



공개특허 10-2020-0110678



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0110678
(43) 공개일자 2020년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)	더 위스타 인스티튜트 오브 아나토미 앤드 바이올로지
A61P 31/20 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)	미국 펜실베니아 19104 필라델피아 스프루스 스트리트 3601
(52) CPC특허분류	(72) 발명자
A61K 39/12 (2013.01)	웨이너, 데이비드, 비.
A61P 31/20 (2018.01)	미국, 펜실베니아 19066, 메리언, 717 베컴 레인듀퍼펫, 엘리자베스
(21) 출원번호 10-2020-7023370	미국, 펜실베니아 19103, 아파트 1알, 2227 멜란시 플레이스
(22) 출원일자(국제) 2019년01월18일	(74) 대리인
심사청구일자 없음	이명진
(85) 번역문제출일자 2020년08월12일	
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/014171	
(87) 국제공개번호 WO 2019/143921	
국제공개일자 2019년07월25일	
(30) 우선권주장	
62/619,161 2018년01월19일 미국(US)	

전체 청구항 수 : 총 30 항

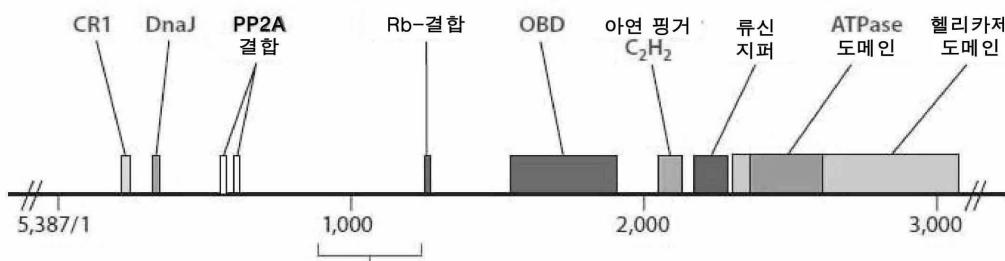
(54) 발명의 명칭 며켈 세포 폴리오마바이러스의 큰 및 작은 T 항원, 핵산 작제물 및 상기 항원으로부터 만들어진 백신, 및 상기 항원을 사용하는 방법

(57) 요 약

공통 며켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) T 항원을 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자 및 조성물, 면역조절 방법 및 MCV에 대한 면역 반응을 유도하는 방법이 개시되어 있다. MCV에 의한 감염을 치료하는 방법 및 MCV와 관련된 며켈 세포 암종을 치료하거나 예방하는 방법이 개시되어 있다. 변형된 공통 MCV T 항원이 개시되어 있다.

대 표 도

A



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
A61K 2039/585 (2013.01)
A61K 2039/70 (2013.01)
C12N 2710/22034 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 변형된 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) T 항원을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 T 항원은 천연 MCV T 항원의 적어도 하나의 종양원성 특징을 과괴하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 종양원성 특징은 CR1 결합, DnaJ 결합, 포파타제 pp2A-결합 결합, Rb 결합, ATPase 활성, 헬리카제 활성, 샤페론 단백질 결합, hVam6p 결합, Fbxw7 결합, 기원 결합, 및 형질전환으로 구성된 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이는 D44, W209, E216, L142, L91, K92, D93, Y94 및 M95로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산에서의 돌연변이인, 면역원성 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이는 D44N 돌연변이, W209A, E216K 돌연변이, L142A 돌연변이, L91A 돌연변이, K92A 돌연변이, D93A 돌연변이, Y94A 돌연변이 및 M95A 돌연변이로 구성된 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 MCV T 항원은 큰 T 항원 (LTAg), 작은 t 항원 (STAg), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는,

- 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열,
- 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편,
- 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및
- 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩하는, 면역원성 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 DNA 분자 및 RNA 분자로 구성된 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는,

- 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열,

- b) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편,
- c) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 및
- d) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 웨타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 개시 코돈, IgE 선도 서열 및 정지 코돈으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결되는, 면역원성 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 핵산 분자는,

서열번호:7에 제시된 아미노산 서열에 작동가능하게 연결되는,

- a) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열,
- b) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편,
- c) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및
- d) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩하는, 면역원성 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 핵산 분자는,

서열번호:7을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결되는,

- a) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열,
- b) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편,
- c) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 및
- d) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 벡터를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 바이러스 입자에 혼입되는, 면역원성 조성물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 아쥬반트를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 16

핵산 분자로서,

- a) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열,
- b) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편,
- c) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및
- d) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩하는, 핵산 분자.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 핵산 분자는 DNA 분자 및 RNA 분자로 구성된 군으로부터 선택되는, 핵산 분자.

청구항 18

청구항 16에 있어서, 상기 핵산 분자는,

- a) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열,
 - b) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편,
 - c) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 및
 - d) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편
- 으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 19

청구항 16에 있어서, 상기 인코딩된 웨타이드는 개시 코돈, IgE 선도 서열 및 정지 코돈으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결되는, 핵산 분자.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 핵산 분자는,

서열번호:7에 제시된 아미노산 서열에 작동가능하게 연결되는,

- a) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열,
- b) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편,
- c) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및
- d) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩하는, 핵산 분자.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 핵산 분자는,

서열번호:7을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결되는,

a) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열,

b) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편,

c) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 및

d) 서열번호:1, 서열번호:3 및 서열번호:5로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 22

청구항 16에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 벡터를 포함하는, 핵산 분자.

청구항 23

청구항 16에 있어서, 상기 핵산 분자는 바이러스 입자를 포함하는, 핵산 분자.

청구항 24

펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 펩타이드는,

a) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열,

b) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편,

c) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 및

d) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 25

펩타이드로서,

a) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열,

b) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편,

c) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및

d) 서열번호:2, 서열번호:4 및 서열번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편

으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드.

청구항 26

MCV T 항원에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 MCV T 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 청구항 1의 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 투여는 전기천공 및 주사 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 28

MCV 관련된 병리의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 MCV 관련된 병리를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 청구항 1의 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 투여는 전기천공 및 주사 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 30

청구항 28에 있어서, 상기 MCV 관련된 병리는 MCV 감염 및 머켈 세포 암종 중 적어도 하나인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

본원은 2018년 1월 19일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/619,161에 대한 우선권을 주장하며, 이들의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 편입되어 있다.

[0003] 발명의 분야

본 발명은 면역 반응을 유도하고 MCV에 감염된 개체를 치료하고/거나 머켈(Merkel) 세포 암종 (MCC)을 치료하거나 예방하는 백신에 관한 것이다. 본 발명은 공통 MCV 큰 T 항원 (LTAg) 및 작은 t 항원 (STAg) 종양단백질 및 이를 인코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV)는 공격적인 인간 피부암인 머켈 세포 암종 (MCC)과의 연관성으로 인해 최근 주목받고 있다. 미국에서는 매년 대략 1,500건의 신규한 사례가 진단되며, MCC를 갖는 대상체의 사망률은 46%이다. MCC로 인해 피부 T 세포 림프종 및 만성 골수성 백혈병보다 더 많은 환자들이 사망한다. MCC의 대다수(대략 75%)는 클론적으로 통합된 바이러스 DNA를 함유하고, 바이러스 T 항원 전사체 및 단백질을 발현시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 현재 임상시험에서 시험중인 MCC에 대한 백신은 없다. 따라서, 당업계에서 MCV 및 MCC에 대한 치료 백신이 필요하다. 본 발명은 이러한 미충족 욕구를 만족시킨다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 요약

[0008] 일 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 변형된 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) T 항원을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이되, 상기 T 항원은 천연 MCV T 항원의 적어도 하나의 종양원성 특징을 과괴하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 종양원성 특징은 CR1 결합, DnaJ 결합, 포파타제 pp2A-결합 결합, Rb 결합, ATPase 활성, 헬리카제 활성, 샤퀘론 단백질 결합, hVam6p 결합, Fbxw7 결합, 기원 결합, 및 형질전환 중 적어도 하나이다.

[0009] 일 구현예에서, 적어도 하나의 돌연변이는 D44, W209, E216, L142, L91, K92, D93, Y94 또는 M95의 아미노산 중 적어도 하나에서의 돌연변이다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 돌연변이는 D44N 돌연변이, W209A, E216K 돌연변이, L142A 돌연변이, L91A 돌연변이, K92A 돌연변이, D93A 돌연변이, Y94A 돌연변이 또는 M95A 돌연변이 중 적어도 하나이다. 일 구현예에서, 변형된 MCV T 항원은 D44N 돌연변이, W209A, 또는 E216K 돌연변이 중 적어도 하나를 포함한다. 일 구현예에서, 변형된 MCV T는 D44N 돌연변이, W209A, 및 E216K 돌연변이를 포함한다.

- [0010] 일 구현예에서, 적어도 하나의 MCV T 항원은 큰 T 항원 (LTAg) 또는 작은 t 항원 (STAg)이다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 MCV T 항원은 LTAg와 STAg의 조합이다.
- [0011] 일 구현예에서, 핵산 분자는 a) 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, b) 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나, c) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편, 또는 d) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편의 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩한다.
- [0012] 일 구현예에서, 핵산 분자는 DNA 분자 또는 RNA 분자이다.
- [0013] 일 구현예에서, 핵산 분자는 a) 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, b) 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편, c) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 d) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편의 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0014] 일 구현예에서, 상기 웨타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 일 구현예에서, 조절 서열은 개시 코돈, IgE 선도 서열 또는 정지 코돈 중 적어도 하나이다.
- [0015] 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:7로 제시된 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된, a) 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, b) 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나, c) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편, 또는 d) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편의 아미노산 서열 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩한다.
- [0016] 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:7을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된, a) 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, b) 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편, c) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 d) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0017] 일 구현예에서, 핵산 분자는 발현 벡터를 포함한다.
- [0018] 일 구현예에서, 핵산 분자는 바이러스 입자에 혼입된다.
- [0019] 일 구현예에서, 면역원성 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함한다.
- [0020] 일 구현예에서, 면역원성 조성물은 아쥬반트를 추가로 포함한다.
- [0021] 일 구현예에서, 본 발명은 a) 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, b) 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나, c) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편, 또는 d) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편의 아미노산 서열 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 인코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0022] 일 구현예에서, 핵산 분자는 DNA 분자 또는 RNA 분자이다.
- [0023] 일 구현예에서, 핵산 분자는 a) 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, b) 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편, c) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 d) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편의 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나를 포함한다.

- [0024] 일 구현예에서, 상기 웹타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 일 구현예에서, 조절 서열은 개시 코돈, IgE 선도 서열 또는 정지 코돈 중 적어도 하나이다.
- [0025] 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:7로 제시된 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된, a) 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, b) 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나, c) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편, 또는 d) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편의 아미노산 서열 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 웹타이드를 인코딩한다.
- [0026] 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:7을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된, a) 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, b) 뉴클레오타이드 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편, c) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 d) 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열의 면역원성 단편 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0027] 일 구현예에서, 핵산 분자는 발현 벡터를 포함한다.
- [0028] 일 구현예에서, 핵산 분자는 바이러스 입자에 흔입된다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 발명은 웹타이드를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이되, 상기 웹타이드는 a) 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, b) 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나, c) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편, 또는 d) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편의 아미노산 서열 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0030] 일 구현예에서, 본 발명은 웹타이드에 관한 것이되, 상기 웹타이드는 a) 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, b) 아미노산 서열의 적어도 60%에 걸쳐 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 적어도 하나, c) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 적어도 약 90% 동일성을 포함하는 면역원성 단편, 또는 d) 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 아미노산 서열의 적어도 60%를 포함하는 면역원성 단편의 아미노산 서열 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 MCV T 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이되, 상기 방법은 변형된 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) T 항원을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 T 항원은 천연 MCV T 항원의 적어도 하나의 종양원성 특징을 과괴하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.
- [0032] 일 구현예에서, 투여 방법은 전기천공 또는 주사 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0033] 일 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 MCV 관련된 병리를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이되, 상기 방법은 변형된 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) T 항원을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 T 항원은 천연 MCV T 항원의 적어도 하나의 종양원성 특징을 과괴하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.
- [0034] 일 구현예에서, 투여 방법은 전기천공 또는 주사 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0035] 일 구현예에서, MCV 관련된 병리는 MCV 감염 또는 머켈 세포 암종 중 적어도 하나이다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1A 내지 도 1B를 포함하는 도 1은 LTA_g 및 STAg의 개략도를 제공한다. 도 1A는 LTA_g 및 STAg의 종양원성 특징을 도시한다. 도 1B는 핵산 백신의 LTA_g 및 STAg의 디자인이 종양원성 특징을 과괴하기 위해 몇 개의 돌연변이를 포함한다는 것을 도시한다. ^{*}D44N-은 샤페론 단백질에 대한 결합을 차단하고; ^{*}W209A-는 hVam6p에 대한 결합을 차단하고; ^{*}E216K-는 Rb에 대한 결합을 차단하고, 형질전환을 방지하고; ^{*}L142A-는 PP2A에 대한 결합을 차

단하고; *91-95LKDY->AAAAA-는 Fbxw7에 대한 결합을 차단하고, 형질전환을 방지한다.

도 2A 내지 도 2B를 포함하는 도 2는 공통 LTAg 및 STAg의 개략도를 제공한다. 도 2A는 모든 이용가능한 NCBI LTAg 서열로부터 설계된 LTAg의 공통 서열의 다이어그램을 도시한다. 도 2B는 모든 이용가능한 NCBI STAg 서열로부터 설계된 STAg의 공통 서열의 다이어그램을 도시한다. 이를 항원 서열이 합성되고, 포유동물 발현 플라스미드로 클로닝되어, 생체내 합성 공통 항원의 발현을 위한 플라스미드 DNA 작제물이 생성되었다.

도 3은 시험관내에서 공통 MCC LTAg의 발현을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다. STAg를 표적화하는 효과적인 항체의 부족으로 인해 공통 MCC S태그의 발현이 검출되지 않았다

도 4A 내지 도 4B를 포함하는 도 4는 LTAg 및 STAg 단독으로 또는 조합하여 백신접종후 면역 반응의 유도를 입증하는 예시적인 실험 데이터를 제공한다. 도 4A는 실험 디자인을 도시한다. 마우스는 플라스미드 DNA에 이어서 0일째, 14일째에, 28일째에 근육내 전기천공을 받았다. 1주후, 비장세포를 분석을 위해 수집하였다. 4개의 마우스 그룹을 백신접종하였다: 그룹 1 - pVax- 빈 벡터 대조군; 그룹 2 - LTAg 백신; 그룹 3 - STAg 백신; 그룹 4 - 동일한 부위에 LTAg 및 STAg 백신. 도 4B는 LTAg 및 STAg 단독으로 또는 조합하여 백신접종 후 면역 반응의 유도를 나타내지만, 빈 대조군 벡터 (pVax) 백신접종후에는 그렇지 않음을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 이를 실험의 경우, 웨타이드는 돌연변이를 불활성화시키지 않으면서 해당하는 서열에 매칭되었다.

