질들에서 공유된 DNA-결합 도메인인 "T-박스" 도메인 또는 "T-도메인"을 포함하는 전사 인자이며, 이들은 총괄하여 T-박스 패밀리에 단백질로 지칭된다. 인간 브라큐리는 1996년에 최초로 클로닝되었다 (Edwards et al., *supra*). 예시적인 야생형 인간 브라큐리를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 하나는 서열번호 1로 표시되며, 서열번호 1은 GENBANK® 등재번호 NM_003181 (GI:19743811)로부터 입수된 mRNA 서열이다. 서열번호 1은 아미노산 435개 길이의 야생형 인간 브라큐리 단백질을 코딩하며, 이의 아미노산 서열은 서열번호 2로 본원에 제공된다 (GENBANK® 등재번호 NP_003172; GI:4507339). 서열번호 2에서, 42-223번 위치는 T-박스 영역 (T-박스 도메인)으로 지정되며, DNA 결합과 구체적으로 관련있는 위치는 서열번호 2에서 다음과 같은 위치로 지정된다: 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 101, 162, 196, 197, 198, 204, 208, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 및 219.

[0055] 또 다른 예시적인 야생형 인간 브라큐리 단백질은 서열번호 2의 인간 브라큐리 단백질의 변이체이며, 이는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가진다. 서열번호 4는 또한 435개의 아미노산 단백질이며, 본원에서 서열번호 3으로 표시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다. 서열번호 4는 단백질의 전장에 대해 서열번호 2와 약 99% 동일하다. 서열번호 4는 177번 위치 (각각 Asp vs. Gly), 368번 위치 (각각 Thr vs. Ser) 및 409번 위치 (각각 Asn vs. Asp)에서 서열번호 2와 차이가 있다. T-박스 영역 (T-박스 도메인)은 42-223번에 위치하며, DNA 결합과 특히 관련있는 위치는 서열번호 4에서 다음의 위치로 지정된다: 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 101, 162, 196, 197, 198, 204, 208, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 및 219.

[0056] T-박스 도메인 (또는 T-박스 영역)은 일반적으로 모든 "T-박스 단백질"에서 서열-특이적인 DNA 결합에 필수적이고 충분한 T-박스 단백질내 최소 영역으로서 정의된다. T-박스 패밀리의 구성원 (이 도메인을 가진 단백질)은 DNA 컨센서스 서열 TCACACCT에 결합한다 (Wilson and Conlon, *Genome Biology* 2002, 3(6): reviews3008). 브라큐리에서, T-박스 패밀리의 주요 구성원로서, 뮤라인 단백질의 1-229번 (예, 위치 1-229)이 전체 T-박스 DNA 결합 도메인을 포함하는 것으로 최초로 개시되었으며 (Kispert et al., *The EMBO Journal* 1993, 12(8) 3211-3220; Kispert et al., *The EMBO Journal* 1996, 14(19):4763-4772), 뮤라인 단백질에서 N-말단 아미노산 17개 정도가 결손되면 단백질의 DNA 결합력이 현저하게 약화되었다 (Kispert et al., 1993, *supra*). 여러가지 T-박스 단백질들 간의 잔기 보존을 토대로, 1-229번 위치에 아미노산을 더 많이 또는 더 적게 가진 도메인 역시 과학 문헌에서 확인될 수 있지만, 후속적인 발표 및 공개 데이터베이스에서 일반적으로 대략 아미노산 180개 도메인에 해당되는 약 41번 또는 42번에서 약 223번까지를 커버링하는 것으로서 DNA 결합 도메인이 보다 구체적으로는 개시되었다. 결정 구조를 통해 DNA 결합에 직접 참여하는 것으로 동정된 브라큐리의 아미노산 잔기는 하기를 포함한다 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치): Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216 및 Phe217 (예, Muller and Herrmann, 1997, *Nature* 389:884-888, 도 1). 결정 구조를 통해 (단백질에 DNA에 결합된 형태로서, 이들 잔기는 또한 DNA 결합에 영향을 미칠 수 있음), 브라큐리 단백질의 이량화에 직접 참여하는 것으로서 동정된 브라큐리의 아미노산 잔기로는 하기를 포함한다 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치): Met87, Pro127, Asp128, Ser129, Pro130, Asn131, Phe132 및 Val175 (예, Muller and Herrmann, 1997, *Nature* 389:884-888, 도 1).

- [0057] T-박스 도메인과 구체적인 DNA 결합 잔기, 단백질 이량화 잔기 또는 다른 종의 브라큐리 서열 등의 다른 브라큐리 서열의 활성화에 중요한 기타 잔기들은, 이들 서열을 비교함으로써, 쉽게 동정할 수 있다. 본원에서, 본원에 기술되거나 또는 당해 기술 분야에 공지되며 본 발명에서 이용되는 임의의 브라큐리 단백질의 "T-박스 도메인" 또는 "DNA 결합 도메인"은, 일반적으로, 인간 브라큐리 단백질의 적어도 41번-223번 (예, 서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치임)를 의미하며, 인간 브라큐리 단백질의 전체 1번-229번을 포함하거나, 또는 도메인의 N-말단 상에 브라큐리 서열의 부가적인 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개의 연속 아미노산, 또는 정의된 T-박스 도메인의 C-말단 상에 브라큐리 서열의 부가적인 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 연속 아미노산을 (예, 서열번호 2 또는 4의 41-223번 위치의 양 측면 상에) 포함할 수 있다. DNA 결합과 특히 관련있는 잔기로는 인간 브라큐리 서열 (예, 서열번호 2 또는 4)을 참조하여 66, 69, 70, 101, 103, 147, 150, 151, 162, 196, 197, 198, 208, 211, 212, 213, 214, 215, 216 및 217번을 포함한다. 단백질의 이량화와 특히 관련있으며 브라큐리의 DNA 결합 활성을 영향을 미칠 수 있는 잔기로는 인간 브라큐리 서열 (예, 서열번호 2 또는 4)을 참조하여 87, 127, 128, 129, 130, 131, 132 및 175번을 포함한다.
- [0058] 본 발명에서, "저하 또는 파괴된 DNA 결합 활성"을 가진 변형된 브라큐리 항원은 일반적으로 변형된 브라큐리 단백질을 지칭하며, 야생형 (천연적으로 생성되는, 비-변형된) 브라큐리 단백질과 비교해, 변형된 브라큐리 단백질은 (임의의 적절한 검출 수단에 의해) 관찰가능한 또는 검출가능한, 바람직하게는 유의한, 더 바람직하게는 통계적으로 유의한, 감소된 DNA 결합력 또는 브라큐리 T-박스 영역이 결합하는 것으로 알려진 서열에 대해 감소된 결합력을 표준 실험 조건 또는 생리학적 조건에서 나타낸다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 본래의 DNA 표적에 대한 결합력을 검출가능한 수준으로 가지지 않는다. DNA 결합 활성은, 변형된 브라큐리 단백질을 DNA와 시험관내 또는 생체외에서 접촉시키거나, 또는 DNA 결합으로 야기되는 전사 인자 활성을 검출함으로써와 같이, 당해 기술 분야에 공지된 다양한 분석을 통해 검출할 수 있다. 예를 들어, 변형된 브라큐리는 천연 브라큐리에 결합하는 올리고뉴클레오타이드와 적절한 조건 하에 인큐베이션하여, 결합된 복합체를 면역침강시킨 후 평가할 수 있다. 다른 예로, 세포를 변형된 브라큐리를 코딩하는 뉴클레오타이드 구조체 및 리포터 플라스미드로 공동-형질감염시키고, 리포터 활성 (예, 효소 활성)을 브라큐리가 DNA에 결합하는데 필요한 전사 인자로서의 작용 능력 또는 DNA에 결합하는 브라큐리의 결합력의 판독인자 (readout)로서 측정할 수 있다. 예를 들어, 이러한 타입의 분석에 대한 예로, Kispert et al., 1993, *supra*, 또는 Kispert et al., 1996을 참조한다. 단백질-DNA 결합을 측정하는 다른 분석들도 당해 기술 분야에 공지되어 있다.
- [0059] 본 발명에서, "감소된 효모 응집 표현형"이 조합된 변형된 브라큐리 항원은 감소된 응집 표현형을 가진 변형된 브라큐리 항원을 발현하는 효모를 만드는, 즉 항원을 발현하는 효모가 큰 다세포 구조로 응집하거나 또는 서로 뭉치는 경향이 저하되게 하는 변형을 가진 브라큐리 단백질을 지칭한다. 전술한 바와 같이, 야생형 (비-변형된) 브라큐리 항원을 발현하는 효모는 배양 중에 강력한 응집 표현형을 가진다. 효모 "응집"은 당해 기술 분야에 언급되어 있으며, 일반적으로 효모 세포를 이를 배양한 배지로부터 분리가능하게 하는 효모 세포의 무성 응집 (non-sexual aggregation)으로서 정의된다. 응집 표현형을 가진 효모는 이 표현형을 가지지 않은 효모에 비해 증식 배지 또는 이들이 함유되는 완충액에서 밀도가 더 높으며, 현탁된 상태로 쉽게 유지되지 않을 수 있다. 응집을 담당하는 생물학적 기전에 대해 몇가지 이론이 존재하는데, 예를 들어, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000, 5: 288-305에서 검토되었다. 효모 응집의 발생 기전과 무관하게, 본 발명은 효모에서 이러한 성질을 가진 항원을 만들 수 있는 변형을 기술함으로써 브라큐리 항원을 발현하는 효모의 응집 표현형을 감소시킨다. 효모에서 응집 표현형은, 비-제한적인 예로, 결합 강도 측정, 플록 (floc) 크기 측정, 효모 침전 속도 측정, 침강 검사, 원자력 현미경 (AFM), 헬름 분석 (Helm's assay) 및 변형된 헬름 분석 등의, 임의의 적합한 검출 방법을 이용해 측정할 수 있다 (예, van Hamersveld et al., *J. Inst. Brew.* 1996, 102:333-342; Soares et al., *J. Inst. Brew.*, 1997, 103:93-98; D'Hautcourt and Smart, *J Am Soc Brew Chem.*, 1999, 57:123-128; Vidgren and Londesborough, *J Inst Brew.* 2011, 117:475-487).
- [0060] 본 발명의 일 구현예에서, 변형된 브라큐리 항원 (즉, DNA 결합 활성이 야생형 단백질과 비교해 감소 또는 손상된 브라큐리 항원, 및/또는 항원을 발현하는 효모가 감소된 응집 표현형을 가지는 브라큐리 항원)은, 브라큐리의 DNA 결합 활성을 낮추거나 또는 파괴하는데 충분한 및/또는 변형된 브라큐리 단백질을 발현하는 효모의 응집 표현형을 낮추는데 충분한 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 그 보다 많은 수의 아미노산 변형 (즉, 아미노산 잔기의 결손, 치환, 삽입 또는 기타 변형)에 의해, 야생형 브라큐리 아미노산 서열과 차이가 있는 아미노산 서열을 가진다. 바람직하게는, 브라큐리 서열의 변형 개수는, 브라큐리 항원에 T 세포 에피토프를 최대한 유지하면서 (즉, T 세포 에피토프를 포함하는

브라큐리 아미노산 서열은 유지되는 것이 바람직함), 효모의 응집 표현형 저하 및/또는 DNA 결합 저하 또는 파괴 목표를 달성하는데 필수적인 개수로 최소화된다. 본 발명의 일 측면에서, 이러한 변형은 브라큐리의 1-229번 위치 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)에서 이루어진다. 본 발명의 일 측면에서, 이러한 변형은 브라큐리의 18-229번 위치 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)에서 이루어진다. 본 발명의 일 측면에서, 이러한 변형은 브라큐리의 66-217번 위치 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)에서 이루어진다. 일 측면에서, 이러한 변형은 브라큐리의 198-222번 위치 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)에서 이루어진다. 일 측면에서, 이러한 변형으로, Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216, Phe217 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)로부터 선택되는, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 결손 또는 치환이 달성된다. 일 측면에서, 이러한 변형으로, 다른 예로 또는 부가적으로, Met87, Pro127, Asp128, Ser129, Pro130, Asn131, Phe132 및/또는 Val175 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)로부터 선택되는, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 아미노산 결손 또는 치환이 달성된다. 일 측면에서, 이러한 변형은, (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치) 브라큐리의 66-217번 위치, 또는 일 측면에서 브라큐리의 198-222번 위치에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24개 또는 그 이상의 연속 아미노산들의 치환 또는 결손이다. 모든 경우들에서, 이들 변형은 DNA 결합 저하 또는 파괴 및/또는 항원을 발현하는 효모의 응집 표현형 저하 목표를 달성한다.

[0061] 전술한 바와 같이, 본 발명에서 이용가능한 브라큐리 항원은, 전술한 변형 외에도, 항원에 작용제 에피토프의 형성을 유발하는 하나 이상의 추가적인 변형을 포함할 수 있다. 본원에 일반적으로 사용되는, "작용제"는, 비-제한적인 예로, 수용체 또는 리간드에 결합하여 반응을 발생 또는 촉발시키는 소분자, 단백질, 펩타이드, 항체, 핵산 결합 물질 등의, 임의의 화합물 또는 물질이며, 수용체 또는 리간드에 결합하는 천연 물질의 작용을 모방 또는 강화하는 물질을 포함할 수도 있다. 본 발명의 브라큐리 항원에 대해 사용되는 경우, "작용제" 항원 또는 단백질은, "미모토프 (mimotope)"로도 지칭될 수 있는, 하나 이상의 T 세포 작용제 에피토프를 포함하는 항원 또는 단백질을 지칭한다. 미모토프 펩타이드는 야생형 에피토프의 구조를 모방하는 펩타이드로서, 미모토프는 작용제로서 천연 에피토프의 작용 (생물 기능)을 모방 또는 강화한다.

[0062] 예를 들어, 서열번호 5의 아미노산 서열 (WLLPGTSTL)은 야생형 브라큐리 단백질의 T 세포 에피토프이다. 서열번호 5는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 246-254번에 위치한다. 서열번호 6의 아미노산 서열 (WLLPGTSTV)은 서열번호 5의 T 세포 에피토프의 미모토프 또는 작용제이다. 따라서, 본 발명의 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 WLLPGTSTV (서열번호 6)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열번호 6의 4번 아미노산 (프롤린 또는 P)이 세린 (S), 트레오닌 (T), 이소루신 (I) 또는 발린 (V)으로 치환된다.

[0063] 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 SQYPSLWSV (서열번호 7)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열번호 7의 2번 아미노산 (이 서열에서 글루타민 또는 Q)이 루신 (L)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열번호 7의 4번 아미노산 (이 서열에서, 프롤린 또는 P)이 세린 (S), 트레오닌 (T), 루신 (L) 또는 발린 (V)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열번호 7의 7번 아미노산 (이 서열에서, 트립토판 또는 W)이 발린 (V), 루신 (L), 이소루신 (I), 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열번호 7의 9번 아미노산 (이 서열에서 발린 또는 V)이 루신 (L)으로 치환된다. 서열번호 7에서 상기한 치환들 중 하나 이상의 임의 조합을 가진 서열을 포함하는 항원은 본 발명에 포함된다.

[0064] 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 RLIASWTPV (서열번호 8)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열번호 8의 1번 아미노산 (이 서열에서 아르기닌 또는 R)이 티로신 (Y) 또는 트립토판 (W)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열번호 8의 6번 아미노산 (이 서열에서 트립토판 또는 W)이 발린 (V), 라이신 (L), 이소루신 (I), 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환된다. 서열번호 8에서 상기한 치환들 중 한가지 또는 둘다의 임의 조합을 가진 서열을 포함하는 항원은 본 발명에 포함된다.

[0065] 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 AMYSFLDFV (서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열번호 9의 2번 아미노산 (이 서열에서 메티오닌 또는 M)이 루신 (L)으로 치환된다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에서, 변형된 브라큐리 항원은, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는, 단백질이다. 서열번호 10의 단백질은 본 발명에 따른 변형된 브라큐리 항원의 일 예로서, 이의 아미노산 서열은 198-222번의 결손에 의해 서열번호 4로 표시되는 인간 브라큐리 단백질의 아

미노산 서열과 상이하다 (즉, 서열번호 4의 198-222번이 서열번호 10에는 존재하지 않음). 다시 말해, 서열번호 10은 서열번호 4의 223-435번에 1-197번이 바로 융합된 단일 폴리펩타이드이다. 이러한 변형된 브라큐리 항원은 파괴된 DNA 결합력을 가지며, 이 항원을 발현하는 효모는 서열번호 4의 브라큐리 단백질과 비교해 저하된 응집 표현형을 가진다. 서열번호 12는 서열번호 10의 변형된 브라큐리 단백질 (서열번호 10의 N-말단 메티오닌이 후술한 N-말단 펩타이드의 부가를 위해 제거되므로, 실제로는 서열번호 10의 2-419번)을 포함하는 융합 단백질이다. 서열번호 12는 N-에서 C-말단 방향으로 융합되는 다음과 같은 서열 인자들을 가진 단일한 폴리펩타이드이다: (1) 효모에서 프로테아좀 분해에 대해 내성을 부여하여 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩타이드 (서열번호 12의 1-6번, Met-Ala-Asp-Glu-Ala-Pro의 아미노산 서열, 이는 본원에서 서열번호 16으로 표시됨); (2) 서열번호 4의 2-197번 및 223-435번으로 구성된 인간 브라큐리 항원, 이는 또한 서열번호 10의 2-410번으로도 언급될 수 있음 (서열번호 12의 7-415번 위치); 및 (3) 헥사시스티딘 태그 (서열번호 12의 416-421번 위치). 서열번호 12의 아미노산 서열과 서열번호 10의 2-410번 아미노산 서열은 서열번호 11의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다.

[0067]

본 발명의 다른 구현예에서, 변형된 브라큐리 항원은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 구성되는 단백질이다. 서열번호 13의 단백질은 본 발명에 따른 변형된 브라큐리 항원의 일 예로서, 이의 아미노산 서열은, (1) 198-222번이 결손되고 (즉, 서열번호 4의 198-222번이 서열번호 13에는 존재하지 않음), (2) 서열번호 4의 254번 (및 서열번호 13의 229번)에 위치한 아미노산 (루신)이 발린으로 치환됨으로써, 서열번호 4로 표시되는 인간 브라큐리 단백질의 아미노산 서열과 상이하다. 다시 말해, 서열번호 13은 서열번호 4의 223-435번에 1-197번이 바로 융합되고; 서열번호 13에 작용제 에피토프를 도입하는 아미노산 변형이 포함된, 단일 폴리펩타이드이다. (서열번호 4) 254번 위치에서 루신에서 발린으로의 치환으로, 이론으로 결부하고자 하는 것은 아니나, 야생형 에피토프 (서열번호 4의 246-254번 위치)와 비교해 브라큐리에 대해 강화된 T 세포 반응을 유도하는 것으로 간주되는, T 세포 작용제 에피토프가 서열번호 13의 221-229번 위치에서 생성된다. 이 작용제 에피토프는 또한 서열번호 6으로 표시된다. 서열번호 13으로 표시되는 이러한 변형된 브라큐리 항원은 파괴된 DNA 결합력을 가지며, 이 항원을 발현하는 효모는 서열번호 4의 브라큐리 단백질과 비교해 감소된 응집 표현형을 가지며, 아울러, 이러한 구조체가 효모-브라큐리 면역치료제 형태로 개체에게 투여될 경우 작용제 에피토프를 더 포함하여 천연 브라큐리에 대해 T 세포 반응을 강화한다. 서열번호 15는 서열번호 13의 변형된 브라큐리 단백질 (서열번호 13의 N-말단 메티오닌이 후술한 N-말단 펩타이드를 부가하기 위해 제거되므로, 실제로는 서열번호 13의 2-410번)을 포함하는 융합 단백질이다. 서열번호 15는 N-말단에서 C-말단 방향으로 융합된 다음과 같은 서열 인자들을 가진 단일한 폴리펩타이드이다: (1) 효모에서 프로테아좀 분해에 대해 내성을 부여하여 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩타이드 (서열번호 15의 1-6번 위치, 이 아미노산 서열은 서열번호 16으로 표시됨); (2) 서열번호 4의 2-197번 및 223-435번으로 구성된 인간 브라큐리 항원, 그리고 추가적으로 서열번호 4의 254번 위치에서 발린의 루신으로의 치환을 포함함, 이는 또한 서열번호 13의 2-410번으로 기술될 수 있음 (서열번호 15의 7-415번); 및 (3) 헥사시스티딘 태그 (서열번호 15의 416-421번). 서열번호 15의 아미노산 서열과 서열번호 13의 2-410번 위치의 아미노산 서열은 서열번호 14의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다. 이 융합 단백질을 발현하는 효모-기반의 면역치료학적 조성물은 또한 본원에서 GI-6306으로 지칭된다.

[0068]

본 발명의 다른 구현예에서, 변형된 브라큐리 항원은, 야생형 브라큐리 단백질의 아미노산 서열 (예, 서열번호 2, 서열번호 4 또는 여러가지 인간 브라큐리 단백질의 대응되는 서열)과, 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 16개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상 또는 24개 이상의 아미노산 결손 차이가 있는, 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 이로 구성되는 단백질이며, 이들 결손될 수 있는 아미노산 잔기는 하기로부터 선택된다: (1) (서열번호 2 또는 서열번호 4에 제시된 위치) Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216, Phe217, Met87, Pro127, Asp128, Ser129, Pro130, Asn131, Phe132 및/또는 Val175로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산, 더 바람직하게는 (서열번호 2 또는 서열번호 4에 제시된 위치) Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216, Phe217 중 하나 이상의 결손; (2) 야생형 브라큐리 단백질의 1-229번 (서열번호 2 또는 서열번호 4에 제시된 위치)에 위치한 하나 이상의 아미노산; (3) 야생형 브라큐리 단백질의 66-217번 (서열번호 2 또는 서열번호 4에 제시된 위치)에 위치한 하나 이상의 아미노산; 또는 (4) 야생형 브라큐리 단백질의 198-222번 (서열번호 2 또는 서열번호 4에 제시된 위치)에 위치한 하나 이상의 아미노산. 모든 경우에, 변형된 브라큐리 항원은 감소된 또는 파괴된 DNA 결합 활성을 가지거나 및/또는 이 항원을 발현하는 효모는 감소된 응집 표현형을 가진다. 일 측면에서, 변형된

브라큐리 항원은 후술한 "거의 전장 (near-full length)" 브라큐리 단백질일 수 있는데, 이는 이 단백질이 야생형 서열과 비교해 N- 및/또는 C-말단에서 1 내지 10개의 아미노산이 결손될 수 있다는 것을 의미한다.

[0069] 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 하나 이상의 작용제 에피토프 (예, 서열번호 6, 또는 임의의 다른 작용제 에피토프, 예를 들어 전술한 서열번호 5, 7, 8 또는 9의 서열의 작용제)를 더 포함한다.

[0070] 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은, 전술한 변형된 브라큐리 항원 외에도, 또한 선택적으로 하기를 포함할 수 있는, 융합 단백질의 일부이다: (1) 프로테아좀의 분해에 대해 내성을 부여하고 발현을 안정화하도록 설계된, 서열번호 16으로 표시되는 합성 N-말단 펩타이드인, N-말단 펩타이드, 이는 효모 alpha 인자 서열 또는 본원에 기술된 효모-기반의 면역치료와 함께 사용하기에 적합한 다른 N-말단 펩타이드로 치환될 수 있음; (2) 헥사히스티딘 태그 등의 융합 단백질을 분리 또는 동정하기 위해 사용가능한 C-말단 펩타이드; (3) 융합 단백질 내 세그먼트를 연결하기 위해 사용되는 1, 2, 3 또는 그 보다 많은 수의 아미노산으로 구성된 링커 펩타이드; 및/또는 (4) 또 다른 브라큐리 항원 또는 다른 (비-브라큐리) 항원일 수 있는, 바람직하게는 암 항원인, 다른 항원.

[0071] 본 발명의 다른 구현예에서, 변형된 브라큐리 항원은, 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상 또는 24개 이상의 아미노산이 그 위치에서 천연적인 아미노산과 다른 아미노산 잔기로 치환됨으로써, 야생형 브라큐리 단백질의 아미노산 서열 (예, 서열번호 2, 서열번호 4 또는 다른 인간 브라큐리 단백질의 대응되는 서열)과 상이한, 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 구성되는 단백질이다. 치환될 수 있는 아미노산 잔기는 하기로부터 선택된다: (1) (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치) Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216, Phe217, Met87, Pro127, Asp128, Ser129, Pro130, Asn131, Phe132 및/또는 Val175로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산, 바람직하게는, Lys66, Arg69, Arg70, Arg101, Lys103, Lys147, Asn150, Lys151, Ser162, Thr196, Ala197, Tyr198, Ile208, Asn211, Pro212, Phe213, Ala214, Lys215, Ala216, Phe217 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치) 중 하나 이상의 위치에서의 치환; (2) 야생형 브라큐리 단백질 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)의 1-229번 위치에 위치한 하나 이상의 아미노산; (3) 야생형 브라큐리 단백질 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)의 66-217번 위치에 위치한 하나 이상의 아미노산; 또는 (4) 야생형 브라큐리 단백질 (서열번호 2 또는 서열번호 4에서의 위치와 대응되는 위치)의 198-222번 위치에 위치한 하나 이상의 아미노산. 모든 경우에, 치환으로, 변형된 브라큐리 항원은 감소 또는 파괴된 DNA 결합 활성을 가지거나 및/또는 이 항원을 발현하는 효모는 감소된 응집 표현형을 가지게 된다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 후술한 바와 같이 "거의 전장" 브라큐리 단백질일 수 있으며, 이는 이 단백질이 야생형 서열과 비교해 N- 및/또는 C-말단으로부터 1-10개의 아미노산이 결여될 수 있다는 것을 의미한다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은 하나 이상의 작용제 에피토프 (예, 서열번호 6 또는 임의의 다른 작용제 에피토프, 예를 들어, 전술한 서열번호 5, 7, 8 또는 9의 서열의 작용제)를 더 포함한다. 일 측면에서, 변형된 브라큐리 항원은, 전술한 변형된 브라큐리 항원 외에도, 선택적으로 하기를 포함할 수도 있는, 융합 단백질의 일부이다: (1) 프로테아좀의 분해에 대해 내성을 부여하고 발현을 안정화하도록 설계된, 서열번호 16으로 표시되는 합성 N-말단 펩타이드인, N-말단 펩타이드, 이는 효모 alpha 인자 서열 또는 본원에 기술된 효모-기반의 면역치료제와 함께 사용하기에 적합한 다른 N-말단 펩타이드로 치환될 수 있음; (2) 헥사히스티딘 태그 등의 융합 단백질을 분리 또는 동정하기 위해 사용가능한 C-말단 펩타이드; (3) 융합 단백질 내 세그먼트를 연결하기 위해 사용되는 1, 2, 3 또는 그 보다 많은 수의 아미노산으로 구성된 링커 펩타이드; 및/또는 (4) 또 다른 브라큐리 항원 또는 다른 (비-브라큐리) 항원일 수 있는, 바람직하게는 암 항원인, 다른 항원.

[0072] 인간 브라큐리는 다른 동물 종으로부터 유래된 브라큐리와 상동성이 매우 높으므로, 따라서 특히 서열이 동일하고, 실질적으로 상동하며, 표적 항원 (예, 종양 세포에 의해 발현되는 천연 브라큐리)에 대한 효과적인 면역 반응을 유발하는 경우, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 제조시, 본원에 기술된 예시적인 인간 서열과 상이한 인간 브라큐리 서열 또는 다른 유기체 유래의 브라큐리 서열을 이용할 수 있다. 예를 들어, 허만 그룹 (Hermann et al., *supra*)에 의해 1990년에 최초 클로닝된 설치류 브라큐리는, 뉴클레오티드 수준에서 인간 브라큐리와 약 85% 동일하며, 아미노산 수준에서는 약 91% 동일하다. 다른 동물 유래 브라큐리의 경우, 아미노산 수준에서, 인간 브라큐리는 판 트로글로디테스 (*Pan troglodytes*) 유래 브리큐리와 99.5% 동일하고, 카니스 루푸스 패밀리어리스 (*Canis lupus familiaris*) 유래 브라큐리와 90.1% 동일하고, 보스 타우루스 (*Bos Taurus*) 유래 브라큐리와 88.5% 동일하고, 라투스 노르베기쿠스 (*Rattus norvegicus*) 유래 브라큐리와 92.2% 동일하고,

갈루스 (*Gallus*) 유래 브라큐리와 80.9% 동일하다. T-박스 도메인을 포함하는 브라큐리의 1-223번 아미노산의 경우, 마우스와 인간 브라큐리는 아미노산 차이가 2개에 불과하다 (26번 위치와 96번 위치).

[0073] 본 발명의 임의의 구현예에서, "전장" 단백질 (또는 전장 기능성 도메인 또는 전장 면역 도메인)에 대한 언급은, 본원에 기술되거나 또는 공개적으로 이용가능한 서열에 공지 또는 기술된 바와 같이, 단백질, 기능성 도메인 또는 면역 도메인의 전장 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 단백질의 상동체 타입인 "거의 전장"인 단백질 또는 도메인은, 상기한 전장 단백질 또는 전장 도메인의 N- 및/또는 C-말단으로부터 아미노산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 부가, 결손 또는 생략에 의해, 전장 단백질 또는 도메인과 차이를 가진다. 예를 들어, 본원에 언급되는 융합 단백질 수종은, 항원이 1번 위치의 메티오닌을 생략하고 N-말단 펩타이드를 치환하므로, "거의 전장" 브라큐리 항원을 포함한다. 단백질, 도메인 또는 항원에 대한 일반적인 언급은 전장 및 거의 전장 단백질 뿐만 아니라 이들의 다른 상동체 모두를 포함할 수 있다.

[0074] 브라큐리 항원 또는 암 항원과 관련된 임의의 구현예들에 대한 일 측면에서, 항원은 효모에 의해 항원을 발현하기에 충분한 최소한의 크기이다. 효모에서 발현하기 위해, 단백질은 전형적으로 약 25개 이상의 아미노산 길이이나, 더 작은 단백질로도 발현시킬 수 있으며, 상당히 더 큰 단백질도 효모에 의해 발현시킬 수 있다. 본 발명에 사용가능한 암 항원은 효모에 의해 재조합으로 발현시킬 수 있으며; 하나 이상의 면역 도메인을 포함하는, 암 단백질의 단편이다. 일 구현예에서, 본 발명에 사용가능한 암 항원은 적어도 25개 아미노산 길이, 또는 적어도: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425 또는 430개의 아미노산 길이이다.

[0075] 또한, 본 발명에서 사용가능한 브라큐리 항원 (변형된 브라큐리 항원 포함)은, 본원에 언급된 임의의 변형된 브라큐리 항원의 아미노산 서열 (예, 서열번호 10, 12, 13 또는 15)과 단백질의 전장에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가진 단백질을 포함하며, 브라큐리 항원은 본 발명의 변형된 브라큐리 항원의 특징들 (즉, 감소 또는 파괴된 DNA 결합 활성 및/또는 이 항원을 발현하는 효모는 감소된 응집 표현형을 가짐)을 가진다.

[0076] 상기에서 간단히 기술된 바와 같이, 본원에 언급된 융합 단백질과 관련하여 기술된 등의, N-말단 발현 서열 및 C-말단 태그는 선택적이지만, 단백질의 발현, 안정성을 개선 또는 보조하거나 및/또는 동정 및/또는 정제를 허용하기 위해, 본원의 도처에 언급된 수종의 여러 서열들로부터 선택될 수 있다. 또한, 효모에 사용하기 적합한 다수의 여러가지 프로모터들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 더욱이, 짧은 개재 링커 서열 (intervening linker sequence) (예, 아미노산 1, 2, 3, 4 또는 5개 길이의 펩타이드)이, 숙주 파괴소 프로테아제 (host phagosomal protease)의 절단 부위로서 클로닝을 용이하게 하기 위해, 단백질 또는 항원 프로세싱을 가속화하기 위해, 그리고 구조체의 향후 조작을 위해 제한 효소 부위를 도입하는 등의 다양한 이유로, 브라큐리 항원을 포함하는 융합 단백질의 영역들 사이에 도입될 수 있다.

[0077] 선택적으로, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 구성 성분으로서 사용되는 융합 단백질 등의 단백질은, 효모에서 이중 항원의 발현을 개선 또는 안정화하는데 특히 유용한 항원 구조체를 이용하여 제조된다. 일 구현예에서, 바람직한 항원 단백질(들) 또는 펩타이드(들)는, 이의 아미노-말단에서, (a) 효모 비히클에서 융합 단백질의 발현을 안정화하거나 발현된 융합 단백질의 번역후 수정을 방지하는, 특정 합성 펩타이드 (이들 펩타이드는, 예를 들어, 2004. 8. 12 공개된 미국 특허 공보 제 2004-0156858 A1호에 상세히 기술되어 있음, 상기 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨); (b) 비-제한적인 예로, 효모 알파 인자 리더 서열 등의, 내인성 효모 단백질의 적어도 일부 (각 융합 파트너는 효모에서 단백질 발현 안정성의 개선을 제공하고 및/또는 효모 세포에 의한 단백질의 번역후 수정을 방지함) (이러한 단백질은 상세하게는, 예를 들어, 미국 특허 공보 제 2004-0156858 A1에 기재됨); 및/또는 (c) 융합 단백질이 효모 표면 상에서 발현되도록 야기하는 효모 단백질의 적어도 일부 (예를 들어, 본원에 더욱 상세히 기재되는 Aga 단백질)와 융합된다. 효모 세포에서 항원의 발현 안정성을 강화하거나 및/또는 효모에서 단백질의 번역 후 수정을 방지하는, 합성 서열의 예로는, 서열 M-A-D-E-A-P (본원에서는 서열번호 16으로 제시됨)를 포함한다. 또한, 본 발명은 선택적으로 특히 단백질의 선별 및 동정에 사용하기 위해 항원-코딩 구조체의 C-말단에 융합되는 펩타이드의 사용을 포함한다. 이러한 펩타이드로는, 비-제한적으로, 펩타이드 태그 (예, 6X His 또는 핵사펩타이드) 또는 임의의 다른 짧은 에피토프 태그 등의 임의의 합성 또는 천연 펩타이드 등이 있다. 본 발명에 따라 항원의 C-말단에 부착되는 펩타이드는 전술한 N-말단

펩타이드의 부가와 더불어 또는 부가없이 사용될 수 있으며, 그 반대로도 사용될 수 있다.

- [0078] 본 발명에서, 효모-브라쿠리 면역치료학적 조성물에 사용되는 효모 비히클은, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 치료학적 또는 예방학적 조성물)에서 하나 이상의 항원, 이의 면역원성 도메인 또는 에피토프와 함께 사용될 수 있는, 임의의 효모 세포 (예를 들어, 전세포 또는 무손상 세포) 또는 이의 유도체 (이하 참조)이다. 효모 비히클은, 따라서, 살아 있는 무손상 (전) 효모 미생물 (즉, 세포벽을 비롯한 이의 모든 성분들을 가진 효모 세포), 사멸된(죽은) 또는 불활성화된 무손상 효모 미생물, 또는 효모 스페로플라스트 (즉, 세포벽이 없는 효모 세포), 효모 사이토플라스트 (즉, 세포벽과 핵이 없는 효모 세포), 효모 고스트 (즉, 세포벽, 핵 및 세포질이 없는 효모 세포), 준세포 효모막 추출물 (subcellular yeast membrane extract) 또는 이의 분획 (효모 막 입자, 이전에는 준세포 효모 입자로도 지칭됨), 임의의 다른 효모 입자 또는 효모 세포벽 조제물 등의, 무손상 효모의 파생물을 포함할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 효모 스페로플라스트는 전형적으로 효모 세포벽의 효소 분해에 의하여 제조된다. 이러한 방법은, 예를 들어, Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0080] 효모 사이토플라스트는 전형적으로 효모 세포의 탈핵에 의해 제조된다. 이러한 방법은 예를 들어 Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0081] 효모 고스트는 전형적으로 투과화된 또는 세포분해된 세포의 재밀봉에 의하여 제조되며, 세포의 세포 소기관을 적어도 일부를 함유할 수 있으나 반드시 그런 것은 아니다. 이러한 방법은, 예를 들어, Franzusoff et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614 및 Bussey et al., 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 각각 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0082] 효모 막 입자 (준세포 효모 막 추출물 또는 그 분획)는 천연 핵 또는 세포질이 제거된 효모 막을 의미한다. 이 입자는 천연 효모 막의 크기에서부터 초음파 처리 또는 당업계에 공지된 기타 막 파괴 방법과 후속적인 재밀봉에 의하여 제조되는 미세입자 범위의 크기를 포함하는, 임의의 크기일 수 있다. 준세포 효모 막 추출물의 제조 방법은, 예를 들어, Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674에 기재되어 있다. 효모 막 일부를 함유하는 효모 막 입자의 분획 또한 사용될 수 있으며, 효모 막 입자의 제조 전에 효모에 의해 항원 또는 기타 단백질이 재조합에 의하여 발현되는 경우, 대상 항원 또는 기타 단백질을 함유한 효모 막 입자의 분획이 사용될 수 있다. 대상 항원 또는 기타 단백질은 막 안으로, 막 표면 상에 또는 이들 조합으로 (즉, 단백질이 막 내부 및 외부 모두에 및/또는 효모 막 입자의 막에 걸쳐 있을 수 있음) 로딩될 수 있다. 일 구현예에서, 효모 막 입자는, 막 표면 상에 또는 막 내에 적어도 부분적으로 매립되는 하나 이상의 원하는 대상 항원 또는 기타 단백질을 포함하는, 무손상, 파괴된 또는 파괴 및 재밀봉된 효모 막일 수 있는, 재조합 효모 막 입자이다.
- [0083] 효모 세포벽 조제물의 예는, 효모 세포벽 조제물이 동물에 투여되었을 때 질환 표적에 대하여 원하는 면역 반응을 자극하도록, 표면 상에 탑재되거나 또는 세포벽 내에 적어도 부분적으로 매립된 항원을 수반하는, 단리된 효모 세포벽 조제물이다.
- [0084] 임의의 효모 균주를 이용하여 본 발명의 효모 비히클을 제조할 수 있다. 효모는 세 가지 강(class): 자낭균류(Ascomycetes), 담자균류(Basidiomycetes) 및 불완전 균류(Fungi Imperfecti) 중 하나에 속하는 단세포성 미생물이다. 면역 조절제로서 사용하기 위한 효모 유형을 선택하는데 있어 한가지 고려 사항은 효모의 병원성이다. 일 구현예에서, 효모는 사카로마이세스 세레비지에와 같은 비-병원성 균주이다. 비-병원성 효모 균주의 선택은 효모 비히클을 투여받는 개체에 대한 부작용을 최소화한다. 그러나, 효모의 병원성을 당업계에 공지된 임의의 수단 (예를 들어, 돌연변이 균주)에 의해 없앨 수 있다면, 병원성 효모를 사용할 수도 있다. 본 발명의 일 측면에 따르면, 비-병원성 효모 균주가 사용된다.
- [0085] 본 발명에 사용될 수 있는 효모 균주의 속은, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 칸디다(*Candida*: 병원성일 수 있음), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 한세놀라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피키아(*Pichia*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 시조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*) 및 야로이아(*Yarrowia*)를 포함하나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 일 측면에서, 효모 속은 사카로마이세스, 칸디다, 한세놀라, 피키아 또는 시조사카로마이세스로부터 선택되고, 일 측면에서, 사카로마이세스가 사용된다. 본 발명에 사용될 수 있는 효모 균주의 종은 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스버그시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 케피르(*Candida kefyr*), 칸디다

트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 크립토코커스 라우렌티(*Cryptococcus laurentii*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 한세놀라 아노말라(*Hansenula anomala*), 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 클루이베로마이세스 프라길리스(*Kluyveromyces fragilis*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로마이세스 마르시아누스 var. 락티스(*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 로도토룰라 루브라(*Rhodotorula rubra*), 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 및 야로이아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)를 포함하나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 다수의 이들 종들은 이들 종들에 포함되는 것으로 의도되는 다양한 아종, 타입, 아형 등을 포괄하는 것으로 이해될 것이다. 일 측면에서, 본 발명에 사용되는 효모 종은 *S. 세레비지애*(*S. cerevisiae*), *C. 알비칸스*(*C. albicans*), *H. 폴리모르파*(*H. polymorpha*), *P. 파스토리스*(*P. pastoris*) 및 *S. 폼베*(*S. pombe*)를 포함한다. *S. 세레비지애*(*S. cerevisiae*)가 비교적 조작이 용이하고 "일반적으로 안전한 것으로 인식되고" 있거나 또는 식품 첨가제로서 사용하기 위한 "GRAS" (GRAS, FDA proposed Rule 62FR18938, April 17, 1997)로 인식되고 있어, 유용하다. 본 발명의 일 구현예는 *S. 세레비지애* cir^0 균주와 같은, 특히 고 카피수로 플라스미드를 복제할 수 있는 효모 균주이다. *S. 세레비지애* 균주는, 하나 이상의 표적 항원(들) 및/또는 항원 융합 단백질(들) 및/또는 기타 단백질이 높은 수준으로 발현되도록 하는, 발현 벡터를 지원할 수 있는 균주이다. 본 발명에 유용한 다른 효모 균주는 사카로마이세스 세레비지애 W303 α 이다. 또한, N-연결성 당화를 연장하는 효소에 대한 돌연변이 등의, 발현된 표적 항원 또는 기타 단백질의 번역후 수정을 감소시키는 균주 등의, 임의의 돌연변이 효모 균주가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0086] 효모 비히클의 제조 방법과, 효모 비히클을 대상 항원 및/또는 기타 단백질 및/또는 물질과 함께 발현, 조합 및/또는 결합시켜 효모-기반의 면역요법 조성물을 제조하는 방법들은 본 발명에 포함된다.