도 5A 내지 도 5B를 포함하는 도 5는 LTAg 및 STAg에 대한 면역우성 에피토프를 특징화하는 예시적인 실험 데이터를 제공한다. 도 5A는 LTAg 백신접종에 대한 면역우성 에피토프를 도시한다. 도 5B는 STAg 백신접종에 대한 면역우성 에피토프를 도시한다.

도 6은 인간 머켈 세포 암종 샘플에서 MCC 큰 T 절단의 정도 분석 결과를 도시한다. 데이터는 GenBank에서 42개의 큰 T 서열에서 컴파일링되었다.

도 7A 내지 도 7F를 포함하는 도 7은 LTAg 웨타이드로 5시간 동안 백신접종 및 자극 후 사이토카인에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 제공한다. 도 7A는 IFN γ 에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 7B는 TNF α 에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 7C는 IL-2에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 7D는 IFN γ 에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 7E는 TNF α 에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 7F는 IL-2에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다.

도 8은 LTAg 백신접종이 강력한 다작용성 CD8 T 세포를 유도함을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다.

도 9는 LTAg 백신접종이 강력한 다작용성 CD4 T 세포를 유도함을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다.

도 10은 CD107a, IFN γ 및 T-bet를 공동-발현하는 세포독성 잠재력을 갖는 CD8 T 세포를 유도함을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다.

도 11은 일차 항체로서 마우스 혈청을 사용하여 입증된, 큰 T 및 작은 T 항원 백신이 체액 반응을 생성함을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다.

도 12는 LTAg 백신이 유전자적으로 다양한, CD-1 교배 마우스에서 강력한 면역 반응을 유도함을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다.

도 13은 STAg 백신이 유전자적으로 다양한, CD-1 교배 마우스에서 면역 반응을 유도함을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 도시한다.

도 14A 내지 도 14F를 포함하는 도 14는 CD-1 교배 마우스에서의 백신접종 및 LTAg 웨타이드로 5시간 자극 후 사이토카인에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 제공한다. 도 14A는 IFN γ 에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 14B는 TNF α 에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 14C는 IL-2에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 14D는 IFN γ 에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 14E는 TNF α 에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 14F는 IL-2에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다.

도 15A 내지 도 15F를 포함하는 도 15는 CD-1 교배 마우스에서의 백신접종 및 STAg 웨타이드로 5시간 자극 후

사이토카인에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 입증하는 예시적인 실험 데이터를 제공한다. 도 15A는 IFN γ에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 15B는 TNF α에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 15C는 IL-2에 대한 CD8⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 15D는 IFN γ에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 15E는 TNF α에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다. 도 15F는 IL-2에 대한 CD4⁺ T 세포 반응의 수준을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

[0037] 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) 감염은 현재 46% 사망률을 갖는 머켈 세포 암종 (MCC)과 관련되어 있다.

[0039] 일 구현예에서, 본 발명은 MCV 및 MCC에 대한 핵산 백신을 포함한다. 일 구현예에서, 백신은 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 플라스미드를 포함한다. 일 구현예에서, 공통 MCV T 항원은 큰 T 항원 (LTAg)이다. 일 구현예에서, 공통 MCV T 항원은 작은 t 항원 (STAg)이다. 일 구현예에서, 공통 MCV T 항원은 천연 T 항원의 종양원성 특징을 파괴하는 돌연변이를 추가로 포함한다. 백신 후보로서, 향상된 DNA (DNA)-기반 플랫폼은 유전적 최적화 및 전달 기술에서 많은 이점을 제공한다. 이와 같이, 각각의 MCV T 항원은 유전자적으로-최적화되고, 변형된 포유동물 밸런 백터로 서브클로닝된 후, 그 다음 생체내 전기천공 (EP)을 사용하여 전달될 수 있다.

[0040] 합성 공통 MCV T 항원 작제물에 의한 백신접종이 강력한 면역 반응을 생성하기 때문에 전임상 설치류 연구에서의 백신접종은 매우 강력하였다.

[0041] 일부 구현예에서, 전략은 합성 공통 MCV T 항원에 대한 코딩 서열을 사용한다. LTAg 및 STAg에 대한 코딩 서열이 제공된다. 일부 구현예에서, 전략은 단일 합성 공통 MCV T 항원에 대한 코딩 서열을 사용한다. 일부 구현예에서, 전략은 다중 합성 공통 MCV T 항원에 대한 코딩 서열을 사용한다.

[0042] 백신의 후보로서, DNA 백신은 신속하고 값싼 고급-규모 생산, 실온에서의 안정성, 및 수송 용이성을 포함하여 다수의 이점을 나타내며, 이를 모두 경제적 및 지리학적 관점에서 이 플랫폼을 더욱 향상시킨다. 플라스미드의 합성 특성으로 인해, 항원 서열은 새로 출현한 균주에 반응하여 빠르게 및 용이하게 변형될 수 있고/있거나 추가의 백신 구성요소를 포함하도록 확장될 수 있다.

[0043] 플라스미드 DNA 백터 및 그것의 인코딩된 항원 유전자의 최적화는 생체내 면역원성을 증가시켰다. 백신접종 부위 내에서 짧은 방형과 전기 펄스를 사용하여 플라스미드를 일시적으로 투과된 세포로 유도하는 기술인, 생체내 전기천공에 의해 고도로-농축된 플라스미드 백신 제형이 투여될 때, 세포 흡수 및 후속적인 항원 발현이 실질적으로 증폭된다. 이론상, DNA 플라스미드의 각테일은 임의의 수의 가변성 항원에 대해 고도로-특화된 면역 반응을 지시하기 위해 조립될 수 있다. 면역은 종-특이적 사이토카인 유전자를 인코딩하는 플라스미드 분자 아쥬반트 뿐만 아니라 항원 아미노산 서열의 '공통-엔지니어링'과의 공동-전달에 의해 추가로 지향될 수 있어, 특정 균주에 대한 백신-유도된 면역을 편향시키는 것을 돋는다.

1. 정의.

[0045] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 당해 분야의 숙련자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충하는 경우에, 정의를 포함한 본 문서가 우선할 것이다. 바람직한 방법 및 물질은 아래에 기재되어 있지만, 본 명세서에서 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 본원에 언급된 모든 공보, 특히 출원, 특히 및 다른 참고문헌들은 전체적으로 참고로 편입되어 있다. 본원에 개시된 물질, 방법, 및 예는 단지 설명적이고 제한하려는 것은 아니다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "포함하다", "포함하는", "갖는", "가지고 있다", "할 수 있다", "함유하다" 및 이들의 변형은 추가의 행위 또는 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형 전환 문구, 용어들, 또는 단어들인 것으로 의도된다. 단수 형태는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 표현을 포함한다. 본 개시내용은 또한 명백하게 제시된지 여부에 관계없이, 본 명세서에 제시된 구현예 또는 요소를 "포함하는", "구성되는" 및 "본질적으로 구성되는" 다른 구현예를 고려한다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "아쥬반트"는 백신의 항원성을 향상시키기 위해 핵산 백신에 첨가된 임의의 분자를 의미할 수 있다.

[0048] "항체"는 Fab, F(ab')2, Fd, 및 단일 사슬 항체를 포함하는 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE, 또는 단편, 단

편 또는 이의 유도체의 항체, 디아바디, 이중특이적 항체, 이중작용성 항체 및 이의 유도체를 의미할 수 있다. 항체는 원하는 에피토프 또는 이로부터 유래된 서열에 대하여 충분한 결합 특이성을 나타내는 포유동물의 혈청 샘플로부터 단리된 항체, 다클론성 항체, 친화도 정제된 항체, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

- [0049] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이 "항체 단편" 또는 "항체의 단편"은 항원-결합 부위 또는 가변 영역을 포함하는 온전한 항체의 부분을 지칭한다. 상기 부분은 온전한 항체의 Fc 영역의 불변 중쇄 도메인(즉 항체 아이소타입에 따라 CH2, CH3, 또는 CH4)을 포함하지 않는다. 항체 단편의 예는 비제한적으로, Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab')2 단편, Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 단일-사슬 Fv (scFv) 분자, 단 하나의 경쇄 가변 도메인을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드, 경쇄 가변 도메인의 3개의 CDR을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드, 단 하나의 중쇄 가변 영역을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드, 및 중쇄 가변 영역의 3개의 CDR을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0050] "항원"은 숙주에서 면역 반응을 생성할 수 있는 능력을 갖는 단백질을 지칭한다. 항원은 항체에 의해 인식되고 결합될 수 있다. 항원은 신체 내부 또는 외부 환경에서 발생할 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "코딩 서열" 또는 "인코딩 핵산"은 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 (RNA 또는 DNA 분자)을 의미할 수 있다. 코딩 서열은 프로모터를 포함하는 조절 인자에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종료 신호 및 핵산이 투여되는 개체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함할 수 있다. 코딩 서열은 선택적으로 N 말단 메티오닌 또는 신호 웨بت이드 예컨대 IgE 또는 IgG 신호 웨بت이드를 인코딩하는 개시 코돈을 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "보체" 또는 "상보성"은 핵산이 산 분자의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick)(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 휴그스턴 염기 짹짓기를 의미할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0053] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "공통" 또는 "공통 서열"은 다중 서열 (예를 들어, 특정 바이러스 항원의 다중 서열)의 정렬 분석에 기초하여 구성된, 합성 뉴클레오타이드 서열, 또는 해당하는 폴리펩타이드 서열을 의미할 수 있다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "정전류"는 동일한 조직으로 전달되는 전기 펄스의 지속 기간 동안 조직 또는 상기 조직을 정의하는 세포에 의해 수신되거나 경험되는 전류를 정의한다. 전기 펄스는 본원에 기재된 전기천공 디바이스로부터 전달된다. 본원에 제공된 전기천공 디바이스는 바람직하게는 즉각적인 피드백을 갖는 피드백 요소를 갖기 때문에, 이 전류는 전기 펄스의 수명에 걸쳐 상기 조직에서 일정한 암페어 수로 유지된다. 피드백 요소는 펄스 지속 시간동안 조직 (또는 세포)의 저항을 측정하고, 전기천공 디바이스가 그것의 전기 에너지 출력을 변경 (예를 들어, 전압 증가)시켜 동일한 조직의 전류가 전기 펄스 전체에 걸쳐 일정하게 (마이크로초의 순서로), 및 펄스에서 펄스로 유지되도록 할 수 있다. 일부 구현예에서, 피드백 요소는 컨트롤러를 포함한다.
- [0055] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "전류 피드백" 또는 "피드백"은 교환가능하게 사용될 수 있고, 제공된 전기천공 디바이스의 활성 반응을 의미할 수 있으며, 이는 전극 사이의 조직에서 전류를 측정하는 단계 및 전류를 일정한 수준으로 유지하기 위해 이에 따라 EP 디바이스에 의해 전달되는 에너지 출력을 변경하는 단계를 포함한다. 이 일정한 수준은 펄스 시퀀스 또는 전기 치료를 개시하기 전에 사용자에 의해 사전설정된다. 그 내부의 전기 회로는 전극들 사이의 조직에서 전류를 계속해서 모니터링하고 모니터링된 전류 (또는 조직 내의 전류)를 사전설정 전류와 비교할 수 있고, 계속해서 에너지-출력 조정을 수행하여 모니터링된 전류를 사전설정 수준으로 유지할 수 있기 때문에, 피드백은 전기천공 구성요소, 예를 들어, 전기천공 디바이스의 컨트롤러에 의해 달성될 수 있다. 피드백 루프는 유사체 폐쇄된-루프 피드백이므로 즉각적일 수 있다.
- [0056] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "탈중앙화된 전류"는 본원에 기재된 전기천공 디바이스의 다양한 바늘 전극 어레이로부터 전달된 전류의 패턴을 의미할 수 있으며, 여기서 패턴은 전기천공된 조직의 임의의 영역에서 전기천공 관련된 열 스트레스의 발생을 최소화하거나, 바람직하게는 제거한다.
- [0057] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이 "전기천공," "전기-투과화," 또는 "전기-동력 향상" ("EP")은 생체막에서 혼미경적 경로 (기공)를 유도하기 위한 막관통 전기장 펄스의 사용을 지칭할 수 있고; 그것의 존재는 생체분자 예컨대 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온, 및 물이 세포막의 한 쪽에서 다른 쪽으로 통과할 수 있게 한다.
- [0058] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "내인성 항체"는 체액 면역 반응의 유도를 위해 효과적인 용량의 항원이 투여

되는 대상체에서 생성된 항체를 지칭할 수 있다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "피드백 기전"은 소프트웨어 또는 하드웨어 (또는 휴웨어)에 의해 수행되는 프로세스를 지칭할 수 있으며, 이 프로세스는 (에너지 펄스 전달 전, 동안, 및/또는 후에) 본 값, 바람직하게는 전류와 원하는 조직의 임피던스를 수신 및 비교하고, 전달된 에너지의 펄스를 조정하여 사전설정치를 달성한다. 피드백 기전은 유사체 페 루프 회로에 의해 수행될 수 있다.

[0060] "단편"은 전장 폴리펩타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열의 백분율을 의미할 수 있다. 단편은 친계 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열 또는 그것의 변이체의 전장의 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 또는 그 초과 퍼센트를 포함할 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "유전적 작제물"은 단백질, 예컨대 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 유전적 작제물은 또한, RNA를 전사하는 DNA 분자를 지칭할 수 있다. 코딩 서열은 프로모터를 포함하는 조절 인자에 작동가능하게 연결된 개시 및 종료 신호 및 핵산 분자가 투여되는 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현성 형태"는 개체의 세포내에 존재할 때 코딩 서열이 발현되도록 단백질을 인코딩하는 코딩 서열에 동작가능하게 연결된 필요한 조절 인자를 함유하는 유전자 작제물을 지칭한다.

[0062] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "동일한" 또는 "동일성"은 서열이 명시된 영역에 걸쳐 동일한 명시된 백분율의 잔기를 갖는 것을 의미할 수 있다. 백분율은 2개의 서열을 최적으로 정렬하고, 명시된 영역에 걸쳐 2개의 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 산출하고, 매칭된 위치의 수를 명시된 영역의 총 위치 수로 나눈 후 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 두 서열의 길이가 상이하거나 정렬이 하나 이상의 엇갈린 단부를 생성하고 명시된 비교 영역이 단일 서열만 포함한 경우 단일 서열의 잔기는 계산의 분모에 포함되지만 계산의 분자에는 포함되지 않는다. DNA 및 RNA를 비교할 때, 티민 (T) 및 우라실 (U)은 동등한 것으로 간주될 수 있다. 동일성은 수작업으로 또는 컴퓨터 서열 알고리즘 예컨대 BLAST 또는 BLAST 2.0를 사용하여 수행될 수 있다.