[0087] 본 발명에 따르면, 용어 "효모 비히클-항원 복합체" 또는 "효모-항원 복합체"는 효모 비히클과 항원의 모든 조합을 언급하기 위해 일반적으로 사용되며, 조성물이 상기한 바와 같이 면역 반응을 도출하기 위해 사용되는 경우에는, "효모-기반의 면역요법 조성물"과 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 이러한 조합은 효모 (재조합 효모)에 의한 항원의 발현, 항원의 효모내 도입, 항원의 효모에의 물리적 부착, 및 완충액 또는 기타 용액 또는 제형내에서 등의 효모와 항원의 혼합을 포함한다. 이러한 유형의 복합체들은 아래에서 상세하게 설명된다.

[0088] 일반적으로, 효모 비히클 및 항원(들) (및/또는 기타 물질들)은 본원에 기재된 임의의 기법을 통해 서로 조합될 수 있다. 일 측면에서, 효모 비히클은 항원(들)과 함께 세포 안에 로딩된다. 다른 측면에서, 항원(들)은 효모 비히클에 공유 결합 또는 비-공유 결합에 의해 부착된다. 또 다른 측면에서, 효모 비히클 및 항원(들)은 혼합에 의해 조합된다. 다른 측면에서, 일 구현예에서, 항원(들)은, 효모 비히클에 의해, 또는 효모 비히클이 유래되는 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트에 의해, 재조합에 의해 발현된다.

[0089] 본 발명의 일 구현예에서, 효모 비히클에서 항원 또는 기타 단백질을 재조합으로 발현시키는 방법의 대안으로서, 효모 비히클에, 단백질 또는 펩타이드, 또는 항원으로서 이용되거나 및/또는 본 발명에 따른 면역 조절제 또는 생물학적 반응 변형제로서 유용한 탄수화물 또는 기타 분자를, 세포 안에 로딩한다. 이어서, 항원 및/또는 기타 단백질을 이제 세포 안에 함유하는 효모 비히클을 개체에게 투여하거나, 또는 수지상 세포와 같은 담체에 로딩할 수 있다. 펩타이드 및 단백질은, 확산, 능동 수송, 리포솜 융합, 전기천공, 식세포 작용, 냉동-해동 사이클 및 조내 조음과 처리와 같은, 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 기술에 의해, 본 발명의 효모 비히클내에 직접 삽입할 수 있다. 펩타이드, 단백질, 탄수화물 또는 기타 분자가 직접 로딩될 수 있는 효모 비히클은 무손상 효모 뿐만 아니라, 제조 후 항원 및 기타 물질이 로딩될 수 있는, 스페로플라스트, 고스트 또는 사이토플라스트를 포함한다. 다른 예로, 무손상 효모에 항원 및/또는 물질을 로딩한 다음, 스페로플라스트, 고스트, 사이토플라스트 또는 준세포 입자를 이로부터 제조할 수 있다.

[0090] 본 발명의 다른 구현예에서, 항원 및/또는 기타 물질이 효모 비히클에 물리적으로 부착된다. 항원 및/또는 기타 물질의 효모 비히클에의 물리적 부착은, 비-제한적으로, 항체 또는 기타 결합 파트너의 사용에 의해서와 같이, 효모 비히클 외표면에 항원 및/또는 기타 물질의 화학적인 가교 또는 효모 비히클의 외표면에의 항원 및/또는 기타 물질의 생물학적 결합을 포함하는, 공유 및 비-공유 결합 방법 등의, 당업계에 적합한 임의의 방법에 의하여 달성될 수 있다. 화학적 가교는, 예를 들어, 글루타르알데히드 결합, 광친화성 표지, 카보디이미드 처리, 다이-설파이드 결합을 연결할 수 있는 화학제 처리 및 기타 당업계에 표준인 기타 가교 화학제 처리를 비롯한 방법들에 의해 달성될 수 있다. 다른 예로, 효모의 외표면이 항원 및/또는 특정 전하 특성을 가지는 기타 물질에 융합 또는 결합할 가능성이 높도록 세포벽의 조성 또는 효모막의 지질 이중층의 전하를 바꾸는 화학제에, 효모 비히클을 접촉시킬 수 있다. 항체, 결합 펩타이드, 가용성 수용체 및 기타 리간드와 같은 표적화 제제들 또한

항원에 융합 단백질로서 통합되거나 또는 효모 비히클에 항원을 결합시키기 위해 항원과 조합될 수 있다.

[0091] 항원 또는 기타 단백질이 효모의 표면 상에 발현되거나 이에 물리적으로 부착되는 경우, 일 측면에서, 스페이서 암 (spacer arm)이 상기 표면 상에서 항원 또는 기타 단백질의 발현 또는 유지를 최적화하도록 조심스럽게 선택될 수 있다. 스페이서 암(들)의 크기는 효모 표면 상에 결합을 위해 노출되는 항원 또는 기타 단백질의 양에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 어떤 항원(들) 또는 기타 단백질(들)이 사용되고 있는지에 따라, 당해 기술 분야의 당업자는 효모 표면 상에 항원 또는 기타 단백질에 대한 적절한 공간 형성을 유발하는 스페이서 암을 선택할 것이다. 일 구현예에서, 스페이서 암은 450개 이상의 아미노산으로 된 효모 단백질이다.

[0092] 또 다른 구현예에서, 효모 비히클 및 항원 또는 기타 단백질은, 효모 비히클과 항원 또는 기타 단백질을 완충액 또는 기타 적합한 제형 내에서 가볍게 혼합함에 의해서와 같이 (예를 들어, 혼합물), 보다 수동적인, 비-특이적 또는 비-공유결합 메커니즘에 의하여 서로 조합된다.

[0093] 일 구현예에서, 효모 비히클 제조에 사용되는 효모 세포는, 단백질 (예, 항원)을 코딩하는 이중 핵산 분자로, 그 단백질이 상기 효모 세포에 의해 발현되도록, 형질감염된다. 이러한 효모는 또한 본원에서 재조합 효모로도 언급된다. 그런 후, 효모 세포는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 사용해 제형화되어, 환자에 직접 투여되거나, 추후 투여를 위하여 저장되거나, 또는 무손상 세포로서 수지상 세포에 로딩될 수 있다. 효모 세포는 또한 사멸되거나, 또는 효모 스페로플라스트, 사이토플라스트, 고스트 또는 준세포 입자의 형성에 의해서와 같이 파생될 수 있으며, 이들 중 임의의 것은 이후 저장, 투여 또는 수지상 세포에 로딩될 수 있다. 효모 스페로플라스트는 또한 항원을 발현하는 재조합 스페로플라스트를 제조하기 위해, 재조합 핵산 분자로 직접 형질전환될 수 있다 (예를 들어, 전효모로부터 스페로플라스트를 만든 후 형질감염). 항원(들)을 재조합에 의하여 발현하는 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트를 사용하여, 효모 사이토플라스트, 효모 고스트 또는 효모 막 입자 또는 효모 세포벽 입자, 또는 이의 분획을 포함하는 효모 비히클을 제조할 수도 있다.

[0094] 본 발명의 효모 비히클에서의 항원 또는 기타 단백질의 발현은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 기법을 이용하여 달성된다. 간략하게는, 하나 이상의 원하는 항원 또는 기타 단백질을 코딩하는 핵산 분자를, 숙주 효모 세포를 형질전환하였을 때 핵산 분자의 구성적 또는 조절성 발현을 구현할 수 있도록 하기 위해, 핵산 분자가 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 방식으로, 발현 벡터에 삽입한다. 하나 이상의 항원 및/또는 기타 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 하나 이상의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 발현 벡터에 있을 수 있다. 특히 중요한 발현 조절 서열은 프로모터 및 상류 활성화 서열 등의, 전사 개시를 조절하는 것이다. 임의의 적합한 효모 프로모터가 본 발명에 사용될 수 있으며, 다양한 그러한 프로모터들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 알려져 있다. 사카로마이세스 세레비지에에서 발현시키기 위한 프로모터로는, *ADH2/GAPDH* 및 *CYC1/GAL10* 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터, 세포 내 글루코스 농도가 낮을 때 (예를 들어, 약 0.1 내지 약 0.2%) 유도되는 *ADH2/GAPDH* 프로모터, 및 *CUP1* 프로모터 및 *TEF2* 프로모터를 비롯하여, 다음과 같은 효모 단백질을 코딩하는 유전자의 프로모터를 포함하나, 이들로 한정되는 것은 아니다: 알코올 데하이드로게나제 I (ADH1) 또는 II (ADH2), CUP1, 포스포글리세레이트 키나제 (PGK), 트리오스 포스페이트 이소머라제 (TPI), 번역 연장 인자 EF-1 알파 (TFE2), 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나아제 (GAPDH: 트리오스 포스페이트 데하이드로게나아제의 경우, TDH3으로도 언급됨), 갈락토키나제 (GAL1), 갈락토오스-1-포스페이트 우리딜-트랜스퍼라제 (GAL7), UDP-갈락토오스 에피머라제 (GAL10), 시토크롬 c1 (CYC1), Sec7 단백질 (SEC7) 및 액시드 포스파타제 (PHO5). 마찬가지로, 인핸서로 지칭되는 다수의 상류 활성화 서열 (UAS)들이 공지되어 있다. 사카로마이세스 세레비지에에서의 발현을 위한 상류 활성화 서열로는 다음과 같은 단백질을 코딩하는 유전자의 UAS 뿐만 아니라 GAL4 유전자 산물에 의해 활성화되는 기타 UAS를 포함하나, 이들로 한정되지 않으며, ADH2 UAS가 일 측면에서 사용된다: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 및 GAL10. ADH2 UAS는 ADR1 유전자 산물에 의해 활성화되므로, 이중 유전자가 ADH2 UAS에 작동가능하게 연결되었을 때 ADR1을 과발현시키는 것이 바람직할 것이다. 사카로마이세스 세레비지에에서 발현시 전사 종결 서열은 α -인자 (α -factor), GAPDH 및 CYC1 유전자의 종결 서열들을 포함한다.

[0095] 메탄영양성 효모 (methyltrophic yeast)에서 유전자를 발현시킬 경우 전사 조절 서열은 알코올 옥시다제 및 포르메이트 데하이드로게나아제를 코딩하는 유전자들의 전사 조절 영역들을 포함한다.

[0096] 본 발명에 따른 효모 세포를 핵산 분자로 형질감염하는 것은 핵산 분자가 세포 내로 도입될 수 있는 임의의 방법에 의하여 달성될 수 있으며, 비-제한적으로, 확산, 능동 수송, 조 초음파처리 (bath sonication), 전기천공, 미세주입, 리포펙션, 흡착 및 프로토플라스트 융합을 포함한다. 형질감염된 핵산 분자는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 효모 염색체에 통합되거나 또는 염색체의 벡터에서 유지될 수 있다. 이러한 핵

산 분자를 운반하는 효모 비히클의 예는 본원에 상세히 개시되어 있다. 전술한 바와 같이, 효모 사이토플라스트, 효모 고스트 및 효모 막 입자 또는 세포벽 조제물 역시, 무손상 효모 미생물 또는 효모 스페로플라스트를 원하는 핵산 분자로 형질감염시키고, 그 안에서 항원을 생산한 다음, 상기 미생물 또는 스페로플라스트를 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 추가로 조작하여 원하는 항원 또는 기타 단백질을 함유하는 사이토플라스트, 고스트 또는 준세포 효모 막 추출물 또는 그의 분획을 생산함으로써, 재조합에 의하여 제조할 수 있다.

[0097] 재조합 효모 비히클의 제조 및 효모 비히클에 의한 항원 및/또는 기타 단백질의 발현에 효과적인 조건은 효모 균주가 배양될 수 있는 효과적인 배지를 포함한다. 효과적인 배지는, 전형적으로, 동화가능한 탄수화물원, 질소 원 및 인산원, 뿐만 아니라 적절한 경우 염, 미네랄, 금속 및 기타 영양분, 예를 들어 비타민 및 성장 인자를 포함하는, 수성 배지이다. 배지는 복합 영양분을 포함할 수 있거나, 또는 소정의 최소 배지일 수 있다. 본 발명의 효모 균주는, 비-제한적으로, 생물반응기, 예를 들어 바이올리 플라스크, 시험관, 마이크로타이터 디쉬 및 페트리 플레이트 등의, 다양한 용기에서 배양할 수 있다. 배양은 효모 균주에 적절한 온도, pH 및 산소 함량에서 수행된다. 이러한 배양 조건은 당업자의 전문 지식내에서 잘 알려져 있다 (예, Guthrie et al. (eds.), 1991, Methods in Enzymology, vol. 194, Academic Press, San Diego 참조). 예를 들어, 하나의 프로토콜 하에, 적정 배지를 함유하는 배양물은, 효모-브라큐리 면역치료 조성물의 스타터 플레이트로부터 수득되는 배양물 및/또는 스타터 배양액을 이용하여 접종될 수 있으며, 250 rpm에서 교반하면서 30℃에서 대략 20시간 동안 증식시킨다. 그런 후, 1차 배양을 필요에 따라 더 큰 규모의 배양으로 확대할 수 있다. 효모에 형질전환되는 벡터로부터의 단백질 발현 (예를 들어, 브라큐리 발현)은, 사용되는 프로모터가 구성적 프로모터인 경우, 구성적일 수 있거나, 또는 사용되는 프로모터가 유도성 프로모터인 경우 그 프로모터에 대한 적합한 유도 조건 (예를 들어, CUP1 프로모터의 경우 황산구리)을 부여함으로써 유도할 수 있다. 유도성 프로모터의 경우, 단백질 발현의 유도는 배양물이 약 0.2 Y.U./ml 또는 그 이상의 밀도일 수 있는 적정 세포 밀도로 증식된 이후에, 착수할 수 있다.

[0098] 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 배양에 적합한 배지에 대한 비-제한적인 일 예는 U2 배지이다. U2 배지는 다음과 같은 구성 성분들을 포함한다: 글루코스 20g/L, 황산암모늄을 포함하는 효모 질소 베이스 6.7 g/L 및 히스티딘, 루신, 트립토판 및 아데닌 각각 0.04 mg/mL. 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 배양에 적합한 배지에 대한 비-제한적인 또 다른 예는 UL2 배지이다. UL2 배지는 다음과 같은 구성 성분들을 포함한다: 글루코스 20g/L, 황산암모늄을 포함하는 효모 질소 베이스 6.7 g/L 및 히스티딘, 트립토판 및 아데닌 각각 0.04 mg/mL.

[0099] 본 발명에 따른 효모 비히클에서 변형된 브라큐리 항원을 발현하기 위해 유도성 프로모터 (예, CUP1 프로모터)가 사용되는 경우, 대부분의 단백질을 그러한 프로모터를 이용해 효모에서 발현시키기에 적합한 세포 밀도와 비교해 더 높은 세포 밀도에서 단백질의 발현 유도가 개시된다. CUP1 프로모터에 의해 구동되는 최상의 브라큐리 항원 발현은, 효모에서 브라큐리 항원을 유도 발현하기 전에, 브라큐리 항원을 발현하는 효모를 적어도 0.5 Y.U./ml 내지 약 2.0 Y.U./ml, 일 측면에서, 0.5 Y.U./ml 내지 약 1.5 Y.U./ml, 일 측면에서, 적어도 1.0 Y.U./ml 내지 약 2.0 Y.U./ml, 다른 측면에서, 적어도 약 1.0 Y.U./ml의 세포 밀도로 증식시킬 수 있을 때, 달성된다. 본 발명의 일 구현예에서, CUP1 프로모터와 같은 유도성 프로모터의 통제 하에 항원 발현되는 효모-브라큐리 면역치료 조성물은, 항원 발현을 유도하기 전에 중기-대수기 (mid-log phase)까지 배양된다. 일 측면에서, 세포는 항원 발현을 유도하기 전에 약 1 내지 2 Y.U./ml까지 배양된다. 일 측면에서, 항원 발현은 (예, 황산구리 첨가에 의해) 유도되어, 최대 6, 6.5, 7, 7.5 또는 8시간 동안 지속된다. 일 측면에서, 유도는 약 30℃의 온도 및 교반 속도 250 rpm에서 이루어진다.

[0100] 본 발명의 일부 구현예에서, 효모는 중성 pH 조건에서 배양된다. 본원에서, 용어 "중성 pH"의 일반적인 사용은 약 pH 5.5 내지 약 pH 8, 일 측면에서, 약 pH 6 내지 약 8의 pH 범위를 의미한다. 당해 기술 분야의 당업자라면, pH 측정기로 측정하였을 때 최소한으로 (예, 1/10 또는 1/100) 변동이 있을 수 있다는 것을 알 것이다. 이와 같이, 효모 세포를 배양하기 위해 중성 pH를 사용한다는 것은, 효모를 배양하는 대부분의 시간 동안 효모 세포가 중성 pH에서 배양된다는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 효모는 적어도 pH 5.5에서 유지되는 배지에서 배양된다 (즉, 배양 배지의 pH는 pH 5.5 미만으로 떨어지지 않게 함). 다른 측면에서, 효모는 약 6, 6.5, 7, 7.5 또는 8로 유지되는 pH에서 배양된다. 효모 배양시 중성 pH의 사용은 면역조절용 비히클로서 효모를 사용하는 데 있어 바람직한 생물학적 효과 몇가지를 촉진한다. 예를 들어, 중성 pH에서의 효모 배양은 세포 세대 시간 (generation time)에 부정적인 효과 (예, 더블링 시간의 서행)없이 효모의 양호한 증식을 가능하게 한다. 효모는 자신의 세포벽 유연성 (cell wall pliability)을 상실하지 않으면서 고 밀도로 계속적으로 증식할 수 있다. 중성 pH의 사용은 유연한 세포벽을 가진 효모의 생산 및/또는 모든 회수 밀도에서 세포벽 분해 효소 (예,

글루카나제)에 훨씬 민감한 효모를 생산할 수 있게 해준다. 이런 특성은, 유연한 세포벽을 가진 효모가, 더 산성인 조건에서 배양된 효모와 비교해, 예를 들어, 효모를 식균한 항원 제시 세포에 의한 사이토카인 (예, TH1-타입 사이토카인, 비-제한적인 예로, IFN- γ , 인터루킨-12 (IL-12) 및 IL-2 뿐만 아니라 전염증성 사이토카인, 예를 들어 IL-6)의 분비를 촉진함으로써 여러가지 또는 개선된 면역 반응을 유도할 수 있기 때문에, 바람직하다. 또한, 세포벽에 위치한 항원에 대한 높은 접근성도 이러한 배양 방법에 의해 부여된다. 다른 측면에서, 일부 항원에 대한 중성 pH의 사용은, 항원-발현 효모를 보다 낮은 pH (예, pH 5)에서 배지 중에 배양하는 경우에는 가능하지 않는, 다이티오프레이톨 (DTT) 처리에 의한 이황화 결합된 항원의 해리를 가능하게 한다.