[0063] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "임피던스"는 피드백 기전을 논의할 때 사용될 수 있고, 옴의 법칙에 따라 전류 값으로 변환될 수 있으며, 따라서 사전설정된 전류와 비교할 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "면역 반응"은 제공된 백신을 통한 하나 이상의 공통 항원의 도입에 반응하여, 숙주의 면역계, 예를 들어 포유동물의 면역계의 활성화를 의미할 수 있다. 면역 반응은 세포 또는 체액 반응, 또는 둘 모두의 형태일 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 함께 공유 결합된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 단일 가닥의 묘사는 또한 상보성 가닥의 서열을 정의한다. 따라서, 핵산은 또한 도시된 단일 가닥의 상보성 가닥을 포함한다. 핵산의 많은 변이체는 주어진 핵산과 동일한 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 보체를 포함한다. 단일 가닥은 염격한 혼성화 조건하에서 표적 서열에 혼성화될 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 염격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 프로브를 포함한다.

[0066] 핵산은 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있거나, 또는 이중가닥 및 단일가닥 서열 모두의 일부를 함유할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA, RNA, 또는 하이브리드일 수 있으며, 여기서 핵산은 테옥시리보-뉴클레오타이드 및 리보-뉴클레오타이드의 조합, 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 잔틴 하이포잔틴, 이소시토신 및 이소구아닌을 포함하는 염기의 조합을 함유할 수 있다. 핵산은 화학 합성 방법 또는 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "작동가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있음을 의미할 수 있다. 프로모터는 그의 제어 하에 유전자의 5' (업스트림) 또는 3' (다운스트림)에 자리 잡을 수 있다. 프로모터와 유전자 사이의 거리는 그 프로모터와 프로모터가 유래된 유전자에서 제어하는 유전자 사이의 거리와 대략 동일할 수 있다. 당업계에서 알려진 바와 같이, 이 거리의 변동은 프로모터 기능의 손실없이 수용될 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "펩타이드", "단백질", 또는 "폴리펩타이드"는 연결된 아미노산 서열을 의미할

수 있으며, 천연, 합성, 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0069]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "프로모터"는 세포에서 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 향상시킬 수 있는 합성 또는 자연적으로-유래된 문자를 의미할 수 있다. 프로모터는 하나 이상의 특이적 전사 조절 서열을 포함하여 발현을 추가로 향상시키고/시키거나 그것의 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경시킬 수 있다. 프로모터는 또한, 원위 인핸서 또는 억제인자 요소를 포함할 수 있으며, 전사의 개시 부위로부터 수천 개 정도의 염기쌍에 위치할 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 발생하는 세포, 조직 또는 장기, 또는 발현이 발생하는 발달 단계에 관하여, 또는 외부 자극 예컨대 생리적 스트레스, 병원체, 금속 이온, 또는 유도체에 반응하여 구성적으로, 또는 차별적으로 유전자 구성요소의 발현을 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파아지 T7 프로모터, 박테리오파아지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 오퍼레이터-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 또는 SV40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함한다.

[0070]

"신호 웨타이드" 및 "선도 서열"은 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 본원에 제시된 단백질의 아미노 말단에 연결될 수 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 신호 웨타이드/선도 서열은 전형적으로 단백질의 편재화를 지시한다. 본원에 사용된 신호 웨타이드/선도 서열은 바람직하게는 그것이 생산된 세포로부터 단백질의 분비를 촉진한다. 신호 웨타이드/선도 서열은 세포로부터 분비될 때 종종 성숙 단백질로 지칭되는, 단백질의 나머지 부분으로부터 종종 절단된다. 신호 웨타이드/선도 서열은 단백질의 N 말단에 연결된다.

[0071]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "엄격한 혼성화 조건"은 예컨대 핵산의 복합 혼합물에서 제1 핵산 분자 (예를 들어, 프로브)가 제2 핵산 분자 (예를 들어, 표적)에 혼성화될 조건을 의미할 수 있다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 상이한 상황에서 상이할 것이다. 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 pH에서 특이적 서열에 대해 열 용융점 (T_m)보다 약 5~10°C 낮도록 선택될 수 있다. T_m 는 (정의된 이온 강도, pH, 및 핵산 농도 하에서) 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형에서 표적 서열에 혼성화되는 온도일 수 있다 (표적 서열이 과잉으로 존재하므로, T_m 에서, 프로브의 50%가 평형 상태에 있다). 엄격한 조건은 pH 7.0 내지 8.3에서 염 농도가 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온, 예컨대 약 0.01~1.0 M 나트륨 이온 농도 (또는 다른 염)이고, 온도가 짧은 프로브 (예를 들어, 약 10~50개의 뉴클레오타이드)의 경우 적어도 약 30°C이고, 긴 프로브 (예를 들어, 약 50개의 뉴클레오타이드 초과)의 경우 적어도 약 60°C인 조건일 수 있다. 엄격한 조건은 또한, 불안정화제 예컨대 포름아미드를 첨가하여 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화를 위해, 양성 신호는 배경 혼성화의 적어도 2 내지 10배일 수 있다. 예시적인 엄격한 혼성화 조건은 하기를 포함한다: 50% 포름아미드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42°C에서 인큐베이팅, 또는, 5x SSC, 1% SDS, 65°C에서 인큐베이팅, 0.2x SSC, 및 0.1% SDS, 65°C에서 세척.

[0072]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "대상체" 및 "환자"는 비제한적으로, 포유동물 (예를 들어, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아 퍼그, 고양이, 개, 랙트, 및 마우스, 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이, 예컨대 사이노몰구스 또는 붉은털원숭이, 침팬지, 등) 및 인간)를 포함하는 임의의 척추동물을 교환가능하게 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 인간 또는 비-인간일 수 있다.

[0073]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "실질적 상보성"은 제1 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 초과 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 영역에서 제2 서열의 보체와 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 2 개의 서열이 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화되는 것을 의미할 수 있다.

[0074]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 서열이 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, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 또는 그 초과 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 영역에서 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%이거나, 또는 핵산에 관하여, 제1 서열이 제2 서열의 보체와 실질적 상보성인 경우를 의미할 수 있다.

[0075]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "치료" 또는 "치료하는"은 질환을 예방, 억압, 억제 또는 완전히 제거하는 수단을 통해 질환으로부터 대상체를 보호하는 것을 의미할 수 있다. 질환을 예방하는 것은 질환의 개시 전에 대상체에게 본 발명의 백신을 투여하는 것을 포함한다. 질환을 억압하는 것은 본 발명의 백신을 질환의 유도 후 및

그것의 임상 출현 전에 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 질환을 억제하는 것은 본 발명의 백신을 질환의 임상 출현 후 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0076] 핵산과 관련하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "변이체"는 (i) 언급된 뉴클레오타이드 서열의 부분 또는 단편; (ii) 언급된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 부분의 보체; (iii) 언급된 핵산 또는 그것의 보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 엄격한 조건 하에서 언급된 핵산, 그것의 보체, 또는 서열 실질적으로 동일한 서열에 혼성화하는 핵산을 의미할 수 있다.

[0077] 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 웨타이드 또는 폴리웨타이드에 대한 "변이체". 변이체는 또한, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 아미노산 서열을 갖는 언급된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 아미노산을 유사한 특성 (예를 들어, 친수성, 및 충전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로 대체하는 것은 전형적으로 작은 변화를 수반하는 것으로 인식된다. 이들 작은 변화는 당업계에서 이해되는 바와 같이 아미노산의 소수성 지수를 고려함으로써 부분적으로 확인될 수 있다. Kyte 등, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). 아미노산의 소수성 지수(hydropathic index)는 그것의 소수성 및 전하의 고려에 기초한다. 유사한 소수성 지수의 아미노산이 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 유지할 수 있다는 것이 당업계에서 알려져 있다. 일 양태에서, ± 2 의 소수성 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 초래하는 치환을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 웨타이드의 맥락에서 아미노산의 친수성을 고려하면, 웨타이드의 가장 큰 국소 평균 친수성을 계산할 수 있는데, 이는 항원성 및 면역원성과 잘 관련이 있는 것으로 보고된 유용한 척도이다. 미국 특허 번호 4,554,101은 본 명세서에 참고로 완전하게 편입되어 있다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같이 생물학적 활성을, 예를 들어 면역원성을 보유하는 웨타이드를 초래할 수 있다. 치환은 서로 ± 2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값을 둘다 아미노산의 특정한 측쇄에 의해 영향을 받는다. 이러한 관찰과 일치하게, 생물학적 기능과 양립 가능한 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기, 및 다른 특성에 의해 드러난 바와 같이, 아미노산의 상대적 유사성, 및 특히 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다.

[0078] 변이체는 전체 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다. 변이체는 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "벡터"는 복제의 기원을 함유하는 핵산 분자를 의미할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 박테리오파아지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자가-복제 염색체와 벡터 또는 숙주 계놈으로 통합되는 벡터일 수 있다.

[0080] 본 명세서에서 수치 범위의 인용을 위해, 동일한 정도의 정밀도를 갖는 그 사이의 각각의 개재하는 번호가 명백하게 고려된다. 예를 들어, 6~9 범위의 경우, 6 및 9 이외에 숫자 7 및 8이 고려되고, 6.0~7.0 범위의 경우, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 및 7.0이 명백하게 고려된다.

2. 설명

[0082] 본 발명은 MCV T 항원을 인코딩하는 최적화된 공통 서열을 제공한다. 일 구현예에서, 최적화된 공통 서열에 의해 인코딩된 MCV T 항원은 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있다. 일 구현예에서, 최적화된 공통 서열에 의해 인코딩된 MCV T 항원은, 면역 반응이 유도될 수 있는 면역원으로서 특히 효과적인 에피토프(들)를 포함할 수 있다.

[0083] 최적화된 공통 서열은 2개 이상의 MCV T 항원으로부터 유래된 공통 서열일 수 있다. 최적화된 공통 서열은 개선된 발현에 대한 공통 서열 및/또는 변형(들)을 포함할 수 있다. 변형은 면역원성을 증가시키기 위해 코돈 최적화, RNA 최적화, 증가된 번역 개시를 위한 코작 서열의 첨가, 및/또는 면역글로불린 선도 서열의 첨가를 포함할 수 있다. 최적화된 공통 서열에 의해 인코딩된 MCV T 항원은 신호 웨타이드 예컨대 면역글로불린 신호 웨타이드, 예를 들어, 비제한적으로, 면역글로불린 E (IgE) 또는 면역글로불린 (IgG) 신호 웨타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 최적화된 공통 서열에 의해 인코딩된 항원은 혈구응집소 (HA) 태그를 포함할 수 있

다. 최적화된 공통 서열에 의해 인코딩된 항원은 상응하는 비-최적화된 항원보다 더 강한 세포 및/또는 체액 면역 반응을 유도하기 위해 설계될 수 있다.

[0084] MCV 감염을 갖는 유전자적으로 다양한 대상체에서 MCV에 대한 면역을 유도하기 위해 사용될 수 있는 MCV T 항원이 본 명세서에 제공된다. 일 구현예에서, 본 발명은 MCV T 항원에 대한 포유동물 면역 반응에서 생성될 수 있는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, MCV T 항원에 대한 포유동물 면역 반응에서 생성될 수 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0085] 일 구현예에서, MCV T 항원은 천연 MCV T 항원의 적어도 하나의 종양원성 특징을 감소시키거나 또는 파괴하기 위해 변형된다. 다양한 구현예에서, MCV T 항원은 CR1 결합, DnaJ 결합, 포파타제 pp2A-결합 결합, Rb 결합, ATPase 활성, 헬리카제 활성, 샤페론 단백질 결합, hVam6p 결합, Fbxw7 결합, 기원 결합, 및 형질전환 중 적어도 하나를 감소시키거나 파괴하기 위해 변형된다. 일 구현예에서, MCV T 항원은 천연 T 항원 서열에 대한 D44, W209, E216, L142, L91, K92, D93, Y94 또는 M95에서의 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서, MCV T 항원은 D44N 돌연변이, W209A, E216K 돌연변이, L142A 돌연변이, L91A 돌연변이, K92A 돌연변이, D93A 돌연변이, Y94A 돌연변이 및 M95A 돌연변이 중 적어도 하나를 포함한다. 일 구현예에서, MCV LTag는 D44N 돌연변이, W209A, 및 E216K 돌연변이 중 적어도 하나를 포함한다. 일 구현예에서, MCV LTag는 D44N 돌연변이, W209A, 및 E216K 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서, MCV STAg는 D44N 돌연변이, L142A 돌연변이, L91A 돌연변이, K92A 돌연변이, D93A 돌연변이, Y94A 돌연변이 및 M95A 돌연변이 중 적어도 하나를 포함한다. 일 구현예에서, MCV STAg는 D44N 돌연변이, L142A 돌연변이, L91A 돌연변이, K92A 돌연변이, D93A 돌연변이, Y94A 돌연변이 및 M95A 돌연변이를 포함한다.

[0086] MCV T 항원에 대한 공통 아미노산 서열은 서열번호:2, 서열번호:4, 및 이의 변이체 및 서열번호:2, 서열번호:4, 및 이의 변이체의 단편을 포함한다. 변형된 합성 공통 MCV LTag의 예시적인 아미노산 서열은 서열번호:2로서 제공된다. 변형된 합성 공통 MCV STAg의 예시적인 아미노산 서열은 서열번호:2로서 제공된다.

[0087] 일 구현예에서, 본 발명은 변형된 합성 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 변형된 합성 공통 MCV LTag를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, 서열번호:2를 인코딩하는 서열번호:1로서 제공된다. 일 구현예에서, 변형된 합성 공통 MCV STAg를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호:4를 인코딩하는 서열번호:3으로서 제공된다.

[0088] 다양한 구현예에서, 본 발명은 변형된 LTag와 변형된 STAg의 조합, 또는 이를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 조성물은 단일 핵산 분자 예컨대 단일 플라스미드의 복수의 복제물, 또는 2개 이상의 상이한 핵산 분자 예컨대 2개 이상의 상이한 플라스미드의 복수의 복제물을 포함할 수 있다.

[0089] 조성물은 다중 공통 MCV T 항원에 대한 코딩 서열을 함유하는 단일 핵산 분자, 예컨대 플라스미드를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 본 조성물은 MCV LTag 및 MCV STAg를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단일 핵산 분자를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 각각의 공통 MCV T 항원에 대한 각각의 코딩 서열은 별개의 플라스미드 상에 있다.

[0090] 따라서, 다중 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 조성물은 단일 플라스미드 상에 존재할 수 있을 수 있다. 일 구현예에서, 본 조성물은 단일 프로모터 하에 MCV LTag 및 MCV STAg를 인코딩하는 단일 플라스미드를 포함한다. 그와 같은 구현예에서, MCV LTag를 인코딩하는 서열 및 MCV STAg를 인코딩하는 서열은 융합 웨بت아이드 서열, 예를 들어 퓨린 절단 서열에 의해 연결될 수 있다. 퓨린 절단 부위에 의해 연결된 변형된 합성 공통 MCV LTag 및 MCV STAg를 포함하는 단일 작제물의 예시적인 아미노산 서열은 서열번호:6으로서 제공된다. 일 구현예에서, 퓨린 절단 서열에 의해 연결된 변형된 합성 공통 MCV LTag 및 MCV STAg를 인코딩하는 단일 뉴클레오타이드 서열은 서열번호:6을 인코딩하는 서열번호:5로서 제공된다.

[0091] 일 구현예에서, 최적화된 공통 인코딩된 MCV T 항원은 하나 이상의 조절 인자에 작동가능하게 연결된다. 일 구현예에서, 조절 인자는 선도 서열이다. 일 구현예에서, 선도 서열은 IgE 선도 서열이다. 일 구현예에서, IgE 선도 서열은 서열번호:7로 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 따라서 일 구현예에서, 본 발명은 서열번호:7로 제시된 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열에 관한 것이다. 일 구현예에서, 본 발명은 서열번호:7로 제시된 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이다.

- [0092] 일 구현예에서, 조절 인자는 개시 코돈이다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 5' 말단에서 개시 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된, 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5로 제시된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 동족체에 관한 것이다. 일 구현예에서, 본 발명은 N-말단에서 개시 코돈에 의해 인코딩된 아미노산 (예를 들어, 메티오닌)에 작동가능하게 연결된, 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 동족체에 관한 것이다.
- [0093] 일 구현예에서, 조절 인자는 적어도 하나의 정지 코돈이다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 3' 말단에서 적어도 하나의 정지 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5로 제시된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 동족체에 관한 것이다. 일 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 번역 종결의 효율을 증가시키기 위해 2개의 정지 코돈에 작동가능하게 연결된다.
- [0094] 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열을 갖는 웨타이드를 인코딩할 수 있다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5로 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 서열은 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 다른 구현예에서, 서열은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0095] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 DNA 서열로부터의 전사체인 RNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩하는 RNA 서열을 포함한다.
- [0096] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 전장 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자는 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6을 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자는 선택적으로 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 웨타이드를 인코딩하는 코딩 서열과 같은 신호 웨타이드를 포함할 수 있다.
- [0097] 공통-MCV T 항원은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열을 갖는 웨타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6으로 제시된 아미노산 서열의 전장에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0098] 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 면역원성 단편은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 전장의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 면역원성 단편은 예를 들어 면역글로불린 리더, 예컨대 IgE 리더와 같은 선도 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역원성 단편은 선도 서열이 없다.
- [0099] 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6의 면역원성 단편과 상동성인 아미노산 서열을 갖는 단백질의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 그와 같은 면역원성 단편은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6에 대해 95% 상동성인 단백질의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 구현예는 본 명세서의 공통 단백질의 면역원성 단편에 대해 96% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 구현예는 본 명세서의 공통 단백질의 면역원성 단편에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 구현예는 본 명세서의 공통 단백질의 면역원성 단편에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 구현예는 본 명세서의 공통 단백질의 면역원성 단편에 대해 99% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 면역원성 단편은 예를 들어 면역글로불린 리더, 예컨대 IgE 리더와 같은 선도 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역원성 단편은 선도 서열이 없다.
- [0100] 일 구현예에서, 핵산 분자의 면역원성 단편은 전장 최적화된 공통 MCV T 항원의 적어도 하나의 면역우성 또는

하위-면역우성 에피토프를 인코딩한다.

- [0101] 일부 구현예는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 전장의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함하는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 면역원성 단편에 관한 것이다. 면역원성 단편은 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5의 단편에 대해 적어도 96%, 적어도 97% 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성일 수 있다. 일부 구현예에서, 면역원성 단편은 선도 서열을 인코딩하는 서열, 예컨대 예를 들어 면역글로불린리더, 예컨대 IgE 리더를 포함한다. 일부 구현예에서, 단편은 선도 서열을 인코딩하는 코딩 서열이 없다.
- [0102] 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5에 대해 적어도 90% 상동성인 서열을 포함한다.
- [0103] 일 구현예에서, 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 공통 MCV T 항원 서열을 인코딩하는 RNA 서열을 포함한다. 예를 들어, 핵산은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 하나 이상을 인코딩하는 RNA 서열, 그것의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0104] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 MCV T 항원에서 코딩 서열의 N-말단 상의 IgE 선도 서열을 뺀 것을 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 핵산 분자는 코딩 서열의 N-말단에 부착되고 프로모터에 작동가능하게 연결된 IgE 선도 서열을 추가로 포함한다.
- [0105] 핵산 분자는 코딩 서열의 C-말단에 부착된 폴리아데닐화 서열을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 코돈 최적화된다.
- [0106] **백신 및 면역원성 조성물**
- [0107] 최적화된 공통 서열, 최적화된 공통-인코딩된 항원, 이의 단편, 그것의 변이체, 또는 이들의 조합을 포함하는 면역원성 조성물, 예컨대 백신이 제공된다. 면역원성 조성물은 MCV T 항원에 대한 면역원성 조성물이 투여된 대상체의 면역 반응을 상당히 유도할 수 있다. 백신은 복수의 핵산 분자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 백신은 치료적 또는 예방적 면역 반응을 유도하기 위해 제공될 수 있다.
- [0108] 면역원성 조성물은 DNA 백신, RNA 백신, 펩타이드 백신, 또는 조합 백신일 수 있다. 백신은 항원을 인코딩하는 최적화된 공통 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 DNA, RNA, cDNA, 그것의 변이체, 이의 단편, 또는 이들의 조합일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 또한 펩타이드 결합에 의해 항원에 연결된 링커, 리더, 또는 태그 서열을 인코딩하는 추가 서열을 포함할 수 있다. 펩타이드 백신은 항원, 그것의 변이체, 이의 단편, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 조합 DNA 및 펩타이드 백신은 상기에 기재된 최적화된 공통 뉴클레오타이드 서열 및 인코딩된 항원을 포함할 수 있다.
- [0109] 백신은 DNA 백신일 수 있다. DNA 백신은 US 특허 번호 5,593,972, 5,739,118, 5,817,637, 5,830,876, 5,962,428, 5,981,505, 5,580,859, 5,703,055, 및 5,676,594에 개시되어 있고, 이들은 본 명세서에 완전하게 참고로 편입되어 있다. DNA 백신은 염색체에 통합되는 것을 억제하는 요소 또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0110] 백신은 하나 이상의 MCV T 항원의 RNA일 수 있다. RNA 백신은 세포에 도입될 수 있다.
- [0111] 백신은 약독화 생백신, 항원을 전달하기 위해 재조합 벡터를 사용하는 백신, 서브유닛 백신, 및 당단백질 백신, 예를 들어, 비제한적으로, U.S. 특허 번호 : 4,510,245; 4,797,368; 4,722,848; 4,790,987; 4,920,209; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424; 5,225,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; 5,474,935; 5,482,713; 5,591,439; 5,643,579; 5,650,309; 5,698,202; 5,955,088; 6,034,298; 6,042,836; 6,156,319 및 6,589,529에 기재된 백신일 수 있고, 이를 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다.
- [0112] 본 발명의 백신은 백신 자체가 병 또는 사망을 유발하지 않도록 안정한 것과 같은 효과적인 백신에 필요한 특징을 가질 수 있고; 병으로부터 보호되고; 보호 T 세포 반응을 유도하고; 그리고 투여 용이성, 적은 부작용, 생물학적 안정성을 제공하고, 그리고 용량당 저비용을 제공한다.
- [0113] MCV에 대한 포유동물 면역 반응을 생성할 수 있는 면역원성 조성물이 본 명세서에 제공된다. 면역원성 조성물은 상기에 논의된 바와 같은 각각의 플라스미드를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 복수의 플라스미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 치료적 또는 예방적 면역 반응을 유도하기 위해 제공될 수 있다.

- [0114] 면역원성 조성물은 하나 이상의 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 핵산 분자를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 면역원성 조성물은 바람직하게는 플라스미드를 포함하는 조성물이다.
- [0115] 면역원성 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 부형제는 비히클, 아쥬반트, 캐리어, 또는 희석제와 같으느 기능적 분자일 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 부형제는 형질감염 촉진제일 수 있고, 이 촉진제는 계면 활성제, 예컨대 면역-자극 복합체 (ISCOMS), 프러운드 불완전한 아주반트, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 뮤라밀 웨بت아이드, 퀴논 유사체, 소포 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 하이알루론산, 지질, 리포좀, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중음이온, 다중양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 알려진 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다.
- [0116] 형질감염 촉진제는 다중음이온, 폴리-L-글루타메이트 (LGS), 또는 지질을 포함하는 다중음이온이다. 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트이고, 그리고 더 바람직하게는, 폴리-L-글루타메이트는 6 mg/ml 미만의 농도로 면역원성 조성물에 존재한다. 형질감염 촉진제는 또한, 계면 활성제 예컨대 면역-자극 복합체 (ISCOMS), 프러운드 불완전한 아주반트, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 뮤라밀 웨بت아이드, 퀴논 유사체 및 소포 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌을 포함할 수 있고, 그리고 하이알루론산은 또한, 유전적 작제물과 함께 투여되어 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역원성 조성물은 또한, 형질감염 촉진제 예컨대 지질, 레시틴 리포좀 또는 DNA-리포좀 혼합물 (참고 예를 들어 W09324640)으로서 당업계에서 알려진 다른 리포좀을 포함하는 리포좀, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중음이온, 다중양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 알려진 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 형질감염 촉진제는 다중음이온, 폴리-L-글루타메이트 (LGS)를 포함하는 다중음이온, 또는 지질이다. 면역원성 조성물 중 형질감염 제제의 농도는 4 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 0.750 mg/ml 미만, 0.500 mg/ml 미만, 0.250 mg/ml 미만, 0.100 mg/ml 미만, 0.050 mg/ml 미만, 또는 0.010 mg/ml 미만이다.
- [0117] 약제학적으로 허용가능한 부형제는 하나 이상의 아쥬반트일 수 있다. 아쥬반트는 동일하거나 대안적인 플라스미드로부터 발현되는 다른 유전자일 수 있거나 면역원성 조성물에서 상기의 플라스미드와 조합하여 단백질로서 전달될 수 있다. 하나 이상의 아쥬반트는 단백질 및/또는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 인코딩하는 핵산 분자일 수 있다: CCL20, α -인터페론 (IFN- α), β -인터페론 (IFN- β), γ -인터페론, 혈소판 유래된 성장인자 (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, 표피 성장 인자 (EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인 (CTACK), 상피 가슴샘-발현된 케모카인 (TECK), 점막-관련된 상피 케모카인 (MEC), IL-12, 결실된 신호 서열을 인코딩하는 신호 서열 또는 코딩 서열을 갖는 IL-15을 포함하고, 그리고 선택적으로 상이한 신호 웨بت아이드 예컨대 차이 신호 웨بت아이드를 인코딩하는 IgE 또는 코딩 서열로부터의 것 예컨대 하기로부터의 것을 포함하는 IL-15: IgE, IL-28, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, 돌연변이체 형태의 IL-18, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피성 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, 공기, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, 0x40, 0x40 리간드, NKG2D, 마이카, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이의 기능성 단편 또는 이들의 조합.
- [0118] 일부 구현예에서, 아쥬반트는 하나 이상의 단백질 및/또는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 인코딩하는 핵산 분자일 수 있다: CCL-20, IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, MEC 또는 RANTES. IL-12 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US1997/019502 및 상응하는 US 출원 일련 번호 08/956,865, 및 미국 출원 시리즈 번호 61/569600(2011년 12월 12일 출원)에 개시되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. IL-15 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US04/18962 및 상응하는 US 출원 일련 번호 10/560,650, 및 PCT 출원 번호 PCT/US07/00886 및 상응하는 U.S. 출원 일련 번호 12/160,766, 및 PCT 출원 번호 PCT/US10/048827에 개시되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. IL-28 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US09/039648 및 상응하는 U.S. 출원 일련 번호 12/936,192에 개시되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. RANTES 및 다른 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US1999/004332 및 상응하는 U.S. 출원 일련 번호 및 09/622452에 개시되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. RANTES 작제물 및 서열의 다른 예는 PCT 출원 번호 PCT/US11/024098에 개시되어 있고, 이는 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. RANTES 및 다른 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US1999/004332 및 상응하는 U.S. 출원 일련 번호 09/622452에 개시되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. RANTES 작제물 및 서열의 다

른 예는 PCT 출원 번호 PCT/US11/024098에 개시되어 있고, 이는 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. 케모카인 CTACK, TECK 및 MEC 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US2005/042231 및 상응하는 U.S. 출원 일련 번호 11/719,646에 개시되어 있고, 이를 각각은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. OX40 및 다른 면역조절물질의 예는 U.S. 출원 일련 번호 10/560,653에 개시되어 있고, 이는 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. DR5 및 다른 면역조절물질의 예는 아래에서 개시되어 있다: U.S. 출원 일련 번호 09/622452에 개시되어 있고, 이는 본 명세서에 참고로 편입되어 있다.

[0119] 면역원성 조성물은 참고로 완전히 편입되어 있는, 1994년 4월 1일에 출원된 U.S. 일련 번호 021,579에 기재된 바와 같은 유전적 백신 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0120] 면역원성 조성물은 약 1 나노그램 내지 100 밀리그램; 약 1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 또는 바람직하게는 약 0.1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 또는 더 바람직하게는 약 1 밀리그램 내지 약 2 밀리그램의 양으로 공통 항원 및 플라스미드를 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 250 마이크로그램, 약 100 내지 약 200 마이크로그램, 약 1 나노그램 내지 100 밀리그램; 약 1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 약 0.1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 약 1 밀리그램 내지 약 2 밀리그램, 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램, 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램, 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램, 약 1 내지 약 350 마이크로그램, 약 25 내지 약 250 마이크로그램, 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 공통 항원 또는 이의 플라스미드를 함유한다.

[0121] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 나노그램의 본 발명의 핵산 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 1, 5, 10, 15, 20, 25, 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, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 또는 1000 마이크로그램의 본 발명의 핵산 분자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 mg 또는 그 초과의 본 발명의 핵산 분자를 포함할 수 있다.

[0122] 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 나노그램의 본 발명의 핵산 분자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 1, 5, 10, 15, 20, 25, 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, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 또는 1000 마이크로그램의 본 발명의 핵산 분자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 mg의 본 발명의 핵산 분자를 포함할 수 있다.

[0123] 면역원성 조성물은 사용될 투여 방식에 따라 제형화될 수 있다. 주사가능 면역원성 조성물 약제학적 조성물은 멸균, 무발열원 및 무미립자일 수 있다. 등장성 제형 또는 용액이 사용될 수 있다. 등장성을 위한 첨가제는 염

화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨, 및 락토스를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 혈관수축제를 포함할 수 있다. 등장성 용액은 포스페이트 완충 식염수를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 젤라틴 및 알부민을 포함하는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 안정화제는, 제형이 연장된 기간 동안 실내 또는 주위 온도에서 안정되도록 할 수 있고, 그 예는 면역원성 조성물 제형에 대한 LGS 또는 다중양이온 또는 다중음이온이다.