[0101] 본 발명의 일 구현예에서, (이종의 항원 또는 기타 단백질을 발현하거나 또는 발현하지 않는) 온전한 효모는 효모 세포벽 조제물, 효모막 입자 또는 효모 분획 (즉, 온전하지 않은)을 생산하는 방식으로 분쇄 또는 가공될 수 있으며, 일부 구현예에서, 효모 분획은 면역 반응을 강화하기 위해 본 발명의 변형된 브라큐리 항원을 (예, 단백질 서브유닛으로서 또는 여러가지 비히클내에 포함된) 포함하는 다른 조성물과 함께 제공되거나 또는 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 효소 처리, 화학적 처리 또는 물리적 (예, 기계적 전단 또는 초음파 처리)을 이용해 보강제로서 사용되는 입자로 효모를 분쇄할 수 있다.

[0102] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명에 사용가능한 효모 비히클은 사멸 또는 불활성화된 효모 비히클을 포함한다. 효모의 사멸 또는 불활성화는 당해 기술 분야에 공지된 적절한 다양한 방법들 중 임의의 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 효모의 열에 의한 불활성화는 표준적인 효모 불활성화 방법으로, 당해 기술 분야의 당업자라면 당해 기술 분야에 공지된 표준 방법에 의해 필요에 따라 타겟 항원의 구조적 변화를 모니터링할 수 있다. 다른 예로, 효모를 불활성화하는 다른 방법, 예를 들어 화학적, 전기적, 방사성 또는 UV 방법이 사용될 수 있다. 예로, Methods of Enzymology, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990) 등의 표준적인 효모 배양 문헌에 기술된 방법을 참조한다. 사용되는 임의의 불활성화 전략은 표적 항원의 2차, 3차 또는 4차 구조를 고려하여야 하며, 이의 면역원성을 최적화하기 위해 상기한 구조를 보존하여야 한다.

[0103] 효모 비히클은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 많은 기법들을 이용하여 본 발명의 효모-기반의 면역치료 조성물 또는 산물로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 효모 비히클은 동결건조에 의해 건조될 수 있다. 효모 비히클을 포함하는 제형은, 또한, 베이킹 또는 양조 작업에 사용되는 효모에 행해지는 것과 같이, 효모를 케이크 또는 타블렛으로 패킹함으로써 제조될 수 있다. 또한, 효모 비히클은 숙주 또는 숙주 세포에 허용되는 등장성 완충액과 같은 약제학적으로 허용가능한 부형제와 혼합될 수 있다. 그러한 부형제의 예로는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 헵크 용액 및 기타 생리학적으로 밸런싱된 수성 염 용액 (physiologically balanced salt solution)들을 포함한다. 비-휘발성 오일 (fixed oil), 참깨 오일, 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드와 같은 비-수성 비히클도 또한 사용될 수 있다. 기타 유용한 제형은 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 소르비톨, 글리세롤 또는 텍스트란과 같은, 점성-강화제를 함유한 현탁액을 포함한다. 부형제는 또한 등장성 및 화학적 안정성을 강화하는 물질과 같은, 첨가제를 소량 함유할 수 있다. 완충액의 예는 인산 완충액, 중탄산 완충액, Tris 완충액을 포함하며, 보존제의 예로는 티메로살, m- 또는 o-크레졸, 포르말린 및 벤질 알코올을 포함한다. 표준 제형은 액체 주사제, 또는 주사용 현탁액 또는 용액으로서 적합한 액체 중에 취해질 수 있는 고체일 수 있다. 따라서, 비-액체 제형의 경우, 부형제는 예를 들어 텍스트로스, 인간 혈청 알부민 및/또는 보존제를 포함할 수 있으며, 여기에 투여 전 멸균수 또는 식염수가 첨가된다.

[0104] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 생물학적 반응 변형제 (biological response modifier) 화합물로도 지칭될 수 있는 부가적 물질, 또는 그러한 물질/변형제를 제조하는 능력을 포함할 수 있다. 예를 들어, 효모 비히클은 하나 이상의 항원 및 하나 이상의 물질/생물학적 반응 변형제 화합물로 형질감염되거나 또는 이를 로딩 (loading)할 수 있으며, 또는 본 발명의 조성물은 하나 이상의 물질/생물학적 반응 변형제와 함께 투여될 수 있다. 생물학적 반응 변형제로는 보강제 및 면역조절 화합물로도 지칭될 수 있는 면역 반응을 조절할 수 있는 기타 화합물, 뿐만 아니라 효모-기반의 면역치료제와 같이, 다른 화합물 또는 물질의 생물학적 활성을 변형시키는 화합물 등이 있으며, 이러한 생물학적 활성은 면역계의 작용으로 한정되는 것은 아니다. 특정 면역조절 화합물은 보호성 면역 반응을 자극할 수 있으며, 그외의 것은 유해한 면역 반응을 억제할 수 있으며, 면역조절제가 소정의 효모-기반의 면역치료제와 함께 사용가능한지의 여부는 적어도 부분적으로 치료 또는 예방할 질병 상태 또는 병태, 및/또는 치료할 개체에 따라 결정될 수 있다. 특정 생물학적 반응 변형제는 세포-매개 면역 반응을 우선적으로 강화하는 반면, 기타 물질들은 체액성 면역 반응을 우선적으로 강화한다 (즉, 체액성 면역과 비교해 증가된 세포-매개 수준으로 면역 반응을 자극시킬 수 있거나, 그 반대일 수도 있음). 특정 생물학적 반응 변형제는 효모-기반의 면역치료제의 생물학적 특성과 공통되는 하나 이상의 특성을 가지거나, 또는 효모-기반의 면역치료제의 생물학적 특성을 강화 또는 보완한다. 면역 반응의 자극 또는 억제를 측정하고, 세포-매개 면역 반

응을 체액성 면역 반응과 구분하고, 한가지 유형의 세포-매개 반응을 다른 것과 구분 (예를 들어, TH17 반응 대 TH1 반응)하기 위한, 다수의 기법들이 당해 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0105]

본 발명에 사용가능한 물질/생물 반응 변형제로는 비-제한적으로, 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 지질 유도체, 펩타이드, 단백질, 다당류, 소분자 약물, 항체 및 이의 항원 결합 단편 (비-제한적인 예로, 항-사이토카인, 항-사이토카인 수용체 항체, 항-케모카인 항체), 비타민, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 결합 모이어티, 앵타머 및 증식 모듈레이터 등이 있다. 일부 적합한 물질로는, 비-제한적으로, 하기를 포함한다: IL-1 또는 IL-1의 작용제 또는 IL-1R의 작용제, anti-IL-1 또는 기타 IL-1 길항제; IL-6 또는 IL-6의 작용제 또는 IL-6R의 작용제, anti-IL-6 또는 기타 IL-6 길항제; IL-12 또는 IL-12의 작용제 또는 IL-12R의 작용제, anti-IL-12 또는 기타 IL-12 길항제; IL-17 또는 IL-17의 작용제 또는 IL-17R의 작용제, anti-IL-17 또는 기타 IL-17 길항제; IL-21 또는 IL-21의 작용제 또는 IL-21R의 작용제, anti-IL-21 또는 기타 IL-21 길항제; IL-22 또는 IL-22의 작용제 또는 IL-22R의 작용제, anti-IL-22 또는 기타 IL-22 길항제; IL-23 또는 IL-23의 작용제 또는 IL-23R의 작용제, anti-IL-23 또는 기타 IL-23 길항제; IL-25 또는 IL-25의 작용제 또는 IL-25R의 작용제, anti-IL-25 또는 기타 IL-25 길항제; IL-27 또는 IL-27의 작용제 또는 IL-27R의 작용제, anti-IL-27 또는 기타 IL-27 길항제; 1형 인터페론 (IFN- α 등) 또는 1형 인터페론 또는 이의 수용체의 작용제 또는 길항제; 2형 인터페론 (IFN- γ 등) 또는 2형 인터페론 또는 이의 수용체의 작용제 또는 길항제; anti-CD40, CD40L, 림프구-활성화 유전자 3 (LAG3) 단백질 및/또는 IMP321 (LAG3의 가용성 형태로부터 유래되는 T-세포 면역자극성 인자), anti-CTLA-4 항체 (예, 아네르기 T 세포를 방출하기 위해); T 세포 공동-자극인자 (예, anti-CD137, anti-CD28, anti-CD40); 알렘투주맵 (alemtuzumab) (예, CamPath®), 데니루킨 디프티톡스 (Denileukin diftitox) (예, ONTAK®); anti-CD4; anti-CD25; 면역 체크포인트 저해제 (예, 자가-허용성 (self-tolerance)을 유지하고 생리 면역 반응의 기간 및 정도를 조절하는 면역 시스템의 저해 경로인 "면역 체크포인트"의 저해제, 예를 들어, 면역 체크포인트 저해제, 비-제한적인 예: anti-CTLA-4 항체, 예컨대 이필리무맵 (ipilimumab) (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) 또는 트레멜리무맵 (tremelimumab) (MedImmune/AstraZeneca, Wilmington, DE), 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1), 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1 리간드 (PD-L1), 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 2 리간드 (PD-L2, 예, AMP-224로 공지된 PD-L2 융합 단백질 (Amplimmune, Gaithersburg, MD/GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA)), anti-PD-1 항체 (예, 니블루맵 (nivolumab) (Bristol-Myers Squibb), 펄브롤리주맵 (pembrolizumab) (Merck, Whitehouse Station, NJ), 또는 피딜리주맵 (pidilizumab) (CureTech, Yavne, Israel)), anti-PD-L1 항체 (예, MPDL3280A (Genentech, South San Francisco, CA), MEDI4736 (MedImmune/AstraZeneca), BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb), MSB0010718C (EMD Serono, Rockland, MD)), 또는 anti-PD-L2 항체); 인돌아민 2,3-다이옥시게나제 (IDO) 저해제 (예, INCB24360); FOXP3 차단제 (예, CD4+/CD25+ T 조절성 세포의 활성을 없애거나/사멸하기 위해); Flt3 리간드, 이미퀴모드 (imiquimod) (Aldara™), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF); 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 사르그라마스팀 (Sargramostim) (Leukine®); 호르몬, 비-제한적인 예로, 프로락틴 및 성장 호르몬; Toll-유사 수용체 (TLR) 작용제, 비-제한적인 예로, TLR-2 작용제, TLR-4 작용제, TLR-7 작용제 및 TLR-9 작용제; TLR 길항제, 비-제한적인 예로, TLR-2 길항제, TLR-4 길항제, TLR-7 길항제 및 TLR-9 길항제; 항-염증제 및 면역조절제, 비-제한적인 예로, COX-2 저해제 (예, 셀레코릭스 (celecoxib), NSAIDS), 글루코코르티코이드, 스타틴, 탈리도미드 및 이들의 유사체, 예를 들어, IMiD™ (탈리도미드의 구조 및 기능성 유사체 (예, REVLIMID® (lenalidomide), ACTIMID® (pomalidomide))); 전-염증성 물질, 예를 들어, 진균성 구성 성분, 박테리아성 구성 성분 또는 임의의 전-염증성 사이토카인 또는 케모카인; 면역치료학적 백신, 비-제한적인 예로, 바이러스 백신, 박테리아 백신 또는 항체 백신; 및 임의의 기타 면역조절제, 면역증강제 (immunopotentiator), 항-염증제, 전-염증제, 및 항원-제시 세포 또는 TH17, TH1 및/또는 Treg 세포의 생존을 조절하거나, 활성화 상태를 조절하거나 및/또는 수를 조절하는 임의의 물질. 이들 물질들의 임의 조합물은 본 발명에 포함되며, 효모-기반의 면역치료와 함께 프로토콜로 투여 또는 함께 조합되는 임의의 이러한 물질들은 본 발명에 포함되는 조성물이다. 이들 물질은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 이들 물질은 단독으로 또는 본원에 기술된 다른 물질과 조합하여 사용될 수 있다.

[0106]

본 발명의 조성물은 암을 치료 또는 예방하는데 유용한 임의의 다른 물질 또는 조성물 또는 프로토콜 또는 암의 임의 증상을 치료 또는 완화하는 임의 화합물을 추가로 포함하거나, 또는 이와 함께 (동시에, 연속적으로 또는 간헐적으로) 투여될 수 있으며, 암은 특히 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련있는 암이다. 또한, 본 발명의 조성물은, 예방학적 및/또는 치료학적 면역요법 등의 또 다른 면역치료학적 조성물과 함께 사용될 수 있다. 실제, 본 발명의 조성물은 암에서 브라큐리 발현을 저해함으로써 (그로 인해 항-증식 효과를 저해함) 전이암에서 발생할 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 저해 또는 낮추기 위해 사용될 수 있거나, 또는 본 발명의 조성

물은 개체에서 화학요법 또는 방사선 치료의 성능을 강화할 수 있다. 암 치료에 사용가능한 부가적인 물질, 조성물 또는 프로토콜 (예, 치료학적 프로토콜)로는, 비-제한적으로, 화학요법, 종양의 외과적 절제, 방사선 치료, 동종이계 또는 자가 줄기 세포 이식 및/또는 표적 암 요법 (예, 소형 분자 약물, 생물제제 또는 종양 증식 및 진행에 참여하는 분자, 비-제한적인 예로, 선택적인 에스트로겐 수용체 모듈레이터 (SERM), 아로마타제 저해제, 티로신 키나제 저해제, 세린/트레오닌 키나제 저해제, 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 저해제, 레티노이드 수용체 활성화인자, 세포자살 자극인자, 혈관신생 저해제, 폴리 (ADP-리보스) 중합효소 (PARP) 저해제, 또는 면역자극제를 특이적으로 표적으로 하는 단일클론 항체 요법) 등이 있다. 이들 부가적인 치료학적 물질 및/또는 치료학적 프로토콜 중 임의의 것은 본 발명의 면역요법 조성물 이전에, 동시에, 교대로 또는 이후에, 또는 서로 다른 시점에 투여될 수 있다. 예를 들어, 개체에 화학요법 또는 표적 암 요법과 병용하여 사용되는 경우, 면역요법 조성물의 효능을 극대화하기 위해, 화학요법 또는 표적 암 요법의 투여 사이의 "휴지기 (holiday)" 동안에 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 종양의 외과적 절제는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여를 대부분 선행할 수 있지만, 부가적인 또는 일차 수술은 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 동안에 또는 투여한 이후에 이루어질 수도 있다.

[0107] 본 발명은 또한 본원에 기술된 임의의 조성물을 포함하거나 또는 본원에 기술된 조성물의 임의의 개개 성분들을 포함하는 키트를 포함한다. 키트는 본 발명의 임의의 조성물을 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련된 암을 예방 또는 치료하기 위해 사용하기 위한 추가적인 시약 및 기술된 설명서 또는 지침서를 포함할 수 있다.

[0108] 본 발명의 조성물의 투여 방법 또는 용도

[0109] 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은, 암 발병 예방, 암 진행 중단 또는 암 완화 또는 소거 등의, 브라큐리 발현 또는 과발현이 특징적인 또는 이와 관련있는 암을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위해 고안된 것이다. 보다 상세하게는, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 개체에서 브라큐리-발현성 종양의 발병을 예방, 저해 또는 지연하거나, 및/또는 다른 조직으로의 종양 이동 및/또는 종양 침입 (전이)을 예방, 저해 또는 지연하거나, 또는 암의 진행을 저해하기 위해 사용될 수 있다. 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 또한 개체에서 종양 크기 감소; 개체에서 종양 증식 저해; 개체의 생존율 증가; 다른 조직으로의 종양 이동 및/또는 종양 침입 (전이암)을 예방, 저해, 퇴행 또는 지연; 및/또는 개체에서 암 진행을 예방, 저해, 퇴행 또는 지연함으로써와 같이, 암의 한가지 이상의 증상을 완화하기 위해 사용될 수 있다. 효모-브라큐리 면역요법은 또한 암에서 브라큐리 발현을 저해함으로써 전이암에서 발생할 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 저해, 감소 또는 없애기 위해 사용될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 개체에서 화학요법 또는 방사선 치료의 성능을 강화할 수 있다.

[0110] 본 발명의 조성물 및 방법과 관련있는 암은 브라큐리를 발현하거나 또는 발현할 수 있는 임의의 암, 또는 브라큐리를 발현하거나 또는 발현할 수 있는 암의 인접한 암이며, 비-제한적으로, 유방암, 골암 (비-제한적인 예로, 척색종), 소장암, 위암, 신장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 고환암, 폐암, 대장암, 췌장암 또는 전립선암 등이 있으며, 전이성 암 및 말기 암을 포함한다. 아울러, 브라큐리는 만성 림프성 백혈병 (CLL), 엡스타인-바 바이러스 형질전환된 B 세포, 버킷 림프종, 호지킨 림프종 뿐만 아니라 이들의 전이 암 등의 B 세포 기원의 종양들에서 발현된다.

[0111] 이에, 본 발명의 일 구현예는 암, 특히 브라큐리-발현성 암의 치료 방법에 관한 것이다. 이 방법은 본원에 기술된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 브라큐리-발현성 암을 가진 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 (a) 효모 비히클; 및 (b) 본 발명의 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 조성물을 포함한다. 일 측면에서, 상기한 방법은 환자에서 종양의 크기를 감소시킨다. 일 측면에서, 상기 방법은 환자의 생존율을 증가시킨다. 일 측면에서, 상기 방법은 개체에서 종양 증식을 저해한다. 일 측면에서, 상기 방법은 종양의 전이성 진행을 예방, 중단 또는 퇴행시킨다.

[0112] 브라큐리 발현은 암이 높은 등급으로 진전 또는 진행 (예, 구체적인 암에 따라 1기 → 2기 → 3기 → 4기)됨에 따라 더 강해지는 것으로 보이며, 이는 전이성 진행과 관련있기 때문에, 본 발명의 일 구현예는 브라큐리-발현성 암의 개시를 예방 또는 지연하거나, 또는 전-전이성 또는 전-악성 단계에서 암을 중단시키거나, 또는 암의 진행을 예방 또는 지연 (암 안정화)하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 브라큐리-발현성 암 세포가 검출되지 않는 개체에게, (a) 효모 비히클; 및 (b) 본 발명의 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 조성물을 포함하는 본원의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 구현예에 대한 일 측면에서, 상기한 암은 암에 걸린 개체들 중 적어도 서브세트에서 암의 일부 단계에서 브라큐리를 발현하는 것으로 알려져 있거나 또는 브라큐리를 발현하는 경향이 있는 것으로 간주되는 암이다. 본 구현

예의 일 측면에서, 개체는 이미 암에 걸렸지만, 조성물을 최초 투여하는 시기에는 암에서 브라큐리가 검출되지 않는데, 이는 이 개체가 브라큐리 발현이 아직 나타나지 않거나 또는 브라큐리 발현이 임의의 상황에서 아직 검출되지 않는, 초기 단계 암을 가질 수 있다는 것을 의미한다 (즉, 브라큐리는 종양에서 낮은 수준으로 또는 적은 수에서 발현되거나 또는 발현되지 않을 수 있지만, 아직까지는 표준 검출 방법을 이용해 쉽게 검출되지 않음). 일부 사례에서, 이런 암 타입은 전이성 진행율이 높은 것으로 알려져 있을 수 있다. 이 측면에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 투여는 환자의 암에서 브라큐리-발현성 종양 세포의 발생을 예방, 지연 또는 저해하며, 따라서, 브라큐리 발현을 수반하는 전이성 진행을 예방, 중단, 지연 또는 저해한다. 다른 측면에서, 개체는 조성물이 투여되는 시기에는 암에 걸리지 않은 상태이다. 이러한 개체는 아마 가족력 또는 유전자 마커로 인해, 또는 개체가 전암성 세포 또는 병변의 신호를 나타내었거나 또는 전암성 (전악성) 세포 또는 병변을 가지고 있어, 암 발병 "소인"이 있거나 가능성이 있을 수 있다.