[0124] 면역원성 조성물은 1주 초과 동안, 일부 구현예에서 2주 초과 동안, 일부 구현예에서 3주 초과 동안, 일부 구현예에서 4주 초과 동안, 일부 구현예에서 5주 초과 동안, 그리고 일부 구현예에서 6주 초과 동안 실온(25°C)에서 안정할 수 있다. 일부 구현예에서, 백신은 1 개월 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과, 5개월 초과, 6개월 초과, 7개월 초과, 8개월 초과, 9개월 초과, 10개월 초과, 11 개월 초과, 또는 12 개월 초과 동안 안정하다. 일부 구현예에서, 백신은 1년 초과, 2년 초과, 년 초과, 또는 5년 초과 동안 안정하다. 일 구현예에서, 면역원성 조성물은 냉동 (2-8°C) 하에서 안정하다. 따라서, 일 구현예에서, 면역원성 조성물은 냉동된 콜드-체인을 필요로 하지 않는다. 면역원성 조성물은, 그것의 의도한 용도를 허용하기 위해 (예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 생성하기 위해) 충분한 기간 동안 그것의 생물학적 활성을 유지하는 경우 안정하다. 예를 들어, 보관, 출하 등의 면역원성 조성물에 대해, 면역원성 조성물이 몇 개월 내지 몇 년 동안 안정적으로 유지되는 것이 바람직할 수 있다.

면역 반응

[0125] 면역원성 조성물은, 조성물이 투여된 상기 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있다. 유도된 면역 반응은 MCV T 항원에 대해 특이적일 수 있다. 유도된 면역 반응은 최적화된 공통-인코딩된 항원과 관련된 MCV T 항원과 반응할 수 있다. 다양한 구현예에서, 관련된 항원은 최적화된 공통-인코딩된 항원의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 항원을 포함한다. 다양한 구현예에서, 관련된 항원은 본 명세서에 개시된 최적화된 공통 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되니 항원을 포함한다.

[0126] 면역원성 조성물은 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 체액 면역 반응을 유도할 수 있다. 유도된 체액 면역 반응은 MCV T 항원에 대해 특이적일 수 있다. 유도된 체액 면역 반응은 최적화된 공통-인코딩된 항원과 관련된 MCV T 항원과 반응할 수 있다. 체액 면역 반응은 약 1.5-배 내지 약 16-배, 약 2-배 내지 약 12-배, 또는 약 3-배 내지 약 10-배까지 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 유도될 수 있다. 체액 면역 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 3.5-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 4.5-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 5.5-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 15.5-배, 또는 적어도 약 16.0-배까지 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 유도될 수 있다.

[0127] 면역원성 조성물에 의해 유도된 체액 면역 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 증가된 수준을 포함할 수 있다. 이들 IgG 항체는 최적화된 공통 항원과 유전자적으로 관련된 MCV T 항원에 대해 특이적일 수 있다. 이들 IgG 항체는 최적화된 공통 항원과 유전자적으로 관련된 MCV T 항원과 반응할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 수준은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 약 1.5-배 내지 약 16-배, 약 2-배 내지 약 12-배, 또는 약 3-배 내지 약 10-배까지 증가될 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 수준은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 3.5-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 4.5-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 5.5-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 15.5-배, 또는 적어도 약 16.0-배까지 증가될 수 있다.

[0128] 면역원성 조성물은 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 세포 면역 반응을 유도할 수 있다. 유도 세포 면역 반

응은 최적화된 공통-인코딩된 항원과 관련된 MCV T 항원에 대해 특이적일 수 있다. 유도 세포 면역 반응은 최적화된 공통-인코딩된 항원과 관련된 MCV T 항원과 반응할 수 있다. 유도 세포 면역 반응은 CD8⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 유발된 CD8⁺ T 세포 반응은 최적화된 공통 항원과 유전자적으로 관련된 MCV T 항원과 반응할 수 있다. 유발된 CD8⁺ T 세포 반응은 다작용성일 수 있다. 유도 세포 면역 반응은 CD8⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있고 상기 CD8⁺ T 세포는 인터페론-감마 (IFN-γ), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 인터류킨-2 (IL-2), 또는 IFN-γ 와 TNF-α 의 조합을 생산한다.

[0130] 유도 세포 면역 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 증가된 CD8⁺ T 세포 반응을 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD8⁺ T 세포 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 약 2-배 내지 약 30-배, 약 3-배 내지 약 25-배, 또는 약 4-배 내지 약 20-배까지 증가될 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD8⁺ T 세포 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 16.0-배, 적어도 약 17.0-배, 적어도 약 18.0-배, 적어도 약 19.0-배, 적어도 약 20.0-배, 적어도 약 21.0-배, 적어도 약 22.0-배, 적어도 약 23.0-배, 적어도 약 24.0-배, 적어도 약 25.0-배, 적어도 약 26.0-배, 적어도 약 27.0-배, 적어도 약 28.0-배, 적어도 약 29.0-배, 또는 적어도 약 30.0-배까지 증가될 수 있다.

[0131] 유도 세포 면역 반응은 MCV T 항원에 대해 반응성인 CD107a/IFN-γ/T-bet 삼중-양성 CD8 T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD107a/IFN-γ/T-bet 삼중-양성 CD8 T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배, 또는 20-배까지 증가될 수 있다.

[0132] 유도 세포 면역 반응은 MCV T 항원에 대해 반응성인 CD107a/IFN-γ 이중-양성 CD8 T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD107a/IFN-γ 이중-양성 CD8 T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 또는 14-배까지 증가될 수 있다.

[0133] 면역원성 조성물에 의해 유도된 세포 면역 반응은 CD4⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 유발된 CD4⁺ T 세포 반응은 최적화된 공통 항원과 유전자적으로 관련된 MCV T 항원과 반응할 수 있다. 유발된 CD4⁺ T 세포 반응은 다작용성일 수 있다. 유도 세포 면역 반응은 CD4⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있고, 상기 CD4⁺ T 세포는 IFN-γ, TNF-α, IL-2, 또는 IFN-γ 와 TNF-α 의 조합을 생산한다.

[0134] 유도 세포 면역 반응은 IFN-γ를 생성하는 CD4⁺ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD4⁺IFN-γ⁺ T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배, 또는 20-배까지 증가될 수 있다.

[0135] 유도 세포 면역 반응은 TNF-α를 생성하는 CD4⁺ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD4⁺TNF-α⁺ T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배, 20-배, 21-배, 또는 22-배까지 증가될 수 있다.

[0136] 유도 세포 면역 반응은 IFN-γ 및 TNF-α 둘 모두를 생성하는 CD4⁺ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면

역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD4⁺IFN-γ⁺TNF-α⁺의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체 또는 비-최적화된 MCV T 항원이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 2.5-배, 3.0-배, 3.5-배, 4.0-배, 4.5-배, 5.0-배, 5.5-배, 6.0-배, 6.5-배, 7.0-배, 7.5-배, 8.0-배, 8.5-배, 9.0-배, 9.5-배, 10.0-배, 10.5-배, 11.0-배, 11.5-배, 12.0-배, 12.5-배, 13.0-배, 13.5-배, 14.0-배, 14.5-배, 15.0-배, 15.5-배, 16.0-배, 16.5-배, 17.0-배, 17.5-배, 18.0-배, 18.5-배, 19.0-배, 19.5-배, 20.0-배, 21-배, 22-배, 23-배 24-배, 25-배, 26-배, 27-배, 28-배, 29-배, 30-배, 31-배, 32-배, 33-배, 34-배, 또는 35-배까지 증가될 수 있다.

[0137] 면역원성 조성물은 상이한 조직 예컨대 근육 또는 피부에 투여될 때 면역 반응을 추가로 유도할 수 있다. 면역원성 조성물은 전기천공, 또는 주사를 통해, 또는 피하로, 또는 근육내로 투여될 때 면역 반응을 추가로 유도할 수 있다.

[0138] 벡터

[0139] 상기 기재된 뉴클레오타이드 작제물은 하나 이상의 벡터에 배치될 수 있다. 하나 이상의 벡터는 복제의 기원을 함유할 수 있다. 하나 이상의 벡터는 플라스미드, 박테리오파아지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 하나 이상의 벡터는 자가-복제 추가의 염색체 벡터, 또는 호스트 계놈으로 통합되는 벡터일 수 있다.

[0140] 벡터는 비제한적으로, 플라스미드, 발현 벡터, 재조합 바이러스, 임의의 형태의 재조합 "네이키드 DNA" 벡터, 및 등을 포함한다. "벡터"는 세포를 감염, 형질감염, 일시적으로 또는 영구적으로 형질도입할 수 있는 핵산을 포함한다. 벡터는 네이키드 핵산이거나 단백질 또는 지질과 복합체를 이룬 핵산일 수 있음을 인식할 것이다. 벡터는 선택적으로는 바이러스 또는 박테리아 핵산 및/또는 단백질, 및/또는 멤브레인 (예를 들어, 세포막, 바이러스 지질 외피, 등)을 포함한다. 벡터는 DNA의 단편이 부착되어 복제될 수 있는 레플리콘 (예를 들어, RNA 레플리콘, 박테리오파아지)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 벡터는 RNA, 자율적 자가-복제 원형 또는 선형 DNA 또는 RNA (예를 들어, 플라스미드, 바이러스 등, 예를 들어, 미국 특히 번호 5,217,879 참고)를 포함하지만, 이에 제한되지 않으며, 발현 및 비-발현 플라스미드를 모두 포함한다. 재조합 미생물 또는 세포 배양이 "발현 벡터"를 호스팅하는 것으로 기재되는 경우, 이는 추가의-염색체 원형 및 선형 DNA 및 숙주 염색체(들)에 편입된 DNA를 모두 포함한다. 벡터가 숙주세포에 의해 유지되는 경우, 벡터는 유사분열 동안 세포에 의해 자율적 구조로서 안정적으로 복제될 수 있거나 숙주의 계놈 내에 편입되어 있다.

[0141] 하나 이상의 벡터는 발현 작제물일 수 있으며, 이는 일반적으로 특이 유전자를 표적 세포 내로 도입하는데 사용되는 플라스미드이다. 발현 벡터가 세포 내부에 있으면, 유전자에 의해 인코딩된 단백질은 세포의-전사 및 번역 기계장치 리보솜 복합체에 의해 생산된다. 플라스미드는 인핸서 및 프로모터 영역으로서 작용하고 발현 벡터 상에 보유된 유전자의 효율적인 전사로 이어지는 조절 서열을 함유하도록 빈번하게 조작된다. 본 발명의 벡터는 다양한 안정한 메신저 RNA, 및 따라서 단백질을 발현시킨다.

[0142] 벡터는 발현 신호 예컨대 강한 프로모터, 강한 종료 코돈, 프로모터 및 클로닝된 유전자 사이의 거리 조정, 및 전사 종결 서열 및 PTIS (휴대용 번역 개시 서열)의 삽입을 가질 수 있다.

[0143] (1) 발현 벡터

[0144] 하나 이상의 벡터는 원형 플라스미드 또는 선형 핵산일 수 있다. 원형 플라스미드 및 선형 핵산은 적절한 대상세포에서 특정 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시할 수 있다. 재조합 핵산 작제물을 포함하는 하나 이상의 벡터는 키메라일 수 있으며, 이는 그것의 구성요소 중 적어도 하나가 그것의 다른 구성요소 중 적어도 하나에 대해 이종성임을 의미한다.

[0145] (2) 플라스미드

[0146] 하나 이상의 벡터는 플라스미드일 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 작제물로 세포를 형질감염시키는데 유용할 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 작제물을 상기 대상체로 도입하는데 유용할 수 있다. 플라스미드는 또한 조절 서열을 포함할 수 있으며, 이는 플라스미드가 투여되는 세포에서 유전자 발현에 매우 적합할 수 있다.

[0147] 플라스미드는 또한 플라스미드를 염색체외로 유지하고 세포에서 플라스미드의 다중 복제본을 생성하기 위해, 포유동물 복제의 기원을 포함할 수 있다. 플라스미드는 Invitrogen (San Diego, CA)의 pVAX1, pCEP4 또는 pREP4일 수 있으며, 이는 앱슈타인 바르 바이러스 복제 기원 및 핵 항원 EBNA-1 코딩 영역을 포함할 수 있으며, 이는 통합없이 높은 복제 에피솜 복제를 생성할 수 있다. 플라스미드의 콜격은 pAV0242일 수 있다. 플라스미드는 복제 결합있는 아데노바이러스 유형 5 (Ad5) 플라스미드일 수 있다.

[0148] 플라스미드는 pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있으며, 이는 에스케리치아 콜라이 (E.콜라이)에서 단백질 생산을 위해 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한 pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있으며, 이는 효모의 사카로마이세스 세레비지애 균주에서 단백질 생산을 위해 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한 MAXBACTM 완전 배클로바이러스 발현 시스템 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있으며, 이는 곤충 세포에서 단백질 생산을 위해 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한, pcDNA1 또는 pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있으며, 이는 포유동물 세포 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 단백질 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0149] (3) RNA

[0150] 일 구현예에서, 핵산은 RNA 분자이다. 일 구현예에서, RNA 분자는 본원에 기재된 DNA 서열로부터 전사된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, RNA 분자는 서열번호:1, 서열번호:3 또는 서열번호:5 중 하나와 적어도 90% 상동성인 DNA 서열, 또는 그것의 변이체 또는 이의 단편에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호:2, 서열번호:4 또는 서열번호:6 중 하나와 적어도 90% 상동성인 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 DNA 서열 또는 그것의 변이체 또는 이의 단편에 의해 전사된 RNA 서열을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 MCV T 항원을 인코딩하는 RNA 분자를 제공한다. RNA는 플러스-가닥일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, RNA 분자는 임의의 개재하는 복제 단계를 예컨대 역전사를 필요로 하지 않으면서 세포에 의해 번역될 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자는 5' 캡 (예를 들어 7-메틸구아노신)을 가질 수 있다. 이 캡은 RNA의 생체내 번역을 향상시킬 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자의 5' 뉴클레오타이드는 5' 삼인산기를 가질 수 있다. 캡핑된 RNA에서, 이는 5' 내지-5' 브릿지를 통해 7-메틸구아노신에 연결될 수 있다. RNA 분자는 3' 폴리-A 테일을 가질 수 있다. 또한, 그것의 3' 말단 부근에 폴리-A 중합효소 인식 서열 (예를 들어 AAUAAA)을 포함할 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자는 단일-가닥일 수 있다. 본 발명에 유용한 RNA 분자는 합성 RNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 분자는 네이키드 RNA 분자이다. 일 구현예에서, RNA 분자는 벡터내에 포함된다.

[0151] 일 구현예에서, RNA는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 일 구현예에서, 5' UTR은 길이가 0 내지 3000개의 뉴클레오타이드이다. 코딩 영역에 첨가된 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR을 위한 프라이머를 설계하는 것을 비제한적으로 포함하는 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 이 접근법을 사용하여, 당해 분야의 숙련가는 전사된 RNA의 형질감염후 최적의 번역 효율을 달성하는데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다.

[0152] 5' 및 3' UTR은 관심 유전자에 대한 자연 발생, 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열은 UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머에 포함시킴으로써, 또는 템플레이트의 임의의 다른 변형에 의해 첨가될 수 있다. 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변경시키는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열의 AU-풍부 요소는 RNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3' UTR은 당해 기술에 공지되어 있는 UTR의 특성에 기초하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.

[0153] 일 구현예에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 코작 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 첨가될 때, 공통 코작 서열은 5' UTR 서열을 첨가함으로써 재설계될 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 모든 RNA에 필요한 것으로 보이지 않는다. 많은 RNA에 대한 코작 서열에 대한 요건은 당해 기술에 공지되어 있다. 다른 구현예에서, 5' UTR은 RNA 게놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 구현예에서, RNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 3' 또는 5' UTR에 다양한 뉴클레오타이드 유사체가 사용될 수 있다.

[0154] 일 구현예에서, RNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역 개시 및 RNA의 안정성을 결정하는 5' 말단의 캡 및 3' 폴리(A) 테일 둘다를 갖는다.

[0155] 일 구현예에서, RNA는 뉴클레오사이드-변형된 RNA이다. 뉴클레오사이드-변형된 RNA는 예를 들어, 안정성 증가, 선천적 면역원성이 낮거나 부재함, 및 향상된 번역을 포함하는, 비-개질된 RNA에 비해 특정 이점을 갖는다.

[0156] (4) 원형 및 선형 벡터

[0157] 하나 이상의 벡터는 원형 플라스미드일 수 있으며, 이는 세포 게놈 내로의 통합에 의해 표적 세포를 형질전환시킬 수 있거나 염색체 외로 존재할 수 있다 (예를 들어, 복제 기원을 갖는 자율적 복제 플라스미드). 벡터는 pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 재조합 핵산 작제물에 의해 인코딩된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리

펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

[0158] 또한, 전기천공을 통해 대상체에게 효율적으로 전달될 수 있고 재조합 핵산 작제물에 의해 인코딩된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 선형 핵산, 또는 선형 발현 카세트 ("LEC")가 또한 본원에 제공된다. LEC는 임의의 포스페이트 골격이 결여된 임의의 선형 DNA일 수 있다. LEC는 임의의 항생제 내성 유전자 및/또는 포스페이트 골격을 함유하지 않을 수 있다. LEC는 원하는 유전자 발현과 관련없는 다른 뉴클레오타이드 서열을 함유하지 않을 수 있다.

[0159] LEC는 선형화될 수 있는 임의의 플라스미드로부터 유래될 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 작제물에 의해 인코딩된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수 있다. 플라스미드는 pNP (Puerto Rico/34) 또는 pM2 (New Caledonia/99)일 수 있다. 플라스미드는 WLV009, pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 재조합 핵산 작제물에 의해 인코딩된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

[0160] LEC은 pcrM2일 수 있다. LEC은 pcrNP일 수 있다. pcrNP 및 pcrMR은 각각 pNP (Puerto Rico/34) 및 pM2 (New Caledonia/99)로부터 유래될 수 있다.

(5) 바이러스 벡터

[0162] 일 구현예에서, 본 발명의 핵산을 세포로 전달할 수 있는 바이러스 벡터가 본원에 제공된다. 발현 벡터는 바이러스 벡터 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Sambrook 등 (2001), 및 Ausubel 등 (1997), 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 비제한적으로, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함한다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적 복제의 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선별 마커를 함유한다. (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193 참고). 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는, 포유동물, 예를 들어, 인간 세포에 유전자를 삽입하기 위해 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련된 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참고한다.

(6) 벡터의 제조 방법

[0164] 재조합 핵산 작제물이 배치된 하나 이상의 벡터를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 최종 서브클로닝 단계 후, 벡터는 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 대규모 발효 탱크에서 세포 배양물을 접종하는데 사용될 수 있다.

[0165] 다른 구현예에서, 최종 서브클로닝 단계 후, 벡터는 하나 이상의 전기천공 (EP) 디바이스와 함께 사용될 수 있다. EP 디바이스는 아래에 더 상세히 기재되어 있다.

[0166] 하나 이상의 벡터는 알려진 디바이스 및 기술의 조합을 사용하여 제형화되거나 제조될 수 있지만, 바람직하게는 2007년 5월 23일 제출되고 라이센싱된, 동시계속 미국 출원 미국 일련 번호 60/939,792에 기재된 플라스미드 제조 기술을 사용하여 제조된다. 일부 예에서, 본원에 기재된 DNA 플라스미드는 10 mg/mL 이상의 농도로 제형화될 수 있다. 제조 기술은 또한 2007년 7월 3일 허여된 라이센싱된 특허인 미국 특허 번호 7,238,522에 기재된 것을 포함하여, 미국 일련 번호 60/939792에 기재된 것 외에, 당해 분야의 숙련가에게 통상적으로 알려져 있는 다양한 디바이스 및 프로토콜을 포함하거나 통합한다. 상기-언급된 출원 및 미국 특허 일련 번호 60/939,792 및 미국 특허 번호 7,238,522는 각각 그 전체가 본 명세서에 편입되어 있다.

다중 벡터

[0168] 면역원성 조성물은 단일 플라스미드와 같은 단일 핵산 분자의 복수의 복제본, 또는 둘 이상의 상이한 핵산 분자 예컨대 둘 이상의 상이한 플라스미드의 복수의 복제본을 포함할 수 있다. 예를 들어 면역원성 조성물은 복수의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 상이한 핵산 분자를 포함할 수 있다. 그와 같은 조성물은 복수의 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 상이한 플라스미드를 포함할 수 있다.

[0169] 면역원성 조성물은 MCV T 항원에 대한 코딩 서열을 집합적으로 함유하는 핵산 분자, 예컨대 플라스미드를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 다중 항원에 대한 코딩 서열을 집합적으로 함유하는 핵산 분자, 예컨대 플라스미드를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 항원은 MCV T 항원 및 하나 이상의 추가의 암 항원이다. 면역원성 조성물은 하나 이상의 MCV T 항원 및 하나 이상의 암 항원에 대한 코딩 서열을 집합적으로 함유하는 핵산 분자, 예

컨대 플라스미드를 포함할 수 있다.

[0170] 암 항원

면역원성 조성물은 종양 관련된 병리를 치료 또는 예방하기 위해, 하나 이상의 암 항원 예컨대 WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, 개체특이형, MAGE A3, p53 (비-돌연변이체), NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras-돌연변이체, gp100, p53 돌연변이체, 프로테이나제 3 (PR1), Bcr-ab1, 티로시나제, 서바이빈, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG, NA17, PAX3, ALK, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, 폴리시알산, MYCN, TRP-2, RhoC, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔린, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3 강글리오사이드, BORIS, Tn, GlobobH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, 탄산탈수소효소 IX, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, 정자 섬유질 외피 단백질, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1 (프로타민 2), MAD-CT-2, 및 FOS-관련된 항원 1을 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 종양 관련된 병리를 치료 또는 예방하기 위한 최적화된 공통 인코딩된 MCV T 항원과 함께 하나 이상의 암 항원 WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, 개체특이형, MAGE A3, p53 (비-돌연변이체), NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras-돌연변이체, gp100, p53 돌연변이체, 프로테이나제 3 (PR1), Bcr-ab1, 티로시나제, 서바이빈, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG, NA17, PAX3, ALK, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, 폴리시알산, MYCN, TRP-2, RhoC, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔린, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3 강글리오사이드, BORIS, Tn, GlobobH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, 탄산탈수소효소 IX, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, 정자 섬유질 외피 단백질, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1 (프로타민 2), MAD-CT-2, 및 FOS-관련된 항원을 추가로 조합할 수 있다. 암 항원의 다른 조합도 또한 종양 관련된 병리를 치료 또는 예방하기 위해 적용될 수 있다.

[0172] 방법

본원에 기재된 하나 이상의 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여함으로써, 투여를 필요로 하는 대상체에서 MCV 관련된 질환을 치료, 보호, 및/또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 대상체에 면역원성 조성물의 투여는 대상체에서 면역 반응을 유도하거나 유발할 수 있다. 유도된 면역 반응은 질환, 예를 들어, MCV 감염 또는 MCV 감염과 관련된 MCC를 치료, 예방 및/또는 보호하는데 사용될 수 있다.

MCV 또는 MCC에 대해 특히 효과적인 에피토프를 포함하여, 면역 반응이 유도될 수 있는 공통 항원의 유전적 작제물 및 단백질을 제공하기 위해 면역원성 조성물을 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 면역원성 조성물 또는 백신접종을 전달하는 방법은 치료적 및 예방적 면역 반응을 유도하기 위해 제공될 수 있다. 백신접종 과정은 포유동물에서 MCV 또는 MCC에 대한 면역 반응을 생성할 수 있다. 면역원성 조성물은 포유동물의 면역계의 활성을 조절하고, 면역 반응을 향상시키기 위해 개체에게 전달될 수 있다. 면역원성 조성물의 전달은 세포에서 발현되고 세포의, 체액, 또는 세포 및 체액 반응을 인식하고 유도하는 세포의 표면으로 전달되는 핵산 분자로서 공통 항원의 형질감염일 수 있다. 면역원성 조성물의 전달은 포유동물에게 상기에 논의된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여함으로써 MCV 또는 MCC에 대해 포유동물에서 면역 반응을 유도하거나 유발하기 위해 사용될 수 있다.

면역원성 조성물 및 플라스미드를 포유동물의 세포 내로 전달할 때, 형질감염된 세포는 면역원성 조성물로부터 주사된 각각의 플라스미드에 대한 공통 항원을 발현하고 분비할 것이다. 이들 단백질은 면역계에 의해 외래물질로 인식될 것이며, 이들에 대해 항체가 만들어질 것이다. 이들 항체는 면역계에 의해 유지될 것이며, MCV에 의한 후속적인 감염에 대한 효과적인 반응을 허용할 것이다.

면역원성 조성물은 포유동물에 투여되어, 포유동물에서 면역 반응을 유도할 수 있다. 포유동물은 인간, 영장류, 비-인간 영장류, 암소, 소, 양, 염소, 영양, 들소, 물 벼랄로, 들소, 솟과동물, 사슴, 고슴도치, 코끼리, 라마, 알파카, 마우스, 랙트, 및 닭일 수 있다.

유도된 면역 반응은 유도된 체액 면역 반응 및/또는 유도 세포 면역 반응을 포함할 수 있다. 체액 면역 반응은 약 1.5-배 내지 약 16-배, 약 2-배 내지 약 12-배, 또는 약 3-배 내지 약 10-배까지 유도될 수 있다. 유도 세포 면역 반응은 CD8⁺ T 세포 반응을 포함할 수 있으며, 이는 약 2-배 내지 약 30-배, 약 3-배 내지 약 25-배, 또는 약 4-배 내지 약 20-배까지 유도된다.

면역원성 조성물 용량은 1 μ g 내지 10 mg 활성 구성요소/kg 체중/시간일 수 있으며, 20 μ g 내지 10 mg 구성요소/kg 체중/시간일 수 있다. 면역원성 조성물은 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, 또는 31일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료를 위한

면역원성 조성물 용량의 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회일 수 있다.

[0179] 면역원성 조성물은 약제학적 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려진 표준 기술에 따라 제형화될 수 있다. 그와 같은 조성물은 특정한 대상체의 연령, 성별, 중량, 및 상태, 및 투여 경로와 같은 인자를 고려하여 의료 분야의 숙련가들에게 잘 알려진 투약량 및 기술로 투여될 수 있다.

[0180] 면역원성 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다. 예방적 투여에서, 면역원성 조성물은 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 치료적 용도에서, 면역원성 조성물은 치료적 효과를 유도하기에 충분한 양으로 투여를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 이를 달성하기에 충분한 양은 "치료적으로 효과적인 용량"으로 정의된다. 이 용도에 효과적인 양은 예를 들어, 투여되는 면역원성 조성물 레지멘의 특정한 조성물, 투여 방식, 질환의 단계 및 중증도, 대상체의 일반적인 건강 상태, 및 처방의의 판단에 좌우될 것이다.

[0181] 면역원성 조성물은 Donnelly 등 (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner 등 (1996년 12월 3일 허여된 미국 특허 번호 5,580,859); Felgner (1997년 12월 30일 허여된 미국 특허 번호 5,703,055); 및 Carson 등 (1997년 10월 21일 허여된 미국 특허 번호 5,679,647)에 기재된 바와 같이 당해 분야에서 잘 알려진 방법에 의해 투여될 수 있으며, 이들 모두의 내용은 본 명세서에 참고로 전체적으로 편입되어 있다. 면역원성 조성물의 DNA는 예를 들어, 백신 건을 사용하여 개체에 투여될 수 있는 입자 또는 비드로 복합체화될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 생리적으로 허용가능한 화합물을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 담체의 선택이 예를 들어, 발현 베터의 투여 경로에 의존한다는 것을 알고 있을 것이다.

[0182] 면역원성 조성물은 다양한 경로를 통해 전달될 수 있다. 전형적인 전달 경로는 비경구 투여, 예를 들어, 진피내, 근육내 또는 피하 전달을 포함한다. 다른 경로는 경구 투여, 비강내, 및 질내 경로를 포함한다. 면역원성 조성물의 DNA의 경우, 특히, 면역원성 조성물은 개체의 조직의 틈새 공간으로 전달될 수 있다(Felgner 등, 미국 특허 번호 5,580,859 및 5,703,055, 이들의 내용은 모두 본 명세서에 참고로 전체적으로 편입되어 있음). 면역원성 조성물은 또한 근육에 투여될 수 있거나, 진피내 또는 피하 주사, 또는 경피로, 예컨대 이온침투요법에 의해 투여될 수 있다. 면역원성 조성물의 표피 투여도 또한 이용될 수 있다. 표피 투여는 자극제에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 표피의 최외층을 기계적으로 또는 화학적으로 자극하는 것을 포함할 수 있다 (Carson 등, 미국 특허 번호 5,679,647, 이들의 내용은 본 명세서에 참고로 전체적으로 편입되어 있음).

[0183] 면역원성 조성물은 또한 비강을 통한 투여를 위해 제형화될 수 있다. 담체가 고체인, 비강 투여에 적합한 제형은 코담배가 취해지는 방식으로, 즉, 코 가까이에 있는 분말 용기로부터 비강을 통한 신속한 흡입에 의해, 투여되는 약 10 내지 약 500 마이크론 범위의 입자 크기를 갖는 조립 분말을 포함할 수 있다. 제형은 비강 스프레이, 점비액, 또는 분무기에 의한 에어로졸 투여에 의한 것일 수 있다. 제형은 면역원성 조성물의 수성 또는 유성 용액을 포함할 수 있다.