[0113] 본 발명의 일 구현예는 암에 걸린 개체에서 종양 이동을 저해하거나 및/또는 암의 전이성 진행을 감소, 정지 (중단), 퇴행 또는 예방하거나, 또는 암에서 전이성 현상의 발생을 퇴행시키는 방법에 관한 것이다. 전술한 바와 같이, 브라큐리는 인간 종양 세포에서 상피-간엽 이행 (EMT)을 촉진하여, 종양 세포에 간엽 표현형 뿐만 아니라 이동성 및 침습성 능력을 부여하며, 동시에 종양 세포 주기 진행을 약화시킨다. 따라서, 전이성 진행에 브라큐리의 참여로, 브라큐리는 전-전이성 단계에서 암을 중단시키는 등의, 전이성 과정을 예방 또는 저해하기 위한 이상적인 표적이 된다. 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 사용은, 화학요법 및 방사선 등의 전통적인 치료로부터 암이 탈출한 경우에, 암의 진행을 중단하는 등의, 전이암을 예방 또는 치료하기에 효과적일 수 있다. 본 방법은 암을 가진 개체에게, 비-제한적인 예로 (a) 효모 비히클; 및 (b) 본 발명의 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 비롯하여, 본원에 기술된 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0114] 일 측면에서, 브라큐리는 조성물이 최초 투여되는 시점에는 개체의 암에서 검출되지 않는다. 일반적으로, 브라큐리가 개체의 암에서 검출되지 않을 때, 개체는 브라큐리 발현이 아직 나타나지 않는 초기 단계 암 (예 1기 또는 2기) 또는 브라큐리 발현이 임의의 상황에서 아직까지 검출가능하지 않은 초기 단계 암 (즉, 브라큐리는 종양 세포에서 낮은 수준으로 또는 적은 수에서 발현되거나 또는 발현되지 않을 수 있지만, 아직까지 표준 검출 방법으로는 쉽게 검출가능하지 않음)을 가질 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에서, 브라큐리-발현성 종양 세포의 발생은 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 이용함으로써 예방, 지연 또는 저해된다. 그 결과, 전이성 진행으로 진행되는 종양 이동 및/또는 기타 전이성 과정이 예방, 지연 또는 저해되거나, 및/또는 종양 진행의 전반적인 중단이 개체에서 발생한다.

[0115] 다른 측면에서, 브라큐리 발현은 조성물이 최초 투여되는 시점에 개체의 암에서 검출되거나 또는 검출될 수 있다. 개체는 본 발명의 이런 측면에서 1기, 2기, 3기 또는 4기 암을 가질 수 있다. 이런 측면에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 사용은 브라큐리를 발현하는 종양의 증식을 저하, 소거 또는 서행 또는 중단시켜, 개체에서 종양 크기 (tumor burden) 저하, 브라큐리-발현성 종양 증식의 저해 및/또는 개체의 생존율 증가를 달성할 수 있다. 개체는 전이성 과정의 중단, 서행 또는 퇴행, 환자의 생존 및 건강 향상을 경험할 수 있으며, 아울러 다른 치료학적 프로토콜을 이용한 암 치료가 가능해질 수도 있다.

[0116] 실제, 전이암은, 암이 치료로부터 "탈출하거나" 또는 단순히 요법에 의해 효과가 낮아 진행되는, 화학요법, 방사선 또는 표적 암 치료 등의 암 치료에 대한 내성 또는 증가된 내성이 조합될 수 있다. 이에, 상기한 치료의 효능을 개선 또는 강화하기 위해 이러한 치료에 대한 내성을 줄이거나 또는 없애고, 환자의 건강과 생존을 향상시킬 필요가 있다. 그에 따라, 본 발명의 일 구현예는 암 환자에서 화학요법-내성, 표적 암 요법-내성 또는 방사선-내성을 줄이거나 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 암에 걸렸으며 암에 대한 화학요법 및/또는 방사선 치료를 받고 있는 개체에게, (a) 효모 비히클; 및 (b) 본 발명의 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 조성물일 수 있는, 본원에 기술된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 또한 비-제한적인 예로, 표적 암 요법 등의 암에 대한 다른 치료학적 치료와 관련된 내성을 치료하는데 이용될 수도 있다.

[0117] 이런 구현예에 대한 일 측면에서, 브라큐리는 조성물이 최초 투여되는 시기에 개체의 암에서 검출되지 않는다. 이런 측면에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 투여는 암에서 브라큐리-발현성 종양 세포의 발생을 저해함으로써 화학요법 또는 방사선 치료에 대한 내성 개시를 예방 또는 저해한다. 다른 측면에서, 브라큐리 발현은 조성물이 최초 투여되는 시기에 개체의 암에서 검출된다. 이런 측면에서, 개체는 화학요법 또는 방사선에 내성을 이미 경험하거나 또는 경험하지 않을 수 있다. 이들 경우에, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 투여는, 환자에서 브라큐리-발현성 종양 세포를 감소 또는 제거함으로써, 화학요법 또는 방사선 치료에 대한

내성을 예방 또는 저해하거나, 또는 화학요법 또는 방사선 치료의 개체 치유력을 강화한다.

[0118] 본 발명의 또 다른 구현에는 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 척색종 개체 (환자)에게 투여함으로써 척색종을 치료하는 방법에 관한 것이다. 척색종은 브라큐리 발현을 특징으로 하며, 실제 브라큐리는 이 암을 식별하는 바이오마커이며, 즉, 브라큐리 발현은 모든 척색종에서 공통적이고 특이적인 바이오마커이다. 따라서, 본 발명의 이러한 방법은 척색종에 걸린 개체 또는 척색종 발병 위험성이 있지만 아직까지 브라큐리-발현성 암 세포가 검출되지 않은 개체에게 비-제한적인 예로 (a) 효모 비히클; 및 (b) 본 발명의 하나 이상의 변형된 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는, 본원에 기술된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 면역치료학적 조성물로 치료할 개체는 절제불가능한 병변 (즉, 외과적으로 완전히 제거할 수 없음) 또는 절제가능한 병변이 1차 발생한 척색종 개체; 1차 재발 여부에 상관없이, 절제불가하며 국소 재발된 병변 (즉, 국소 재발은 제거된 오리지널 또는 1차 병변과 동일한 장소 (또는 그 근처) 주변에 다시 발생한 병변임)을 가진 개체; 후술한 올리고-전이성 질환을 가진 개체; 또는 후술한 전이성 질환을 가진 개체일 수 있다. 일 측면에서, 개체는 앞서 방사선 치료, 수술 및/또는 표적 약물 요법을 받은 적이 있거나, 또는 없을 수 있다. 다른 측면에서, 개체는 이미 방사선 치료받은 암 병변을 가진다. 일 측면에서, 개체는 기존에 방사선 치료받지 않은 암 병변을 가진다. 일 측면에서, 개체는 효모-브라큐리 면역요법을 투여받으며, 부가적으로 암 병변은 효모-브라큐리 면역요법의 투여 전, 투여 중 및/또는 투여 후에 방사선 치료된다.

[0119] 전술한 임의의 방법들에 대한 일 측면에서, 개체는, 본 발명의 효모-브라큐리 조성물을 투여받는 것 외에도, 부가적으로 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 투여하기 전에, 연속적으로, 동시에 및/또는 이후에 투여 또는 수행되는, 암을 치료하기 위한 하나 이상의 치료학적 화합물 또는 치료 프로토콜로 치료받게 된다. 예를 들어, 본원에 기술된 본 발명의 방법에 대한 임의의 구현예에서, 일 측면에서, 개체가 암에 걸린 경우 (종양 세포에서 브라큐리 발현이 검출가능한 상태인지와는 무관하게), 이 개체는 또 다른 암 요법으로 치료 중이거나 또는 치료를 받은 적이 있다. 이러한 요법으로는, 비-제한적인 예로, 화학요법 또는 표적 암 요법 또는 약물 요법 (예, 티로신 키나제 저해제, 비-제한적인 예로, 이마티닙 (imatinib), 서니티닙 (sunitinib), 세투시맙 (cetuximab), 게피티닙 (gefitinib), 에를로티닙 (erlotinib), 닐로티닙 (nilotinib), 다사티닙 (dasatinib), 라파티닙 (lapatinib) 및 에베롤리무스 (everolimus); STAT3 저해제, 안트라사이클린 (anthracycline); 시스플라틴 (cisplatin); 알킬화제; 캄프토테신 유사체 (camptothecin analogues)), 방사선 치료 (비-제한적인 예로, 독립적인 방사선 치료 (stand alone radiation therapy) 및 보조적 방사선 치료 (adjuvant radiation therapy), 특히 하드론 방사선 치료), 종양의 외과적 절제, 줄기 세포 이식, 사이토카인 요법, 입양 T 세포 전달 및/또는 제2 면역치료학적 조성물의 투여 등의, 본원에 이미 언급된 임의의 치료학적 화합물 또는 물질의 사용 또는 임의의 치료 프로토콜을 포함할 수 있다. 제2 면역치료학적 조성물을 투여하는 경우, 이 조성물은, 비-제한적으로, 부가적인 효모-기반의 면역치료, 재조합 바이러스-기반의 면역치료 (바이러스 벡터), 사이토카인 요법, 면역자극 요법 (면역자극 특성을 가진 화학요법이 포함됨), DNA 백신 및 그외 면역요법 조성물을 포함할 수 있다.

[0120] 임의의 이들 부가적인 물질 또는 요법은 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 1차 투여 전에 또는 1차 투여 이후에 투여되거나 또는 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 한가지 이상의 요법은 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 투여와 교차하는 방식으로, 예를 들어 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 화학요법 또는 기타 요법의 1회 이상의 연속 투여 사이에 지정된 간격으로 투여하는 프로토콜로 투여 또는 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 부가적인 요법을 개시하기 전에 일정 기간 동안 1회 이상의 투여로 투여된다. 다시 말해, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 일정 기간 동안 단일요법으로서 투여된 후, 효모-브라큐리 면역치료의 새로운 투여와 동시에, 또는 효모-브라큐리 면역요법과 교차하는 방식으로 부가적인 요법이 첨가된다. 다른 예로 또는 추가적으로, 다른 요법이 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여를 개시하기 전에 일정 기간 동안 수행될 수 있으며, 컨셉들이 조합될 수 있다 (예, 종양을 외과적으로 적출한 다음 수 주간 효모-브라큐리 면역치료를 이용한 단일요법을 수행하고, 이후 수개월 또는 수주간 화학요법 또는 표적 요법과 효모-브라큐리 면역요법을 교대로 행하며, 선택적으로 이후 효모-브라큐리 면역요법 또는 다른 요법을 단일 요법으로 행하거나 또는 순차적, 동시 또는 교대로 행하는 방식으로 요법의 새로운 조합 프로토콜이 행해짐). 효모-브라큐리 면역요법을 이용해 암을 치료하는 다양한 프로토콜들이 본 발명에 포함되며, 이들 예들은 다양한 가능한 프로토콜의 비-제한적인 예로서 간주되어야 한다.

[0121] 일 측면에서, 제2 면역치료학적 조성물은 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제2 암 항원을 포함한다. 예를 들어, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물과 조합하여 사용가능한 제2 면역치료학적 조성물은 다른 암 항원을 포함하는 효모-면역치료학적 조성물이다. 이들 암 항원으로는, 비-제한적으로, 암태아성 항원 (CEA, carcinoembryonic

antigen), 점 돌연변이된 Ras 발암단백질, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, 정상 및 점 돌연변이된 p53 발암단백질, PSMA, 티로시나제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (adenomatous polyposis coli) (APC), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로겐 수용체 (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, 메조텔린 (Mesothelin), NGEF, 이들 항원의 변이체, 이들 항원의 스플라이스 변이체 (splice variant) 및 이들 항원의 에피토프 작용제 뿐만 아니라 이들 항원의 조합물 및/또는 이들의 면역원성 도메인, 이들의 변형체, 이들의 변이체 및/또는 이들의 에피토프 작용제 등을 포함할 수 있다.

[0122] 본원에서, 암을 "치료" 또는 이의 다른 표현 (예를 들어, "암에 처리되는" 등)은, 일반적으로, 일단 암이 발생 하였으면 (예를 들어, 개체 내에 암이 진단 또는 감지되었으면), 개체에서 종양 크기 감소; 개체에서 종양 증식 또는 종양 증식 속도 (종양 증식 카이네틱스)의 저해, 감소, 경감 또는 소거; 전체적인 생존 및/또는 비-진행성 생존을 포함할 수 있는, 개체의 생존 증가 또는 연장; 종양 반응을 개선 (즉, 후술한 바와 같이 RECIST 및/또는 Choi로 측정); 종양 재발 지연, 저해, 중단 또는 예방; 다른 조직으로의 종양 이동 및/또는 종양 침습 발생 (전이암)의 예방, 저해, 퇴행 또는 지연; 개체에서 암의 진행 중단, 예방, 저해, 퇴행 또는 지연; 암에 의해 발현된 종양 항원(들)에 대한 장기 기억면역 반응 개선; 방사선 치료, 화학요법 및/또는 표적 약물 요법에 대한 병변의 민감성 증가; 및/또는 개체의 전반적인 건강 개선 등의, (비-처리시와 비교해) 처리의 적어도 한가지 이상의 치료학적 목적으로, 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 의미한다.

[0123] 암으로부터 "예방" 또는 "보호", 또는 이의 다른 표현 (예를 들어, "암의 예방" 등)은, 암이 발생하기 전에, 또는 특정 단계 암 또는 암에서 종양 항원의 발현이 일어나기 전에 (예를 들어, 브라큐리 발현이 암에서 검출되기 전에), 암 개시 또는 발병의 예방 또는 지연을 포함하는, 또는 그 처리 후 암이 발생한다면, 비-처리시와 비교해 개체에서 성과 개선, 비-제한적인 예로, 개체에서 종양 크기 감소; 개체에서 종양 증식 또는 종양 증식을 저해 (감소, 저하, 소거); 전체적인 생존 및/또는 비-진행성 생존을 포함할 수 있는, 개체의 생존 증가 (연장); 종양 반응을 개선 (즉, 후술한 바와 같이 RECIST 및/또는 Choi로 측정); 종양 재발 지연, 저해, 중단 또는 예방; 다른 조직으로의 종양 이동 및/또는 종양 침습 발생 (전이암)의 예방, 저해, 퇴행 또는 지연; 개체에서 암의 진행 중단, 예방, 저해, 퇴행 또는 지연; 암에 의해 발현된 종양 항원에 대한 장기 기억면역 반응 개선; 방사선 치료, 화학요법 및/또는 표적 약물 요법에 대한 종양의 민감성 증가; 및/또는 개체의 전반적인 건강 개선 등의, (비-처리시와 비교해) 처리의 한가지 이상의 목적으로, 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 의미한다.

[0124] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 효모-기반의 면역요법 조성물을 이용한 치료는 즉, RECIST 또는 Choi 척도에 따라 측정시, 개체에서 반응을 개선한다. "RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor)"는 고형 종양의 반응 평가 척도로서, 암 환자에서 종양이 개선, 안정 또는 진행된 상태를 정의하는 공개된 가이드라인 세트이다. RECIST-의거한 반응은 비-침습적인 이미징 평가에 의해 측정되는 표적 병변의 크기 변화에 따라 결정된다. RECIST 척도는 EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), 미국 국립암 센터 (NCI) 및 캐나다 임상 실험 그룹의 국립 암 센터 등의 국제 협력에 의해 2000년 2월에 최초로 발표되었으며 (Therasse et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92:205-216), Eisenhauer et al., *Eur.J. Cancer*, 2009, 45:228-247에 기술된 바와 같이 2009년에 개정되었다. 상기 Eisenhauer 문헌에 기술된 바와 같이, "완전 반응" 또는 CR (Complete Response)은 현재 모든 표적 병변들이 소실되고 단축이 < 10 mm까지 축소된 임의의 (표적 또는 비-표적) 병리학적 림프절을 가지는 것으로 정의된다. "부분 반응" 또는 "PR"은 현재 베이스라인 직경 합을 기준으로 표적 병변의 직경들의 합이 30% 이상 감소된 것으로 정의된다. "안정 질환" 또는 "SD"는 실험 중에 직경의 최저 합을 기준으로, PR 상태까지의 충분한 퇴화도 아니고 PD 상태까지의 충분한 증가도 아닌 것으로 정의된다. "진행 질환" 또는 "PD"는 실험 중에 직경의 최저 합을 기준으로, 표적 병변의 직경들의 합이 적어도 20% 증가된 것으로서 정의된다. 아울러, 합은 또한 5 mm 이상의 절대 증가이어야 한다. 하나 이상의 새로운 병변의 출현 역시 진행으로 간주된다. 상기 Eisenhauer 문헌에 기술된 바와 같이, 추가적인 척도가 비-표적 병변에 적용된다.

[0125] "Choi" 척도는 Choi et al. (*J. Clin. Oncol.* 2007, 25(13):1753-1759)에 최초로 기술된 컴퓨터 단층촬영 반응 척도 (computed tomography response criteria) 세트를 의미하며, CT에 의해 측정되는 표적 병변의 크기 또는 밀도 변화를 평가한다. 또한, Choi 척도는 환자를 CR, PR, SD 및 PD 그룹으로 분류한다. CR은 모든 병변이 없어지고 새로운 병변이 없는 것으로 정의된다. PR은 CT에서 >10%의 종양 크기 감소 또는 > 15%의 종양 감쇠 (tumor attenuation) 감소로 정의되며, 새로운 병변이 없고 비-측정가능한 질환의 명백한 진행이 없는 것으로서 정의된다. SD는 CR, PR 또는 PD의 척도에 해당되지 않으며, 종양 진행으로 인한 증상 악화가 없는 것으로서 정의된다.

PD는 CT에서 종양 크기의 >10% 증가로서 정의되며, 종양 감쇠로 인해 CT에서 PR 척도에 해당되지 않거나, 및/또는 새로운 병변이 생긴 것이다.

[0126] 개체 또는 대상에 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 전달 (투여, 면역화)은 생체의 또는 생체내에서 수행될 수 있으며, 전형적으로 생체내로 수행된다. 생체의 투여는, 조절 단계의 일부를 환자의 외부에서 수행하는 것, 예를 들어, 본 발명의 조성물을 효모 비히클, 변형된 브라큐리 항원(들) 및 임의의 기타 항원, 물질 또는 조성물을 세포에 로딩하는 등의 상황에서 환자에서 취한 세포 집단 (수지상 세포)에 본 발명의 조성물을 투여하고 이 세포를 환자에게 다시 복귀시키는 것을 의미한다. 본 발명의 치료 조성물은 임의의 적절한 투여 방식을 통해 환자로 복귀시키거나 또는 환자에게 투여할 수 있다.

[0127] 조성물의 투여는 전신, 점막 및/또는 표적 부위 근처 (예, 종양 부위 근처)일 수 있다. 적절한 투여 경로는 예방 또는 치료할 암의 타입 및/또는 표적 세포 집단 또는 조직에 따라 당해 기술 분야의 당업자에게 자명할 것이다. 다양한 허용가능한 투여 방법으로는, 비-제한적으로, 정맥내 투여, 복막내 투여, 근육내 투여, 결절내 (intranodal) 투여, 관상내 (intracoronary) 투여, 동맥내 투여 (예, 경동맥내), 피하 투여, 경피 전달, 기관내 (intratracheal) 투여, 관절내 (intraventricular) 투여, 심실내 투여, 흡입 (예, 에어로졸), 두개강내, 척수내, 안내, 귀내, 비강내, 경구, 폐내 투여, 카테터 삽입 및 조직에의 직접 주입 등이 있다. 일 측면에서, 투여 경로는 정맥내, 복막내, 피하, 진피내, 결절내, 근육내, 경피, 흡입, 비강내, 경구, 안내, 관절내, 두개강내 및 척수내를 포함한다. 비경구 전달은 진피내, 근육내, 복막내, 늑막내, 폐내, 정맥내, 피하, 심방 카테터 및 정맥 카테터 경로를 포함할 수 있다. 귀내 전달은 점이제 (ear drop)를 포함할 수 있으며, 비강내 전달은 점비제 또는 비강내 주입을 포함할 수 있으며, 안내 전달은 점안제 (eye drop)를 포함할 수 있다. 에어로졸 (흡입) 전달은 또한 당해 기술 분야의 표준적인 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (예, Stribling et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281, 1992). 일 측면에서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 피하 투여된다. 일 측면에서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 종양 환경 (tumor milieu)으로 직접 투여된다. 일 측면에서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 척수강내로 투여된다.

[0128] 본 발명의 일 측면에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 주사, 예를 들어 피하 주사 용도로 제형화되며, 주사에 의해 투여된다. 일 측면에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 바이알에 든 현탁액 형태로 제공되며, 개체에 대한 적절한 취급, 투약 및 투여 설명서와 함께 제공된다. 일 측면에서, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 바이알에 든 동결 건조된 제형으로서, 개체에 대한 적절한 취급, 재현탁, 투약 및 투여 설명서와 함께 제공된다. 본 발명의 변형된 브라큐리 항원과 이 항원을 발현하는 효모의 후속적인 응집 표현형 감소가 갖는 한가지 이점은, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 투여하는데 있어, 조성물이 바이알에서 적절하게 현탁 또는 재현탁되고, 시린지에 주입하여 개체에 투여하는 동안에도 적절하게 현탁된 채 있도록 하기 위해, 의료 실무자 입장에서는 노력이 적게 든다는 것이다.

[0129] 일반적으로, 본 발명의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 적정 1회 투여량 (single dose)은, 적정 기간 동안 1회 이상 투여되는 경우, 한가지 이상의 종양 항원 또는 에피토프 (예, 브라큐리)에 대한 항원-특이적인 면역 반응을 유발하는데 효과적인 양으로 환자 신체의 소정의 세포 타입, 조직 또는 영역으로 효모 비히클 및 변형된 브라큐리 항원을 효과적으로 제공할 수 있는 투여량이다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명의 효모-기반의 조성물의 1회 투여량은 조성물이 투여되는 유기체의 체중 1 킬로그램 당 약 1×10^5 내지 약 5×10^7 의 효모 세포 당량 (yeast cell equivalent)이다. 일 측면에서, 본 발명의 효모 비히클의 1회 투여량은, 투여 당 (즉, 유기체 당) 약 0.1 효모 단위 (Y.U., 이는 효모 세포 1×10^6 개 또는 효모 세포 당량) 내지 약 100 Y.U. (세포 1×10^9 개), 예컨대, 세포 0.1×10^6 개 단위로 증가하는 상기한 범위내 임의 용량 (즉, 1.1×10^6 , 1.2×10^6 , 1.3×10^6 ...)이다. 일 구현예에서, 투여량은 1 Y.U. - 40 Y.U., 1 Y.U. - 50 Y.U., 1 Y.U. - 60 Y.U., 1 Y.U. - 70 Y.U., 또는 1 Y.U. - 80 Y.U.의 투여량이며, 일 측면에서, 10 Y.U. 내지 40 Y.U., 50 Y.U., 60 Y.U., 70 Y.U. 또는 80 Y.U.의 투여량이다. 일 구현예에서, 상기한 투여량은 개체의 여러 부위에 동일한 투약 기간 동안 투여된다. 예를 들어, 투여량 40 Y.U.은, 한번의 투약 기간 동안 개체의 4가지 부위에 각각 투여량 10 Y.U.를 주입함으로써 투여할 수 있거나, 투여량 20 Y.U.은, 동일한 투약 기간 동안, 개체의 4가지 부위에 각각 5 Y.U. 투여량씩 주입하거나 또는 개체의 2가지 부위에 각각 10 Y.U. 투여량씩 주입함으로써 투여할 수 있다. 본 발명은 1회 투여를 위해 개체의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10곳 이상의 여러 부위에 일정량 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 Y.U. 또는 그 이상)의 효모-기반의 면역치료 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 1 효모 단위 (Y.U.)는 1×10^7 효모 세포 또는 효모 세포 당량이다.

- [0130] 본 발명의 면역치료학적 조성물의 "부스터 (booster)" 또는 "부스트 (boost)"는, 예를 들어, 항원에 대한 면역 반응이 약해지거나 또는 특정 항원 또는 항원(들)에 대한 면역 반응을 제공하거나 기억 반응(memory response)을 유도하는 것이 필요한 경우에 투여된다. 부스터는, 치료 중인 개체의 상태와 투여시의 요법의 목표 (예, 예방적, 적극적 치료, 유지)에 따라, 최초 투여 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주 간격으로, 매달, 2달에 한번, 분기별로, 매년 또는 수년 간격으로 투여할 수 있다. 일 구현예에서, 투여 스케줄은, 효모-기반의 면역치료학적 조성물의 투여량들이 수주, 수개월 또는 수년의 기간 동안 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 횟수로 투여되는, 스케줄이다. 일 구현예에서, 투여량은, 매주 또는 2주 마다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 횟수로 투여되며, 이후 적색종의 원하는 예방적 또는 치료적 치료를 달성하기 위해 필요에 따라, 2주 마다 또는 매주 투여된다. 일 구현예에서, 투여량은, 2주 간격으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 횟수로 투여하며, 원하는 예방 또는 치료 결과가 달성될 때까지 추가적으로 매달 투여로 투여된다. 일 구현예에서, 투여량은, 매달 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 횟수로 투여되며, 이후 암에 대한 예방적 또는 치료적 치료를 달성하기 위해 필요에 따라, 추가적으로 매달 투여하거나 또는 여러가지 빈도(분기별)로 투여량 전달이 진행된다. 본원에 언급된 모든 투약 프로토콜들에서, 이후 추가적인 부스터가 필요에 따라 유지 또는 관해 요법과 유사한 또는 보다 긴 간격 (예, 수개월 또는 수년)으로 제공될 수 있다. 일 측면에서, 부스터는 장기간의 유지 요법을 위해 (즉, 주 치료 코스가 완료된 후, 질환 재발 방지 또는 지연의 도로 또는 질환 안정화를 유지하고자 하는 의도로) 투여된다.
- [0131] 본 발명의 방법에서, 조성물 및 치료학적 조성물은 임의의 척추동물 등의 임의의 동물, 특히 척추동물 강, 포유류에 속하는 임의 구성원, 비-제한적인 예로서, 영장류, 설치류, 가축 및 애완 동물에 투여될 수 있다. 가축은 소비되거나 유용한 생산물을 생산하는 동물 (예, 우 제품을 생산하는 양)을 포함한다. 치료 또는 예방할 포유류는 인간, 인간을 제외한 영장류, 개, 고양이, 마우스, 랫, 염소, 양, 소, 말 및 돼지를 포함한다.
- [0132] "개체"는 척추동물, 예컨대, 포유류, 비-제한적인 예로서 인간이다. 포유류는, 비-제한적인 예로서, 농장 동물, 스포츠 동물, 애완 동물, 영장류, 마우스 및 랫을 포함한다. 용어 "개체"는 용어 "동물", "대상" 또는 "환자"와 상호 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0133] 본 발명에 이용가능한 일반 기법
- [0134] 본 발명의 실시는, 달리 기재되지 않은 한, 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있는 분자생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 핵산 화학 및 면역학의 통상적인 기법들을 사용할 것이다. 이러한 기법들은, 예를 들, Methods of Enzymology, Vol. 194, Guthrie et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Biology and activities of yeasts, Skinner, et al., eds., Academic Press (1980); Methods in yeast genetics : a laboratory course manual, Rose et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology, Pringle et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); The Yeast Saccharomyces: Gene Expression, Jones et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, Broach et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook 및 Russel, 2001), (본원에서 "Sambrook"으로 공동으로 언급됨); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, including supplements through 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988), Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (jointly referred to herein as "Harlow and Lane"), Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, C. Klaassen, ed., 6th edition (2001), 및 Vaccines, S. Plotkin, W. Orenstein, and P. Offit, eds., Fifth Edition (2008) 등의 문헌에 충분히 설명되어 있다.
- [0135] 일반 정의
- [0136] "TARMOGEN[®]" (GlobeImmune, Inc., Louisville, Colorado)은 일반적으로 하나 이상의 이종 항원을 세포 외 (표면 상에), 세포 내 (내부 또는 세포질) 또는 세포 외 및 세포 내 둘다에서 발현하는 효모 비히클이다. TARMOGEN[®]은 일반적으로 개시되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제 5,830,463호 참조). 특정 효모-기반의 면역요법 조성

물 및 이의 제조 및 일반적인 이의 이용 방법 또한 미국 특허 제 5,830,463호, 미국 특허 제 7,083,787호, 미국 특허 제 7,736,642호, Stubbs et al., *Nat. Med.* 7:625-629 (2001), Luet al., *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004), 및 Bernstein et al., *Vaccine* 2008 Jan 24;26(4):509-21에 기재되어 있으며, 이들 문헌들은 각각 원 용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0137] 본원에서, 용어 "유사체"는 다른 화합물과 구조적으로 유사하나 구성에 있어서 약간 다른 (한 원자의 다른 원소 의 원자로 대체 또는 특정 작용기의 존재, 또는 한 작용기의 다른 작용기로의 대체와 같은) 화합물을 의미한다. 따라서, 유사체는 기준 화합물에 대하여 그 작용 및 외관에 있어서 유사하거나 동등하나, 상이한 구조 또는 기 원을 가지는 화합물이다.

[0138] 용어 "치환된", "치환된 유도체" 및 "유도체"는 화합물을 설명하기 위해 사용되는 경우, 비-치환된 화합물에 결 합된 하나 이상의 수소가 다른 원자 또는 화학적 모이어티로 대체되는 것을 의미한다.

[0139] 유도체는 모 화합물과 유사한 물리적 구조를 가지나, 상기 유도체는 그 모 화합물과 상이한 화학적 및/또는 생 물학적 특성을 가질 수 있다. 그러한 특성으로는, 비-제한적으로, 모 화합물의 활성 증가 또는 감소, 모 화합물 과 비교하여 새로운 활성, 생물학적 이용 가능성 강화 또는 저하, 효능 증가 또는 감소, 시험관내 및/또는 생체 내 안정성 증가 또는 감소, 및/또는 흡착 특성 강화 또는 감소를 포함할 수 있다.

[0140] 일반적으로, 용어 "생물학적으로 활성인"은 화합물이 (단백질 또는 펩타이드 포함), 생체내 (즉, 천연 생리학적 환경에서) 또는 시험관내 (즉, 실험실 조건 하에) 측정 또는 관찰하였을 때, 대사, 생리학적, 화학적 또는 다른 세포, 조직, 또는 유기체 프로세스에 영향을 미치는 한가지 이상의 검출가능한 활성을 가지는 것을 의미한다.

[0141] 본 발명에서, 용어 "조정하다 (modulate)"는 "조절한다"와 상호 호환적으로 사용될 수 있으며, 일반적으로 특정 활성의 상향 조절 또는 하향 조절을 의미한다. 본원에 사용되는 용어 "상향 조절한다"는 일반적으로 특정 활성 에 대한 유발, 개시, 증가, 증대, 부스팅, 개선, 강화, 증폭, 촉진 또는 제공 중 임의의 것을 나타내기 위해 사 용될 수 있다. 마찬가지로, 용어 "하향 조절한다"는 일반적으로 특정 활성에 대한 감소, 저하, 저해, 완화, 소 거, 약화, 차단 또는 예방 중 임의의 것을 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0142] 본 발명의 일 구현예에서, 본원에 언급된 임의의 아미노산 서열은, 명시된 아미노산 서열의 C- 및/또는 N-말단 각각의 측면에 하나 이상 내지 약 20개 이하의 부가적인 이중 아미노산이 존재하는 형태로 제조될 수 있다. 제 조되는 단백질 또는 폴리펩타이드는 명시된 아미노산 서열로 "필수적으로 구성되는" 것으로 언급될 수 있다. 본 발명에서, 이중의 아미노산 서열은, 명시된 아미노산 서열 측면에서 자연적으로 발견되지 않는 (즉, 생체 내에 서 자연적으로 발견되지 않는), 또는 명시된 아미노산 서열의 기능과 관련없는, 또는 천연 서열에서 상기한 뉴 클레오티드가 소정의 아미노산 서열이 유래되는 유기체에 대한 표준 코돈 사용법을 이용하여 번역된다면 유전자 에서 생기는 것과 같이 명시된 아미노산 서열을 코딩하는 천연 핵산 서열의 측면에 위치한 뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 없는, 아미노산 서열이다. 마찬가지로, "필수적으로 구성되는"이라는 표현은 본원에서 핵산 서열에 대해 사용되는 경우, 명시된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열의 5' 및/또는 3' 말단 각각에, 하나 이상 내 지 많게는 약 60개 이하의 부가적인 이중의 뉴클레오티드가 측면에 위치될 수 있는, 명시된 아미노산 서열을 코 딩하는 핵산 서열을 지칭한다. 이중의 뉴클레오티드는, 천연 유전자에서 만들어지는 바와 같이 명시된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열의 측면에서 천연적으로 발견되지 않거나 (즉, 생체내에서 천연적으로 발견되지 않음), 또는 명시된 아미노산 서열을 가진 단백질의 기능을 바꾸거나 또는 단백질에 임의의 추가적인 기능을 부 여하는 단백질을 코딩하지 않는다.

[0143] 본원에서, "에 선택적으로 결합한다"라는 표현은, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편 또는 결합 파트너가 명시된 단백질에 우선적으로 결합하는 능력을 의미한다. 보다 구체적으로, "선택적으로 결합한다"라는 표현은 하나의 단백질이 다른 것 (예, 항체, 그의 단편, 또는 항원에의 결합 파트너)에 특이적으로 결합하는 것을 의미하며, 임의의 표준 분석 (예, 면역분석)에 의한 측정시, 결합 수준이 그 분석에 대한 백그라운드 대조군보다 통계학적 으로 유의하게 높은 것을 의미한다. 예를 들어, 면역분석 수행시, 대조군은 전형적으로 항체 또는 항원 결합 단 편만을 함유하는 (즉, 항원 부재) 반응 웰/튜브를 포함하며, 항원 부재시 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편 에 의한 반응성 (예, 웰에의 비특이적 결합)의 양은 백그라운드로 간주된다. 결합은 효소 면역분석 (예, ELISA, 면역블롯 분석 등) 등의 당업계의 표준적인 다양한 방법들을 이용하여 측정할 수 있다.

[0144] 본 발명에 사용되는 단백질 또는 폴리펩타이드에 대한 일반적인 언급은 전장 단백질, 거의 전장 단백질 (상기한 바와 같은), 또는 임의의 단편, 도메인 (구조적, 기능적 또는 면역원성), 구조적 에피토프, 또는 소정의 단백질 의 상동체 또는 변이체를 포함한다. 융합 단백질은 또한 일반적으로 단백질 또는 폴리펩타이드로 지칭될 수 있

다. 본 발명에 따른 단리된 단백질은 그 천연 환경으로부터 취해진 (즉, 인간 조작이 가해진) 단백질 (폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함)이며, 예를 들어, 정제된 단백질, 부분적으로 정제된 단백질, 재조합에 의하여 생산된 단백질, 및 합성에 의하여 생산된 단백질을 포함할 수 있다. 이와 같이, "단리된"이 단백질이 정제된 정도를 나타내는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명의 단리된 단백질은 재조합에 의해 생산된다. 본 발명에서, 용어 "변형" 및 "돌연변이"는 특히 본원에 언급된 단백질 또는 그 일부의 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)에 대한 변형/돌연변이에 대해, 상호 호환적으로 사용될 수 있다.

[0145] 본원에서, 용어 "상동체" 또는 "변이체"는 기준 단백질 또는 펩타이드에 대한 최소한의 변형에 의해 기준 단백질 또는 펩타이드 (즉, "프로토타입" 또는 "야생형" 단백질)와는 차이가 있지만, 천연 형태의 기본적인 단백질 및 측쇄 구조를 유지하는, 단백질 또는 펩타이드를 의미한다. 이러한 변화로는, 하나 또는 수개 아미노산 측쇄의 변화; 결손 (예를 들어, 단백질 또는 펩타이드의 절단된 버전), 삽입 및/또는 치환 등의, 하나 또는 수개의 아미노산의 변화; 하나 또는 수개 원자의 입체 화학적 변화; 및/또는 비-제한적으로, 메틸화, 당화, 인산화, 아세틸화, 미리스토일화, 프레닐화, 팔미트화, 아미드화 및/또는 글리코실포스파티딜 이노시톨의 부가 등의 최소한의 유도체화를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 상동체 또는 변이체는 기준 단백질 또는 펩타이드와 비교해, 강화된, 감소된 또는 실질적으로 유사한 특성을 가질 수 있다. 상동체 또는 변이체는 단백질의 작용제 또는 단백질의 길항제를 포함할 수 있다. 상동체 또는 변이체는, 비-제한적으로, 단리된 기준 단백질에 대한 직접 변형, 직접 단백질 합성, 또는 예를 들어 무작위 또는 표적화된 돌연변이 유발을 실행하여 단백질 변이체를 코딩하는 고전적인 또는 재조합 DNA 기법을 이용하여, 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 대한 변형 등의, 당해 기술 분야에 공지된 단백질 제조 기법을 이용하여 만들 수 있다. 또한, 기준 단백질의 천연 변이체도 존재할 수 있으며 (예를 들어, 이소형, 대립유전자 변이체 또는 개체별로 발생할 수 있는 기타 천연 변이체), 본 발명에서 단리, 생산 및 또는 이용될 수 있다.

[0146] 소정의 단백질의 상동체 또는 변이체는, 기준 단백질의 아미노산 서열 (예를 들어, 본원에 명시된 아미노산 서열, 또는 명시된 단백질의 아미노산 서열)에 대해, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상 동일하거나, 또는 약 87% 이상 동일한, 약 88% 이상 동일한, 약 89% 이상 동일한, 약 90% 이상, 약 91% 이상 동일한, 약 92% 이상 동일한, 약 93% 이상 동일한, 약 94% 이상 동일한, 약 95% 이상 동일한, 약 96% 이상 동일한, 약 97% 이상 동일한, 약 98% 이상 동일한, 약 99% 이상 동일한 (또는 45% - 99% 사이의 모든 정수 범위의 % 동일성) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성될 수 있다. 일 구현예에서, 상동체 또는 변이체는, 기준 단백질의 아미노산 서열에 대해, 100% 미만, 약 99% 미만, 약 98% 미만, 약 97% 미만, 약 96% 미만, 약 95% 미만, 이와 마찬가지로 1%씩 감소하는 수준에서 약 70% 미만까지 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나 또는 이로 구성된다.

[0147] 본원에서, 달리 언급되지 않은 한, 동일성 퍼센트(%)에 대한 언급은 다음을 사용하여 수행되는 상동성 평가를 의미한다: (1) 표준 디폴트 파라미터로 아미노산 검색용 blastp 및 핵산 검색용 blastn을 이용한 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 베이직 상동성 검색, 여기서 쿼리 서열은 (예, 원용에 의해 본 명세서에 그 전체가 포함되는, Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402에 기재된 바와 같이) 디폴트에 의해 저 복잡성 영역 (complexity region)에서 필터링됨; (2) 두 서열간의 BLAST 정렬 (예, 후술한 파라미터가 이용됨); 및/또는 (3) 표준 디폴트 파라미터를 이용한 PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST). 2가지 서열에 대한 베이직 BLAST와 BLAST 간의 표준 파라미터의 일부 차이로 인해, BLAST 프로그램을 이용하여 두 개의 특정 서열이 상당한 상동성을 가지는 것을 인식될 수 있는 반면, 쿼리 서열로서 서열 중 하나를 이용하는 베이직 BLAST에서 수행되는 검색은 탐매치에서 두번째 서열을 동정할 수 없음에 유념하여야 한다. 또한, PSI-BLAST는 자동화된, 사용하기 쉬운 "프로필" 검색 버전이 제공되며, 이는 서열 상동체를 검색하는 민감한 방식이다. 이 프로그램은 먼저 gapped BLAST 데이터베이스 검색을 수행한다. PSI-BLAST 프로그램은 포지션-특이적 스코어 매트릭스를 구축하기 위해 회귀된 임의의 상당한 정렬로부터 유래된 정보를 이용하며, 이는 다음 라운드의 데이터베이스 검색에서 쿼리 서열을 대체한다. 따라서, 동일성 %는 이들 프로그램 중 임의의 하나를 이용하여 정해질 수 있는 것으로 이해된다.