[0184] 면역원성 조성물은 액상 제제 예컨대 혼탁액, 시럽 또는 엘릭시르일 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 비경구, 피하, 진피내, 근육내 또는 정맥내 투여 (예를 들어, 주사가능 투여)를 위한 제제, 예컨대 멸균 혼탁액 또는 애멸선일 수 있다.

[0185] 면역원성 조성물은 리포좀, 마이크로구형체 또는 다른 폴리머 매트릭스 (Felgner 등, 미국 특허 번호 5,703,055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. Ito III (제2판. 1993), 이들의 내용은 본 명세서에 참고로 전체적으로 편입되어 있음)에 편입될 수 있다. 리포좀은 인지질 또는 다른 지질로 구성될 수 있으며, 제조 및 투여가 상대적으로 간단한, 비독성, 생리적으로 허용가능하고 대사가능한 담체일 수 있다.

백신에 의한 암 치료 방법

[0187] 백신은 필요로 하는 포유동물 또는 대상체의 암 또는 종양 (예를 들어, MCC)에 반응하거나 지시하는 포유동물에서 면역 반응을 생성하거나 유도하기 위해 사용될 수 있다. 유발된 면역 반응은 암 또는 종양 성장을 예방할 수 있다.

[0188] 유발된 면역 반응은 암성 또는 종양 세포의 전이를 예방하고/거나 감소시킬 수 있다. 따라서, 백신은 백신이 투여된 포유동물 또는 대상체에서 암 또는 종양을 치료하고/거나 예방하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0189] 일부 구현예에서, 투여된 백신은 (1) 단핵구 화학유인 단백질-1 (MCP-1) 생산을 차단하는 항체를 생성하기 위해 B 세포 반응을 통해 체액성 면역을 유도함으로써 청소능을 매개하거나 종양 세포의 성장을 예방함으로써, 골수성 유래된 억제 세포 (MDSC)를 지연시키고 종양 성장을 억제하고; (2) 세포독성 T 림프구 예컨대 CD8+ (CTL)을 증가시켜 종양 세포를 공격하고 사멸시키고; (3) T 헬퍼 세포 반응을 증가시키고; (4) IFN- γ 및 TNF- α 또는

바람직하게는 상기에 언급된 것 모두를 통해 염증 반응을 증가시킬 수 있다.

[0190] 일부 구현예에서, 면역 반응은, 백신이 투여된 상기 대상체에서 다양한 조직 또는 계 (예를 들어, 뇌 또는 신경계, 등)의 손상 또는 염증을 유발하지 않는 체액 면역 반응 및/또는 항원-특이적 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응을 생성할 수 있다.

[0191] 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서 무종양 생존을 증가시키고, 종양 덩어리를 감소시키고, 종양 생존을 증가시키거나, 또는 이들의 조합일 수 있다. 투여된 백신은 대상체에서 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60% 또는 그 초과까지 무종양 생존을 증가시킬 수 있다. 투여된 백신은 면역화 후 상기 대상체에서 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 및 70% 또는 그 초과까지 종양 덩어리를 감소시킬 수 있다. 투여된 백신은 대상체에서 단핵구 화학유인 단백질 1 (MCP-1), 글수성 유래된 억제 세포에 의해 분비된 사이토카인의 증가를 예방하고 차단할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서 암성 또는 종양 조직 내의 MCP-1의 증가를 예방하고 차단함으로써, 대상체에서 암성 또는 종양 조직의 혈관형성을 감소시킬 수 있다.

[0192] 투여된 백신은 대상체에서 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 및 70% 또는 그 초과까지 종양 생존을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 백신은 암성 또는 종양 세포 또는 조직을 표적으로 하는 항원-특이적 면역 반응을 확립하여 백신이 투여된 상기 대상체에서 병 또는 사망을 손상시키거나 야기하지 않으면서 하나 이상의 MCV T 항원을 발현시키는 암 또는 종양을 깨끗하게 하거나 제거하기 위해 (이하에 더 상세히 기재된 바와 같이) 말초에 투여될 수 있다.

[0193] 투여된 백신은 약 50-배 내지 약 6000-배, 약 50-배 내지 약 5500-배, 약 50-배 내지 약 5000-배, 약 50-배 내지 약 4500-배, 약 100-배 내지 약 6000-배, 약 150-배 내지 약 6000-배, 약 200-배 내지 약 6000-배, 약 250-배 내지 약 6000-배, 또는 약 300-배 내지 약 6000-배까지 상기 대상체에서 세포 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 백신은 약 50-배, 100-배, 150-배, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배, 400-배, 450-배, 500-배, 550-배, 600-배, 650-배, 700-배, 750-배, 800-배, 850-배, 900-배, 950-배, 1000-배, 1100-배, 1200-배, 1300-배, 1400-배, 1500-배, 1600-배, 1700-배, 1800-배, 1900-배, 2000-배, 2100-배, 2200-배, 2300-배, 2400-배, 2500-배, 2600-배, 2700-배, 2800-배, 2900-배, 3000-배, 3100-배, 3200-배, 3300-배, 3400-배, 3500-배, 3600-배, 3700-배, 3800-배, 3900-배, 4000-배, 4100-배, 4200-배, 4300-배, 4400-배, 4500-배, 4600-배, 4700-배, 4800-배, 4900-배, 5000-배, 5100-배, 5200-배, 5300-배, 5400-배, 5500-배, 5600-배, 5700-배, 5800-배, 5900-배, 또는 6000-배까지 상기 대상체에서 세포 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

[0194] 투여된 백신은 약 50-배 내지 약 6000-배, 약 50-배 내지 약 5500-배, 약 50-배 내지 약 5000-배, 약 50-배 내지 약 4500-배, 약 100-배 내지 약 6000-배, 약 150-배 내지 약 6000-배, 약 200-배 내지 약 6000-배, 약 250-배 내지 약 6000-배, 또는 약 300-배 내지 약 6000-배까지 상기 대상체에서 인터페론 감마 (IFN- γ) 수준을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 백신은 약 50-배, 100-배, 150-배, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배, 400-배, 450-배, 500-배, 550-배, 600-배, 650-배, 700-배, 750-배, 800-배, 850-배, 900-배, 950-배, 1000-배, 1100-배, 1200-배, 1300-배, 1400-배, 1500-배, 1600-배, 1700-배, 1800-배, 1900-배, 2000-배, 2100-배, 2200-배, 2300-배, 2400-배, 2500-배, 2600-배, 2700-배, 2800-배, 2900-배, 3000-배, 3100-배, 3200-배, 3300-배, 3400-배, 3500-배, 3600-배, 3700-배, 3800-배, 3900-배, 4000-배, 4100-배, 4200-배, 4300-배, 4400-배, 4500-배, 4600-배, 4700-배, 4800-배, 4900-배, 5000-배, 5100-배, 5200-배, 5300-배, 5400-배, 5500-배, 5600-배, 5700-배, 5800-배, 5900-배, 또는 6000-배까지 상기 대상체에서 IFN- γ 수준을 증가시킬 수 있다.

[0195] 백신 용량은 1 μ g 내지 10 mg 활성 구성요소/kg 체중/시간일 수 있고 20 μ g 내지 10 mg 구성요소/kg 체중/시간일 수 있다. 백신은 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, 또는 31 일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료에 대한 백신 용량의 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회일 수 있다.

[0196] 관문 억제제와의 병합 요법

- [0197] 본 발명은 또한, 상기에 기재된 바와 같은 백신을 하나 이상의 관문 억제제와 조합하여 사용하여 포유동물에서 면역 반응을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기에 기재된 바와 같은 백신은 MCV T 항원 및 체크포인트 단백질에 대한 항체를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "관문 억제제"는 암 면역요법의 분야에서 통상적으로 이해되는 바와 같이 면역 관문을 차단하는 억제제 또는 분자를 포함한다. 더 통상적으로 관문 억제제는 면역 관문 단백질을 차단하는 항체이다. 면역 관문 단백질은 비제한적으로, PD1, PDL1, PDL2, CTLA-4, LAG3, TIM3, B7-H3, BTLA, VISTA, CD40, CEACAM1, CD80, CD86, OX40, CD27, GITR, DNAM-1, TIGIT, TMIGD2 및 DC-SIGN을 포함한다. 알려진 관문 억제제의 일부 예는 비제한적으로, 이필리무맙, 펜브롤리주맙, 니볼루맙, 페딜리주맙, 아벨루맙 및 기타를 포함한다.
- [0198] 조합은 단일 제형으로 될 수 있거나 별개일 수 있고 순차적으로 투여될 수 있다 (MCV T 항원 제1 및 그 다음 관문 억제제, 또는 관문 억제제 제1 및 그 다음 MCV T 항원). 일부 구현예에서, MCV T 항원은 관문 억제제가 상기 대상체에게 투여되기 전 약 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 35 분, 40 분, 45 분, 50 분, 55 분, 60 분, 0.25 시간, 0.5 시간, 0.75 시간, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 24 시간, 36 시간, 48 시간, 60 시간, 72 시간, 84 시간, 96 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일, 10 일, 11 일, 12 일, 13 일, 14 일, 15 일, 16 일, 17 일, 18 일, 19 일, 20 일, 21 일, 22 일, 23 일, 24 일, 25 일, 26 일, 27 일, 28 일, 29 일, 30 일, 31 일, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 또는 8 주에 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 관문 억제제는 MCV T 항원이 상기 대상체에게 투여되기 전 약 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 35 분, 40 분, 45 분, 50 분, 55 분, 60 분, 0.25 시간, 0.5 시간, 0.75 시간, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 24 시간, 36 시간, 48 시간, 60 시간, 72 시간, 84 시간, 96 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일, 10 일, 11 일, 12 일, 13 일, 14 일, 15 일, 16 일, 17 일, 18 일, 19 일, 20 일, 21 일, 22 일, 23 일, 24 일, 25 일, 26 일, 27 일, 28 일, 29 일, 30 일, 31 일, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 또는 8 주에 상기 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0199] MCV T 항원과 관문 억제제의 조합은 MCV T 항원을 단독으로 포함하는 백신보다 더 효율적으로 면역계를 유도한다. 이러한 더 효율적인 면역 반응은 특정 암의 치료 및/또는 예방에서 증가된 효능을 제공한다.
- [0200] 일부 구현예에서, 면역 반응은 약 0.5-배 내지 약 15-배, 약 0.5-배 내지 약 10-배, 또는 약 0.5-배 내지 약 8-배까지 증가될 수 있다. 대안적으로, 백신이 투여된 상기 대상체의 면역 반응은 적어도 약 0.5-배, 적어도 약 1.0-배, 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 3.5-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 4.5-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 5.5-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 또는 적어도 약 15.0-배까지 증가될 수 있다.
- [0201] 또 다른 대안적인 구현예에서, 백신이 투여된 상기 대상체의 면역 반응은 약 50% 내지 약 1500%, 약 50% 내지 약 1000%, 또는 약 50% 내지 약 800% 증가될 수 있다. 다른 구현예에서, 백신이 투여된 상기 대상체의 면역 반응은 적어도 약 50%, 적어도 약 100%, 적어도 약 150%, 적어도 약 200%, 적어도 약 250%, 적어도 약 300%, 적어도 약 350%, 적어도 약 400%, 적어도 약 450%, 적어도 약 500%, 적어도 약 550%, 적어도 약 600%, 적어도 약 650%, 적어도 약 700%, 적어도 약 750%, 적어도 약 800%, 적어도 약 850%, 적어도 약 900%, 적어도 약 950%, 적어도 약 1000%, 적어도 약 1050%, 적어도 약 1100%, 적어도 약 1150%, 적어도 약 1200%, 적어도 약 1250%, 적어도 약 1300%, 적어도 약 1350%, 적어도 약 1450%, 또는 적어도 약 1500%까지 증가될 수 있다.
- [0202] 백신 용량은 1 μ g 내지 10 mg 활성 구성요소/kg 체중/시간일 수 있고 20 μ g 내지 10 mg 구성요소/kg 체중/시간일 수 있다. 백신은 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, 또는 31 일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료에 대한 백신 용량의 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회일 수 있다.
- [0203] 머켈 세포 암종
- [0204] 백신은 필요로 하는 포유동물 또는 대상체에서 머켈 세포 암종 (MCC)에 반응하거나 지향된 포유동물에서 면역

반응을 생성하거나 유도하기 위해 사용될 수 있다. 유발된 면역 반응은 MCC 성장을 예방할 수 있다. 유발된 면역 반응은 MCC 성장을 감소시킬 수 있다. 유발된 면역 반응은 MCC로부터 암성 또는 종양 세포의 전이를 예방하고/거나 감소시킬 수 있다. 따라서, 백신은 백신이 투여된 포유동물 또는 대상체에서 MCC를 치료하고/거나 예방하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, 투여된 백신은 (1) MCC 세포에 의해 발현된 MCV T 항원을 표적으로 하는 항체를 생성하기 위해 B 세포 반응을 통해 체액성 면역을 유도함으로써 청소능을 매개하거나 MCC의 성장을 예방하고; (2) 세포독성 T 림프구 예컨대 CD8+ (CTL)을 증가시켜 MCC 세포를 공격하고 사멸시키고; (3) T 헬퍼 세포 반응을 증가시키고; 그리고 (4) IFN- γ 및 TNF- α 또는 상기에 언급된 것 모두를 통해 염증 반응을 증가시킬 수 있다.

[0206] 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서 MCC 없는 생존을 증가시키고, MCC 질량을 감소시키고, MCC 생존을 증가시키거나 이들의 조합일 수 있다. 투여된 백신은 대상체에서 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60% 또는 그 초과까지 MCC 질량을 감소시킬 수 있다. 투여된 백신은 대상체에서 단핵구 화학유인 단백질 1 (MCP-1), 골수성 유래된 억제 세포에 의해 분비된 사이토카인의 증가를 예방하고 차단할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서 MCC 조직 내의 MCP-1의 증가를 예방하고 차단함으로써, 대상체에서 MCC 조직의 혈관형성을 감소시킬 수 있다. 투여된 백신은 대상체에서 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60% 또는 그 초과까지 MCC 생존을 증가시킬 수 있다.

병합 치료

[0208] 면역원성 조성물은 CCL20, α -인터페론, γ -인터페론, 혈소판 유래된 성장 인자 (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, 표피 성장 인자 (EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인 (CTACK), 상피 가슴샘-발현된 케모카인 (TECK), 점막-관련된 상피 케모카인 (MEC), IL-12, 결실된 신호 서열을 갖는 IL-15를 포함하고 상이한 신호 웹타이드 예컨대 IgE 신호 웹타이드를 선택적으로 포함하는 IL-15, MHC, CD80, CD86, IL-28, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, 돌연변이체 형태의 IL-18, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피성 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, 공기, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFKB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, OX40, OX40 리간드, NKG2D, 마이카, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이의 기능성 단편 또는 이들의 조합을 인코딩하는 다른 단백질 및/또는 유전자와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역원성 조성물은 CCL20, IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, MEC 및 RANTES 중 하나 이상을 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 분자 또는 이의 기능성 단편, 및 CCL02, IL-12 단백질, IL-15 단백질, IL-28 단백질, CTACK 단백질, TECK 단백질, MEC 단백질 또는 RANTES 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 기능성 단편을 핵산 분자 및/또는 단백질 중 하나 이상과 조합하여 투여된다.