[0148] 두 개의 특정 서열을, Tatusova and Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotidesequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250에 기재된 바와 같이, BLAST를 이용하여 서로 정렬할 수 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 본 명세서에 원용에 의해 포함된다. 이러한 서열 정렬은 2종의 서열 간에 Gapped BLAST 검색 (BLAST 2.0)을 수행하여 제조되는 정렬에 갭 (결손 및 삽입) 도입을 허용하기 위

해, BLAST 2.0 알고리즘을 이용하여 blastp 또는 blastn으로 수행된다. 본원에서 명확하게 할 목적으로, 두 서열에 대한 BLAST 서열 정렬은 다음과 같은 표준 디폴트 파라미터를 이용하여 수행된다.

- [0149] blastn의 경우, 0 BLOSUM62 매트릭스 사용:
- [0150] 매치에 대한 보상 = 1
- [0151] 미스매치에 대한 패널티 = -2
- [0152] 오픈 갭 (5) 및 연장 갭 (2) 패널티
- [0153] 갭 x_드롭오프 (50) 예상 (10) 워드 사이즈 (11) 필터 (온).
- [0154] blastp의 경우, 0 BLOSUM62 매트릭스 사용:
- [0155] 오픈 갭 (11) 및 연장 갭 (1) 패널티
- [0156] 갭 x_드롭오프 (50) 예상 (10) 워드 사이즈 (3) 필터 (온).
- [0157] 단리된 핵산 분자는, 천연 환경으로부터 취해진 (즉, 인간 조작이 가해진) 핵산 분자이며, 천연 환경은 핵산 분자가 본래 발견되는 게놈 또는 염색체이다. 이와 같이, "단리된"은 핵산 분자가 정제된 정도를 반드시 반영하는 것은 아니지만, 분자가, 핵산 분자가 본래 발견되는, 전체 게놈 또는 전체 염색체 또는 2 이상의 유전자를 포함하는 게놈의 세그먼트를, 포함하지 않는 것을 의미한다. 단리된 핵산 분자는 완전한 유전자를 포함할 수 있다. 유전자를 포함하는 단리된 핵산 분자는 이와 같은 유전자를 포함하는 염색체의 단편이 아니라, 그 유전자와 관련된 코딩 영역 및 조절 영역은 포함하나, 동일 염색체에서 자연적으로 발견되는 부가적인 유전자는 포함하지 않는다. 단리된 핵산 분자는 또한 유전자의 일부를 포함할 수도 있다. 단리된 핵산 분자는, 또한, 본래 정상적으로는 명시된 핵산 서열의 측면에 위치하지 않는 추가적인 핵산 (즉, 이중 서열)이 명시된 핵산 서열의 측면에 위치하는 것을 (예, 서열의 5' 및/또는 3' 말단에) 포함할 수 있다. 단리된 핵산 분자는 DNA, RNA (예, mRNA), 또는 DNA 또는 RNA의 유도체 (예, cDNA)를 포함할 수 있다. "핵산 분자"라는 표현이 주로 물리적 핵산 분자를 의미하고, "핵산 서열"이라는 표현은 주로 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 의미하지만, 이들 표현은 특히 단백질 또는 단백질의 도메인을 코딩할 수 있는 핵산 분자 또는 핵산 서열에 대해서는 상호 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0158] 재조합 핵산 분자는, 형질감염시킬 세포에서 핵산 분자(들)의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는, 임의의 전사 조절 서열들 중 적어도 하나에 작동가능하게 연결되는, 본원에 언급된 임의의 하나 이상의 단백질을 코딩하는 임의의 핵산 서열 하나 이상을 포함할 수 있는 분자이다. "핵산 분자"라는 표현은 주로 물리적 핵산 분자를 의미하고 "핵산 서열"이라는 표현은 주로 핵산 분자 상의 뉴클레오타이드 서열을 의미하지만, 이들 표현은 특히 단백질을 코딩할 수 있는 핵산 분자 또는 핵산 서열에 대해서는 상호 호환적으로 사용될 수 있다. 또한, "재조합 분자"라는 표현은 주로 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 핵산 분자를 의미하지만, 동물에 투여되는 "핵산 분자"라는 표현과 상호 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0159] 재조합 핵산 분자는, 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 작동가능하게 연결되고; 융합 단백질의 재조합 생산을 구현할 수 있으며; 본 발명에 따른 숙주 세포로 핵산 분자를 전달할 수 있는, 임의의 핵산 서열, 특히 이중의 서열인, 재조합 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는, 상기 벡터 내로 삽입시킬 단리된 핵산 분자에 천연적으로는 인접하게 발견되지 않는, 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 원핵 또는 진핵동물의 RNA 또는 DNA일 수 있으며, 바람직하게 본 발명에서는, 효모의 형질감염에 유용한 플라스미드이다. 재조합 벡터는 핵산 분자의 클로닝, 서열분석 및/또는 그렇지 않으면 조작에 사용될 수 있으며, 상기 분자의 전달에 사용될 수 있다 (예, DNA 조성물 또는 바이러스 벡터-기재-조성물 내에서와 같이). 재조합 벡터는 바람직하게 핵산 분자의 발현에 사용되며, 또한 발현 벡터로도 언급될 수 있다. 바람직한 재조합 벡터는 효모 등의 형질감염된 숙주 세포에서 발현되어질 수 있다.
- [0160] 본 발명의 재조합 분자에서, 핵산 분자는 전사 조절 서열, 번역 조절 서열, 복제 오리진 및 숙주 세포에 적합하며 본 발명의 핵산 분자의 발현을 조절하는 기타 조절 서열 등의, 조절 서열을 포함하는 발현 벡터에 작동가능하게 연결된다. 특히, 본 발명의 재조합 분자는 하나 이상의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 핵산 분자를 포함한다. "작동가능하게 연결되는"이라는 표현은 핵산 분자가 숙주 세포 내로 형질감염되었을 때 (즉, 형질전환, 형질도입 또는 형질감염) 발현되는 방식으로, 핵산 분자가 발현 조절 서열에 연결되는 것을 의미한다.
- [0161] 본 발명에서, 용어 "형질감염"은 외인성 핵산 분자 (즉, 재조합 핵산 분자)를 세포로 삽입할 수 있는 모든 방법

을 의미한다. 용어 "형질전환"은 이 용어가 조류 (algae), 박테리아 및 효모 등의 미생물 세포 내로의 핵산 분자 도입을 의미하는데 사용되는 경우에는, 용어 "형질감염"과 상호 호환적으로 사용될 수 있다. 미생물 시스템에서, 용어 "형질전환"은 미생물의 외인성 핵산의 획득으로 인한 유전적인 변화를 기술하는데 사용되며, 용어 "형질감염"과 실질적으로 동의어이다. 따라서, 형질감염 기법으로는 형질전환, 세포의 화학적 처리, 유전자총 (particle bombardment), 전기천공, 미세주입, 리포펙션, 흡착, 감염 및 프로토플라스트 융합을 포함하나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0162] 이하 실험 결과들은 예시 목적으로 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0163] 실시예

[0164] **실시예 1**

[0165] 하기 실시예는 개선된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물의 제조 방법을 기술한다.

[0166] 본 실험에서, 작용제 에피토프인 T 세포 에피토프 WLLPGTSTV (서열번호 9)을 포함하고 T 박스 DNA 결합 도메인이 추가로 결손된, 거의 전장 브라큐리 단백질인 인간 브라큐리 항원을 발현하도록, 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 조작하였다. 예를 들어, 서열번호 4 또는 6에 존재하는 천연 브라큐리 T 세포 에피토프는 WLLPGTSTL (서열번호 8)이다. 인간 브라큐리 작용제 항원을 구리-유도성 프로모터 *CUP1*의 통제 하에 발현시켜, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 제조하였다. 특히, 본 발명에 따라 추가로 변형된 브라큐리 항원인 브라큐리 작용제 항원을 서열번호 13으로 표시되는 단일한 폴리펩타이드로서 제조하였다. 서열번호 13의 아미노산 서열은, 서열번호 4 (비-변형된 브라큐리 항원)로 표시되는 인간 브라큐리 단백질의 아미노산 서열과 비교해, (1) 198-222번 결손 (즉, 서열번호 4의 198-222번은 서열번호 13에 존재하지 않음); 및 (2) 서열번호 4의 254번 (서열번호 13의 229번)에 위치한 아미노산 (루신)의 발린으로의 치환 차이를 가진다. 다시 말해, 서열번호 13은 서열번호 4의 1-197번과 이에 바로 융합된 서열번호 4의 223-435번으로 구성된 단일한 폴리펩타이드이며, 이는 서열번호 13에 작용제 에피토프를 발생시키는 아미노산 변형을 (서열번호 4의 254번에 해당되는 서열번호 13의 229번 위치에) 포함한다. (서열번호 4에서) 254번에서의 루신에서 발린으로의 치환으로, 이론으로 결부시키고자 않는 것은 아니지만, 야생형 에피토프 (서열번호 4의 246-254번)와 비교해 브라큐리에 대해 강화된 T 세포 반응을 유도하는 것으로 여겨지는 T 세포 작용제 에피토프가, 서열번호 13의 221-229번 위치에 구축된다. 이러한 작용제 에피토프는 본원에서 서열번호 6으로도 표시된다. 서열번호 13으로 표시된 변형된 브라큐리 항원은 파괴된 DNA 결합력을 가지며, 이 항원을 발현하는 효모는 서열번호 4의 브라큐리 단백질과 비교해 감소된 응집 표현형을 가지며, 부가적으로 구조체를 효모-브라큐리 면역치료로 개체에 투여하였을 때 천연 브라큐리에 대해 T 세포 반응을 강화하기 위한 작용제 에피토프를 포함한다.

[0167] 서열번호 15는 서열번호 13의 변형된 브라큐리 단백질 (실제, 서열번호 13의 2-410번 위치, 서열번호 13의 N-말단 메티오닌은 후술한 N-말단 펩타이드를 첨가하기 위해 제거됨)을 포함하는 융합 단백질이다. 서열번호 15는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 서열 인자들이 인-프레임으로 융합된 단일한 폴리펩타이드이다: (1) 프로테아좀 분해에 대해 내성을 부여하고 효모에서 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩타이드 (서열번호 15의 1-6번 위치, 이의 아미노산 서열은 서열번호 16으로 본원에서 표시됨); (2) 서열번호 4의 2-197번 및 223-435번으로 구성되며, 서열번호 4의 254번에서 발린의 루신으로의 치환을 더 포함하며, 또한 서열번호 13의 2-410번 위치로서 기술될 수 있는, 인간 브라큐리 항원; 및 (3) 헥사히스티딘 태그 (서열번호 15의 416-421번). 서열번호 15의 아미노산 서열 및 서열번호 13의 2-410번의 아미노산 서열은 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다. 이 융합 단백질을 발현하는 효모-기반의 면역치료 조성물은 또한 본원에서 GI-6306으로 지칭된다.

[0168] GI-6306 효모-면역요법 조성물을 제조하기 위해, 간략하게는, 서열번호 13의 아미노산 서열을 가진 인간 브라큐리 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 합성하고, PCR로 증폭시킨 다음 효모 2 μ m 발현 벡터에서 *CUP1* 프로모터 (벡터 pGI-100) 뒤에 오는 *EcoRI* 및 *SpeI* 클로닝 사이트에 삽입하였다. 서열번호 15로 표시되는 전체 융합 단백질을 코딩하기 위해, N-말단 안정화 펩타이드, MADEAP (서열번호 16) 및 C-말단 헥사히스티딘 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 또한 플라스미드 벡터에 삽입하였다. 제조된 플라스미드를 플라스미드 저장을 위해 DH5 α 로, 그리고 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 제조하기 위해 사카로마이세스 세레비지에 W303 α 로 형질감염시켰다.

[0169] 사카로마이세스 세레비지에의 형질전환은 리튬 아세테이트/폴리에틸렌 글리콜 형질감염에 의해 수행하였으며, 1차 형질감염체를 우라실 결핍된 최소 고체 아가 플레이트 (UDA; uridine dropout agar)에서 선별하였다. 이들 1차 형질감염체 콜로니는, 우라딘 및 루신이 결핍된 아가 플레이트 (ULDA)에서 각 콜로니를 재접종하고, 효모

세포내 브라큐리 플라스미드 카피 수가 높은 정상 상태를 확립하고 콜로니 순도를 확보하도록 30℃에서 4일간 배양하여, 선별하였다.

[0170] 우리딘 및 루신이 결핍된 액체 스타터 배양물 (UL4aa)에 ULDA 플레이트로부터 수득한 콜로니를 이용해 접종하여, 20시간 동안 30℃에서 회전 교반 속도 250 rpm으로 배양하였다. 그런 후, 이 일차 배양물을 동일한 UL4aa 포물레이션의 최종 배양물에 접종하는데 사용하였다.

[0171] UL4aa 액체 배지 (L 당) 레시피:

[0172] 25 gram (g) 글루코스

[0173] 10 g 황산암모늄을 포함하는 효모 질소 베이스

[0174] 0.08 g 아데닌

[0175] 0.16 g 트립토판

[0176] 0.16 g 히스티딘

[0177] *CUP1*-구동형 구리-유도성 프로모터의 통제 하에 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 평가하기 위한 일차 실험에서, 효모-브라큐리 배양물이 약 2 Y.U./ml 밀도에 도달한 후 0.375 mM 구리 설페이트를 첨가하여 최종 배양에서 효모-브라큐리 발현을 개시하였으며, 유도는 30℃에서 3시간 지속하였다. 각 배양물에서 세포를 회수하여, PBS 중에 행군 다음 56℃에서 1시간 동안 PBS 중에 열-사멸 처리하였다.

[0178] 배양물을 열-사멸 처리한 후, 세포를 PBS 중에 3번 행군었다. 전체 단백질 함량을 TCA 석출/니트로셀룰로스 결합 분석으로 측정하고, 브라큐리 항원 발현을 항-his 태그 단일클론 항체와 항-브라큐리 항체 (Abcam, Cambridge, MA)를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 평가하였다. 효모 세포의 브라큐리 항원 함량은 웨스턴 블롯의 반-정량적 디지털 이미지를 이용해 정제된 재조한 his-태그 결합된 항원을 기지량으로 함유한 표준 곡선에서 효모 라이세이트의 브라큐리 항원 밴드 밀도/신호를 내삽법 (interpolation)으로 추정하여, 정량하였다.

[0179] 일차 발현 실험 결과는 도 1에 나타내는데, GI-6306가 변형된 브라큐리 작용제 항원 (서열번호 13의 2-410)을 포함하는 융합 단백질 (서열번호 15)을 고 수준 (16,438 ng/YU)으로 발현한다는 것이 입증되었다. 이러한 발현 수준은, GI-6301로 지칭되는 효모 면역요법 조성물에 의해 발현되는 비-변형된 브라큐리 항원 (서열번호 4의 2-435)을 포함하는 융합 단백질의 발현 (16,787 ng/YU; 도 1)과 비슷한 수준이다. GI-6306에 의한 변형된 브라큐리 작용제 항원의 발현은, 서열번호 13과 동일한 작용제 점 돌연변이를 가지만 서열번호 13에 존재하는 DNA 결합 도메인이 결손되지 않은, 브라큐리 작용제 항원의 발현 보다 현저하게 높았다 (GI-6305로 지칭되는 효모 면역치료조성물은 서열번호 4의 2-435의 아미노산 서열을 발현하며, 단, 서열번호 4의 254번 위치에서 발린이 루신으로 치환됨) (도 1, 10,862 ng/YU). 즉, 브라큐리의 DNA 결합 활성을 (예, DNA 결합 잔기의 결손을 통해) 제거하면, 브라큐리 작용제 항원의 발현이 현저하게 강화되는 것으로 나타났다.

[0180] 진술한 효모-브라큐리 면역요법 산물 (GI-6301, GI-6305 및 GI-6306)의 배양물들은 또한 가시적인 침강 검사를 기초로 응집 특징을 평가하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 효모-브라큐리 조성물 GI-6306은 GI-6301 또는 GI-6305 보다 응집성이 현저하게 낮았다.

[0181] 실시예 2

[0182] 하기 실시예는 브라큐리-양성 암을 가진 개체를 대상으로 한 1상 임상 실험을 기술한다.

[0183] GI-6306로 알려진 효모-브라큐리 면역치료 조성물 또는 본원에 기술된 또 다른 효모-브라큐리 면역치료 조성물을 이용해, 개방-표지, 순차적 용량-증가, 1상 임상 실험을 개시하였다. 이러한 임상 실험 프로토콜 하에, 9-18 명의 암 환자 (투여 집단 당 3-6명의 환자)에 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 4 Y.U.(1 Y.U. x 4 부위, 면역요법 조성물 1 Y.U.를 각 진료시 환자 신체의 상이한 4곳에 투여하는 것을 의미함), 16 Y.U. (4 Y.U. x 4 부위), 40 Y.U. (10 Y.U. x 4 부위) 또는 80 Y.U. (20 Y.U. x 4 부위)의 투여량 범위로 사용하여 순차적 투여량 집단 확대 프로토콜로 피하 투여하였다. 면역요법 조성물을 총 7회 진료시 (~3 개월) 2주 간격으로 투여한 다음, 환자가 오프-스터디 기준을 충족시킬 때까지 매월 투여한다. 최대 내약 용량 (MTD, maximum tolerated dose) 또는 관찰된 최적 투여량에서 환자의 확대 집단 (n=10)을, 추가적인 연구를 수행하기 위해 선별하였다. 결과는 1차 엔드포인트로서 안전성 및 허용성을 모니터링하고, 확대된 집단에서는, ELISpot 분석에서 브라큐리-특이적인 T 세포 증가 및 브라큐리 단백질에 대한 반응에 따른 증식 (예, 처리시 브라큐리-특이적 CD8+ 또는 CD4+ T 세포 출현 또는 증가)에 의하여 측정되는, T 세포 전구체들에서 현저한 변화 유무를 모니터링하는 것이다. 2차 엔드

포인트로서, 말초 혈액 (CD8⁺ 기억/작동자 T 세포, CD4⁺ 기억/작동자 T 세포, Treg, NK 세포, DC)내 면역 세포 서브세트의 빈도 및 사이토카인 (예, IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-2, IL-4, TGF- β , 등)의 혈청 수준 변화를 포함하는, 일반적 면역 활성화 파라미터 뿐 아니라, 무-진행성 생존, 임상적인 방사선 반응, 혈청 마커의 감소 및/또는 순환성 종양 세포의 감소와 같은 임상적 이점을 측정한다.

[0184] GI-6306를 비롯한 면역요법 조성물은 유의한 독성이 없고 안전하며 충분히-허용적일 것으로 예상된다. 또한, 면역요법 조성물은 적어도 환자 일부 또는 다수에서 이미 존재하는 브라큐리-특이적 베이스라인 T 세포 반응의 개선 또는 처리-유발성 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 구현할 것으로 예상된다. 일부 환자에서는 또한 질병이 안정될 것으로 예상된다.

[0185] 부가적인 연구 또는 연구 확대에서, 본원의 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 상기 결정된 최대 내약 용량 또는 관찰된 최적 투여량으로 추가적인 환자 집단에 투여하고, 동일한 1차 및 2차 엔드포인트를 측정한다.

[0186] 실시예 3

[0187] 아래 실시예는 본원에 기술된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 이용한 2상 임상 실험을 기술한다.

[0188] 유방암 환자를 대상으로 한 무작위 2상 임상 실험은, 실시예 1에 언급된 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 사용해 수행한다. 1기, 2기 또는 3기의 브라큐리-양성 유방암을 앓고 있는 개체 적어도 100명 이상이 참가한다. 대상 포함 기준은 1기, 2기 또는 3기 암을 앓고 있는 개체를 포함할 수 있다. 또한 대상 포함 기준은 "삼중 음성" 유방암 (에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR) 및 HER2 각각에 대하여 음성인 암)에 걸린 개체를 포함할 수 있다. 대상 포함 기준은 또한 림프 결절-음성 암 (lymph node-negative cancer) 환자를 포함할 수 있다.

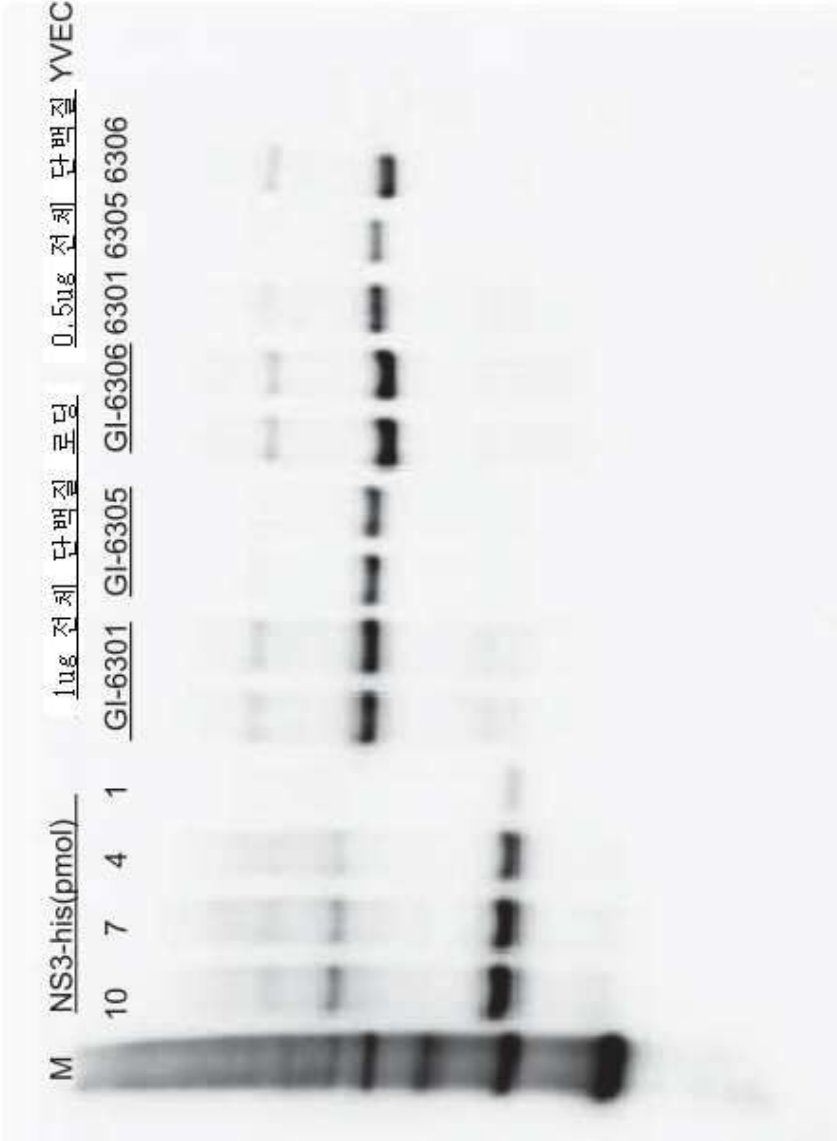
[0189] 실험은 이중 맹검 또는 개방 표지, 위약-대조군, 다기관 실험으로 수행한다. 모든 환자는 치료하는 동안에 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물을 환자 팔에 수차례 연속 주사하는 표준 치료를 받는다. 1차 엔드포인트는 비-재발성 생존 또는 전체 생존율 (overall survival)이다. 부가적인 엔드포인트는 항원-특이적인 T 세포 반응 (예, 치료시 브라큐리-특이적 CD8⁺ T 세포의 출현 또는 증가), 림프 결절 음성 유지, 전이 진행 및 종양 세포에서의 브라큐리 발현을 포함할 수 있다.

[0190] 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 유의한 독성이 없고, 안전하여, 허용성이 우수할 것으로 예상된다. 또한, 효모-브라큐리 면역치료학적 조성물은 적어도 일부 환자 또는 다수 환자들에 이미 존재하는 브라큐리-특이적인 베이스라인 T 세포 반응의 개선 및/또는 처리-유발성 브라큐리-특이적인 T 세포 반응 형성을 달성할 것으로 예상된다. 일부 또는 다수 환자들에서는 또한 질환이 안정되거나, 림프 결절 음성을 유지하거나, 및/또는 전이성 진행이 예방, 감소 또는 중단될 것으로 예상된다.

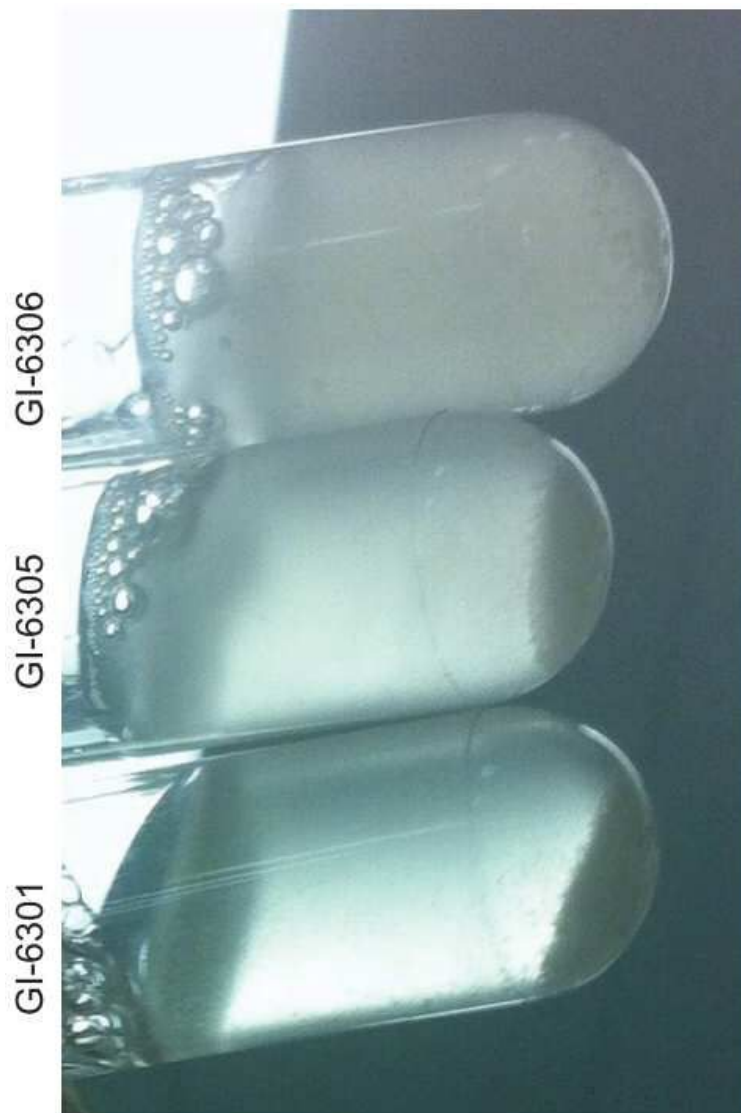
[0191] 본 발명의 다양한 구현예들이 상세하게 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 이들 구현예들에 대한 수정 및 조정을 가할 수 있음은 자명하다. 그러나, 이러한 수정 및 조정은 첨부된 예시적인 청구항에 기술된 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 명확하게 이해될 것이다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlobeImmune, Inc.

The USA, as represented by the Secretary, Dept. of Health
and Human Services

King, Thomas H.

Guo, Zhimin

Schlom, Jeffrey

Palena, Claudia

<120> Modified Yeast-Brachyury Immunotherapeutic Compositions

<130> 7797-3-PCT

<140> Not yet assigned

<141> 2016-07-26

<150> 62/200,497

<151> 2015-08-03

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2518

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (494)..(1801)

<400> 1

tttgcttttg cttattttccg tccatttccc tctctgcgcg cggaccttcc ttttccagat	60
ggtgagagcc gcggggacac ccgacgccgg ggcaggctga tccacgatcc tgggtgtgcg	120
taacgccgcc tggggctccg tgggcgaggg acgtgtgggg acaggtgcac cggaaactgc	180
cagactggag agttgaggca tcggaggcgc gagaacagca ctactactgc ggcgagacga	240
gcgcggcgca tcccaaagcc cggccaaatg cgctcgtccc tgggagggga gggaggcgcg	300
cctggagcgg ggacagtctt ggtcgcgcc ctctcccgg gtctgtgccg ggacccggga	360

cccgggagcc gtcgcaggtc tcggtccaag gggccccttt tctcggaagg gcggcgccca	420
agagcaggga aggtggatct caggtagcga gtctgggctt cggggacggc ggggagggga	480
gccggacggg agg atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc	529

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser

1 5 10

ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg	577
Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu	

15 20 25

cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg	625
Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val	

30 35 40

ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat	673
Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn	

45	50	55	60	
gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag				721
Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys				
	65	70	75	
gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg				769
Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu				
	80	85	90	
gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa				817
Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu				
	95	100	105	
tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac				865
Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr				
	110	115	120	
atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc				913
Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro				
125	130	135	140	
gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc				961
Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly				
	145	150	155	
cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata				1009
Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile				
	160	165	170	
gtg aga gtt ggg ggt cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct				1057
Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro				
	175	180	185	
gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca				1105
Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr				
	190	195	200	
gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca				1153

Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala
205 210 215 220
aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc 1201
Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser
225 230 235
cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc 1249
Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser
240 245 250
acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc etc 1297
Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu
255 260 265
tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc 1345
Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser
270 275 280
cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct 1393
His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser
285 290 295 300
cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc 1441
Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser
305 310 315
cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc 1489
His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu
320 325 330
ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc 1537
Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro
335 340 345
agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca 1585
Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala
350 355 360
gca gcc gtg tcc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc 1633
Ala Ala Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro

365	370	375	380	
gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tgc gcg ccc tct tcc tgc				1681
Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser				
	385	390	395	
gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca gac atc gtg gac				1729
Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp				
	400	405	410	
agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca				1777
Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr				
	415	420	425	
cct gtg tgc cca cct tcc atg tga agcagcaagg cccaggtccc gaaagatgca				1831
Pro Val Ser Pro Pro Ser Met				
	430	435		
gtgacttttt gtcgtggcag ccagtggtga ctggattgac ctactaggta cccagtggca				1891
gtctcagggtt aagaaggaaa tgcagcctca gtaacttcct tttcaaagca gtggaggagc				1951
acacggcacc tttccccaga gccccagcat cccttgctca cacctgcagt agcgggtgctg				2011
tcccaggtgg cttacagatg aaccaactg tggagatgat gcagttggcc caacctcact				2071
gacggtgaaa aaatgtttgc cagggtccag aaactttttt tggtttattt ctcatacagt				2131
gtattggcaa ctttggcaca ccagaatttg taaactccac cagtcctact ttagtgagat				2191
aaaaagcaca ctcttaatct tcttccttgt tgctttcaag tagttagagt tgagctgtta				2251
aggacagaat aaaaatcatag ttgaggacag caggtttttag ttgaattgaa aatttgactg				2311
ctctgcccc tagaatgtgt gtattttaag catatgtagc taatctcttg tgttgttaaa				2371
ctataactgt ttcataatctt tcttttgaca aagtagccaa agacaatcag cagaaagcat				2431
tttctgcaaa ataaacgcaa tatgcaaaat gtgattcgtc cagttattag tgaagcccct				2491
ccttttgtga gtatttactg tttattg				2518
<210> 2				
<211> 435				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 2				
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg				

1 5 10 15
 Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30
 Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45
 Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val

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

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

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

 245 250 255

Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
260 265 270

Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
275 280 285

Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
290 295 300

Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp

305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
325 330 335

Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
340 345 350

Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Ser
355 360 365

Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr

370 375 380

Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
385 390 395 400

Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
405 410 415

Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
420 425 430

Pro Ser Met
435

<210> 3

<211> 1305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1305)

<400> 3

atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga

Met	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	
1			5					10				15				
gtg	gac	cac	ctg	ctg	agc	gcc	gtg	gag	aat	gag	ctg	cag	gcg	ggc	agc	96
Val	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Asn	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	
			20					25				30				
gag	aag	ggc	gac	ccc	aca	gag	cgc	gaa	ctg	cgc	gtg	ggc	ctg	gag	gag	144
Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Arg	Val	Gly	Leu	Glu	Glu	
			35					40				45				
agc	gag	ctg	tgg	ctg	cgc	ttc	aag	gag	ctc	acc	aat	gag	atg	atc	gtg	192
Ser	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Thr	Asn	Glu	Met	Ile	Val	
			50					55				60				
acc	aag	aac	ggc	agg	agg	atg	ttt	ccg	gtg	ctg	aag	gtg	aac	gtg	tct	240
Thr	Lys	Asn	Gly	Arg	Arg	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Asn	Val	Ser	
65						70				75					80	
ggc	ctg	gac	ccc	aac	gcc	atg	tac	tcc	ttc	ctg	ctg	gac	ttc	gtg	gcg	288
Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Phe	Val	Ala	
						85				90					95	
gcg	gac	aac	cac	cgc	tgg	aag	tac	gtg	aac	ggg	gaa	tgg	gtg	ccg	ggg	336
Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Trp	Val	Pro	Gly	
			100					105				110				
ggc	aag	ccg	gag	ccg	cag	gcg	ccc	agc	tgc	gtc	tac	atc	cac	ccc	gac	384
Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Asp	
			115					120				125				
tcg	ccc	aac	ttc	ggg	gcc	cac	tgg	atg	aag	gct	ccc	gtc	tcc	ttc	agc	432
Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	Pro	Val	Ser	Phe	Ser	
			130					135				140				
aaa	gtc	aag	ctc	acc	aac	aag	ctc	aac	gga	ggg	ggc	cag	atc	atg	ctg	480
Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Met	Leu	
145						150				155					160	
aac	tcc	ttg	cat	aag	tat	gag	cct	cga	atc	cac	ata	gtg	aga	gtt	ggg	528
Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	Ile	Val	Arg	Val	Gly	

165	170	175	
gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc			576
Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe			
180	185	190	
ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att			624
Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile			
195	200	205	
aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt			672
Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser			
210	215	220	
gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg			720
Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly			
225	230	235	240
tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc ctg tgt cca			768
Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro			
245	250	255	
cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc			816
Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser			
260	265	270	
acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca			864
Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser			
275	280	285	
ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct			912
Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser			
290	295	300	
gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg			960
Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp			
305	310	315	320
tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac			1008

Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His

325 330 335
aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct 1056

Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser

340 345 350
gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc 1104

Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr

355 360 365
aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc gcg cac tac aca 1152

Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr

370 375 380
ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gca ccc tct tcc tcg gga tcc cca ctg 1200

Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu

385 390 395 400
tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac 1248

Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp

405 410 415
gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tcg cca 1296

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

420 425 430
cct tcc atg 1305

Pro Ser Met

435
<210> 4
<211> 435
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg

1 5 10 15
Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser

20	25	30
Glu Lys Gly Asp Pro Thr	Glu Arg Glu Leu Arg Val	Gly Leu Glu Glu
35	40	45
Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val		
50	55	60
Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser		
65	70	75
Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala		
85	90	95
Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly		
100	105	110
Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp		
115	120	125
Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser		
130	135	140
Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu		
145	150	155
Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly		
165	170	175
Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe		
180	185	190
Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile		
195	200	205
Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser		
210	215	220
Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly		
225	230	235
Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro		
245	250	255
Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser		
260	265	270

Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
275 280 285

Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
290 295 300

Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
325 330 335

Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
340 345 350

Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr
355 360 365

Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
370 375 380

Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
385 390 395 400

Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
405 410 415

Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
420 425 430

Pro Ser Met
435

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Agonist Peptide

<400> 6

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val

1 5 10

<210> 10

<211> 410

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg

1 5 10 15

 Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30
 Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45
 Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50 55 60
 Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
 65 70 75 80

 Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
 85 90 95
 Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
 100 105 110
 Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
 115 120 125
 Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
 130 135 140

 Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
 165 170 175
 Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
 180 185 190
 Ile Ala Val Thr Ala Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro
 195 200 205

 Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro
 210 215 220
 Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr
 245 250 255

Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg
260 265 270

Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met
275 280 285

Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro
290 295 300

Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser
305 310 315 320

Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly
325 330 335

Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg
340 345 350

Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro
355 360 365

Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn
370 375 380

Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala
385 390 395 400

Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met
405 410

<210> 11

<211> 1295

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> CDS

<222> (10)..(1275)

<400> 11

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg 51

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala

1

5

10

160	165	170	
atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac			579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His			
175	180	185	190
tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct aga agt gat cac			627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Arg Ser Asp His			
	195	200	205
aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg tac tcc			675
Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser			
	210	215	220
caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc ctg tgt cca cct gca			723
Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro Pro Ala			
	225	230	235
aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc acg cac			771
Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His			
	240	245	250
agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca ccc tac			819
Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr			
255	260	265	270
ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct gac aac			867
Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn			
	275	280	285
tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg tcc agc			915
Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser			
	290	295	300
ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac aat gcc			963
Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala			
	305	310	315
agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct gtg agc			1011
Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser			
	320	325	330

aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc aac ggg 1059
 Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly
 335 340 345 350
 ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc gcg cac tac aca ccc etc 1107

Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu
 355 360 365
 acc cat ccg gtc tcg gca ccc tct tcc tcg gga tcc cca ctg tac gaa 1155
 Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu
 370 375 380
 ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac gcc gca 1203
 Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala

385 390 395
 gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tcg cca cct tcc 1251
 Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser
 400 405 410
 atg cat cac cat cac cat cac tga gactagtccc gggcggccgc 1295
 Met His His His His His His
 415 420

<210> 12
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 12

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

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

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

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

 245 250 255
 Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro
 275 280 285
 Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly
 290 295 300

Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro

305 310 315 320

Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly

325 330 335

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

340 345 350

Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His

355 360 365

Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala

370 375 380

Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln

385 390 395 400

Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His

405 410 415

His His His His His

420

<210> 13

<211> 410

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val

50 55 60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser

65 70 75 80
 Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
 85 90 95
 Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
 100 105 110
 Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
 115 120 125
 Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser

 130 135 140
 Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
 165 170 175
 Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
 180 185 190
 Ile Ala Val Thr Ala Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro

 195 200 205
 Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro
 210 215 220
 Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr
 245 250 255
 Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg

 260 265 270
 Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met
 275 280 285
 Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro
 290 295 300
 Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser
 305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg

340 345 350

Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro

355 360 365

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

370 375 380

Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala

385 390 395 400

Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met

405 410

<210> 14

<211> 1295

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> CDS

<222> (10)..(1275)

<400> 14

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg 51

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala

1 5 10

gga aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag 99

Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu

15 20 25 30

aat gag ctg cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa 147

Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu

35 40 45

ctg cgc gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag 195

Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu

50	55	60	
ctc acc aat gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg			243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro			
65	70	75	
gtg ctg aag gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc			291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser			
80	85	90	
ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg			339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val			
95	100	105	110
aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc			387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser			
115	120	125	
tgc gtc tac atc cac ccc gac tgc ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg			435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met			
130	135	140	
aag gct ccc gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac			483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn			
145	150	155	
gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga			531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg			
160	165	170	
atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac			579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His			
175	180	185	190
tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct aga agt gat cac			627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Arg Ser Asp His			
195	200	205	
aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg tac tcc			675
Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser			
210	215	220	

caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc gtg tgt cca cct gca	723
Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro Pro Ala	
225 230 235	
aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc acg cac	771
Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His	
240 245 250	
agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca ccc tac	819
Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr	
255 260 265 270	
ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct gac aac	867
Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn	
275 280 285	
tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg tcc agc	915
Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser	
290 295 300	
ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac aat gcc	963
Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala	
305 310 315	
agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct gtg agc	1011
Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser	
320 325 330	
aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc aac ggg	1059
Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly	
335 340 345 350	
ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc gcg cac tac aca ccc ctc	1107
Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu	
355 360 365	
acc cat ccg gtc tcg gca ccc tct tcc tcg gga tcc cca ctg tac gaa	1155
Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu	
370 375 380	

ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac gcc gca 1203

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

385 390 395

gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tcg cca cct tcc 1251

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

400 405 410

atg cat cac cat cac cat cac tga gactagtccc gggcggccgc 1295

Met His His His His His His

415 420

<210> 15

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys

1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu

65 70 75 80

Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu

85 90 95

Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly

100 105 110

Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val

115 120 125

Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala
 130 135 140
 Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His
 165 170 175
 Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe
 180 185 190
 Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Arg Ser Asp His Lys Glu
 195 200 205
 Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp
 210 215 220
 Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro Pro Ala Asn Pro
 225 230 235 240
 His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys
 245 250 255
 Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro
 275 280 285
 Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly
 290 295 300
 Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly
 325 330 335
 Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly
 340 345 350
 Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His
 355 360 365
 Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala

370 375 380
 Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln
 385 390 395 400
 Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His
 405 410 415
 His His His His His
 420

 <210
 > 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 16
 Met Ala Asp Glu Ala Pro
 1 5