[0209] 면역원성 조성물은 경구로, 비경구로, 설하로, 경피로, 직장으로, 경점막으로, 국소적으로, 흡입, 협측 투여, 늑막내로, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 척추강내, 및 관절내 또는 이들의 조합을 포함하는 상이한 경로로 투여될 수 있다. 수의적 용도를 위해, 조성물은 정상적인 수의과 실무에 따라 적합하게 허용 가능한 제형으로 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 가장 적합한 투약 레지멘 및 투여 경로를 쉽게 결정할 수 있다. 면역원성 조성물은 전통적 주사기, 무바늘 주사 디바이스, "미세투사물 폭격 콘 건(microprojectile bombardment gone gun)", 또는 다른 물리적 방법 예컨대 전기천공 ("EP"), "유체역학적 방법" 또는 초음파에 의해 투여될 수 있다.

[0210] 면역원성 조성물의 플라스미드는 생체내 전기천공, 리포좀 매개, 나노입자 촉진된 재조합 백터 예컨대 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 관련된 바이러스 및 재조합 백시니아를 갖거나 갖지 않는 DNA 주사 (또한 일명 DNA 백신접종)을 포함하는 몇 개의 잘 알려진 기술에 의해 포유동물에 전달될 수 있다. 공통 항원은 DNA 주사를 통해, 그리고 생체내 전기천공에 따라 전달될 수 있다.

[0211] 전기천공

전기천공을 통한 면역원성 조성물의 투여는 세포막에 가역 기공을 형성시키는데 효과적인 에너지의 펄스를 포유동물의 원하는 조직에 전달하도록 구성될 수 있는 전기천공 디바이스를 사용하여 달성될 수 있으며, 바람직한 에너지의 펄스는 사용자에 의한 사전설정 전류 입력과 유사한 정전류이다. 전기천공 디바이스는 전기천공 구성요소 및 전극 어셈블리 또는 핸들 어셈블리를 포함할 수 있다. 전기천공 구성요소는 컨트롤러, 전류 파형 발생제, 임피던스 테스터, 파형 로거(logger), 입력 요소, 상태 보고 요소, 통신 포트, 메모리 구성요소, 전원, 및 전원 스위치를 포함하는, 전기천공 디바이스의 다양한 요소 중 하나 이상을 포함하고 통합할 수 있다. 전기천공은 플라스미드에 의한 세포의 형질감염을 촉진하기 위해 생체내 전기천공 디바이스, 예를 들어 CELLECTRA EP 시스템 (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA) 또는 Elgen 전기천공기 (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA)를 사용하여 달성될 수 있다.

전기천공 구성요소는 전기천공 디바이스의 하나의 요소로서 기능할 수 있으며, 다른 요소는 전기천공 구성요소와 소통하는 별도의 요소 (또는 구성요소)이다. 전기천공 구성요소는 전기천공 디바이스의 하나 초과의 요소로서 기능할 수 있으며, 이는 전기천공 구성요소로부터 분리된 전기천공 디바이스의 또 다른 요소와 소통할 수 있다. 하나의 전기기계적 또는 기계적 디바이스의 일부로서 존재하는 전기천공 디바이스의 요소는 요소들이 하나의 디바이스로서 기능하거나 서로 소통하는 별도의 요소로서 기능할 수 있으므로 제한되지 않을 수 있다. 전기천공 구성요소는 원하는 조직에서 정전류를 생성하는 에너지 펄스를 전달할 수 있고, 피드백 기전을 포함한다. 전극 어셈블리는 공간적 배열로 복수의 전극을 갖는 전극 어레이를 포함할 수 있으며, 전극 어셈블리는 전기천공 구성요소로부터 에너지 펄스를 수신하고, 전극을 통해 원하는 조직으로 동일한 것을 전달한다. 복수의 전극 중 적어도 하나는 에너지 펄스의 전달 동안 중성이며, 원하는 조직에서 임피던스를 측정하고, 임피던스를 전기천공 구성요소에 소통한다. 피드백 기전은 측정된 임피던스를 수신할 수 있고, 일정한 정전류를 유지하기 위해 전기천공 구성요소에 의해 전달된 에너지의 펄스를 조정할 수 있다.

복수의 전극은 탈중앙화된 패턴으로 에너지 펄스를 전달할 수 있다. 복수의 전극은 프로그래밍된 서열 하에서 전극의 제어를 통해 탈중앙화된 패턴으로 에너지 펄스를 전달할 수 있고, 프로그래밍된 서열은 사용자에 의해 전기천공 구성요소에 입력된다. 프로그래밍된 서열은 순차적으로 전달되는 복수의 펄스를 포함할 수 있고, 여기서 복수의 펄스의 각각의 펄스는 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 2개의 활성 전극에 의해 전달되고, 여기서 복수의 펄스의 후속적인 펄스는 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 2개의 활성 전극 중 다른 하나에 의해 전달된다.

피드백 기전은 하드웨어 또는 소프트웨어에 의해 수행될 수 있다. 피드백 기전은 유사체 폐쇄된-루프 회로에 의해 수행될 수 있다. 피드백은 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s 또는 1 μ s마다 발생하지만, 바람직하게는 실시간 피드백 또는 즉각적(즉, 반응 시간을 결정하기 위해 이용가능한 기술에 의해 결정된 바와 같이 실질적으로 즉각적임)이다. 중성 전극은 원하는 조직에서의 임피던스를 측정하고, 임피던스를 피드백 기전에 소통시키고, 피드백 기전은 임피던스에 반응하고, 에너지의 펄스를 조정하여 정전류를 사전설정된 전류와 유사한 값으로 유지할 수 있다. 피드백 기전은 에너지의 펄스의 전달 동안 정전류를 계속해서 및 즉각적으로 유지할 수 있다.

본 발명의 면역원성 조성물의 전달을 촉진할 수 있는 전기천공 디바이스 및 전기천공 방법의 예는 Draghia-Akli 등의 미국 특허 번호 7,245,963, Smith 등에 의해 제출된 미국 특허 공개 2005/0052630에 기재된 것들을 포함하며, 이들의 내용은 전체적으로 참고로 편입되어 있다. 면역원성 조성물의 전달을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 다른 전기천공 디바이스 및 전기천공 방법은 2007년 10월 17일자로 출원된 공동계류되고 공유된 미국 특허 출원 일련 번호 11/874072에 제공된 것들을 포함하며, 35 USC 119(e) 하에 2006년 10월 17일자로 출원된 미국 출원 일련 번호 60/852,149, 및 2007년 10월 10일자로 출원된 60/978,982의 이점을 청구하며, 이들 모두는 전체적으로 편입되어 있다.

Draghia-Akli 등의 미국 특허 번호 7,245,963는 신체 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 촉진하기 위한 모듈식 전극 시스템 및 이의 용도를 기술한다. 모듈식 전극 시스템은 복수의 바늘 전극; 피하 주사침; 프로그래밍 가능한 정전류 펄스 컨트롤러로부터 복수의 바늘 전극으로 전도성 링크를 제공하는 전기 커넥터; 및 전원을 포함할 수 있다. 오퍼레이터는 지지 구조 상에 실장된 복수의 바늘 전극을 잡고 이를 신체 또는 식물에서 선택된 조직으로 단단히 삽입할 수 있다. 이어서 생체분자는 피하 주사침을 통해 선택된 조직으로 전달된다. 프로그래밍 가능한 정전류 펄스 컨트롤러가 활성화되고, 정전류 전기 펄스가 복수의 바늘 전극에 인가된다. 인가된 정전류 전기 펄스는 복수의 전극 사이에서 세포 내로 생체분자의 도입을 촉진한다. 미국 특허 번호 7,245,963의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 편입되어 있다.

- [0218] Smith 등에 의해 제출된 미국 특허 공개 2005/0052630은 신체 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 효과적으로 촉진하는데 사용될 수 있는 전기천공 디바이스를 기술한다. 전기천공 디바이스는 작동이 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 명시된 전기-동력학 디바이스 ("EKD 디바이스")를 포함한다. EKD 디바이스는 펠스 파라미터의 사용자 컨트롤 및 입력을 기반으로 어레이의 전극 사이에서 일련의 프로그래밍 가능한 정전류 펠스 패턴을 생성하며, 전류 과정 데이터의 보관 및 취득을 허용한다. 전기천공 디바이스는 또한 다수의 바늘 전극을 갖는 교체 가능한 전극 디스크, 주사 바늘을 위한 중심 주사 통로, 및 제거 가능한 가이드 디스크를 포함한다. 미국 특허 공개 2005/0052630의 전체 내용은 참고로 편입되어 있다.
- [0219] 미국 특허 번호 7,245,963 및 미국 특허 공개 2005/0052630에 기재된 전극 어레이 및 방법은 조직 예컨대 근육, 뿐만 아니라 다른 조직 또는 기관으로의 깊은 침투에 적합할 수 있다. 전극 어레이의 구성으로 인해, (선택한 생체 분자를 전달하기 위해) 주사 바늘도 상기 표적 장기에 완전히 삽입되고, 주사은 전극으로 사전기술된 영역에서 상기 표적 사안에 수직으로 투여된다. 미국 특허 번호 7,245,963 및 미국 특허 공개 2005/005263에 기재된 전극은 바람직하게는 20 mm 길이 및 21 게이지이다.
- [0220] 추가로, 전기천공 디바이스 및 이의 용도를 포함하는 일부 구현예에서, 하기 특허에 기재된 것들인 전기천공 디바이스가 고려된다: 1993년 12월 28일 허여된 미국 특허 5,273,525, 2000년 8월 29일 허여된 미국 특허 6,110,161, 2001년 7월 17일 허여된 6,261,281, 및 2005년 10월 25일 허여된 6,958,060, 및 2005년 9월 6일 허여된 미국 특허 6,939,862. 또한, 2004년 2월 24일 허여된 미국 특허 6,697,669에 제공된 청구 대상에 관한 특허는 임의의 다양한 디바이스를 사용하여 DNA를 전달하는 것에 관한 것이며, DNA 주사 방법에 관한 2008년 2월 5일 허여된 미국 특허 7,328,064가 본원에서 고려된다. 상기 특허는 전체적으로 참고로 편입되어 있다.
- [0221] **시험관내 및 생체의 항원 생성**
- [0222] 일 구현예에서, 최적화된 공통 MCV T 항원은 시험관내 또는 생체외에서 생성된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 최적화된 공통 MCV T 항원을 인코딩하는 핵산은 시험관내 또는 생체외 세포에서 도입되고 발현될 수 있다.
- [0223] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 벡터는 당업계에서 임의의 방법에 의해 숙주세포, 예를 들어, 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포로 쉽게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주세포로 전달될 수 있다.
- [0224] 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 폭격, 미세주사, 전기천공, 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, Sambrook 등 (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)을 참고한다. 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포 내로 도입하기 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.
- [0225] 관심 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는, 유전자를 포유동물, 예를 들어, 인간 세포 내에 삽입하기 위해 가장 널리 사용된 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련된 바이러스, 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참고한다.
- [0226] 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산물 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로구형체, 비드, 및 수중유 에멀션, 교질입자, 혼합된 교질입자, 및 리포좀을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포좀 (예를 들어, 인공 멤브레인 소포)이다.
- [0227] 비-바이러스 전달 시스템이 이용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포좀이다. (시험관내, 생체외 또는 생체내) 숙주세포 내로 핵산을 도입하기 위해 지질 제형의 사용이 고려된다. 또 다른 양태에서, 핵산은 지질과 관련될 수 있다. 지질과 관련된 핵산은 리포좀의 수성 내측에 캡슐화될 수 있고, 리포좀의 지질 이중층 내에 산재되며, 리포좀 및 올리고뉴클레오타이드 둘다와 관련된 연결 분자를 통해 리포좀에 부착되고, 리포좀 내에 포획되고, 리포좀과 함께 복합체화되고, 지질을 함유하는 용액에 분산되고, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되고, 지질 중의 혼탁액으로서 함유되고, 교질입자와 함께 함유된 또는 복합체화되고, 또는 달리 지질과 관련된다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련된 조성물은 용액 중 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조, 교질입자, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한, 용액에 단순히 산재되어, 크기 또는 형상이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는

지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 액적 뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 그것의 유도체, 예컨대 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데하이드를 함유하는 화합물 부류를 포함한다.

[0228] **실시예**

[0229] 본 발명은 하기 실시예에 추가로 설명된다. 이들 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예들을 나타내지만, 단지 예시로서 주어짐을 이해해야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당해 분야의 숙련가는 본 발명의 필수적인 특성을 확인할 수 있으며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명을 다양한 용도 및 조건에 적응시키기 위해 본 발명을 다양하게 변경 및 변형시킬 수 있다. 따라서, 본원에 도시되고 기재된 것들에 더하여, 본 발명의 다양한 변형이 전술한 설명으로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 그와 같은 변형은 또한 첨부된 청구항들의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0230] **실시예 1: 머켈 세포 폴리오마바이러스를 표적으로 하는 핵산 백신**

[0231] 머켈 세포 폴리오마바이러스 (MCV) T 항원을 표적으로 하는 핵산 백신이 개발되었다 (도 1 및 도 2). 큰 T 항원 (LTAg) 및 작은 t 항원 (STAg)을 나타내는 최적화된 합성 공통 MCV T 항원 서열을 개별적으로 포유동물 발현-플라스미드 DNA로 클로닝하고 (도 3), 근육내 전기천공을 통해 마우스에 전달하였다 (도 4A). 면역화 후, DNA 백신 자체물은 MCV T 항원 웹타이드에 대해 강력한 항체 및 T-세포 반응을 생성하였다 (도 4B 내지 도 15).

[0232] 도 4B, 도 7, 도 12 및 도 14는 LTAg 백신이 C57B1/6 및 CD-1 교배 마우스에서 면역원성이 높다는 것을 입증한다. 도 8 내지 도 10은 LTAg 백신접종이 강력한 다작용성 CD4 및 CD8 T 세포 및 세포독성 CD8 T 세포를 초래한다는 것을 입증한다.

[0233] 도 4B 및 도 15는 STAg 백신이 C57B1/6 및 CD-1 마우스에서 면역원성이 높다는 것을 입증한다. 도 15는 CD-1 마우스의 경우 IFN γ /TNF α 에 대해 CD4 및 CD8 반응이 모두 검출되었음을 입증한다.

[0234] 도 11은 두 백신이 C57B1/6 마우스에서 체액 반응을 생성한다는 것을 입증한다.

[0235] **실시예 2: 서열**

[0236] 서열번호:1: 변형된 합성 공통 MCV LTAg를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열

```
ATGGACCTGGTGTGAAACAGGAAGGAGAGAGAGGCCCTGTGCAAGCTGCTGGAG
ATCGCCCCCAACTGTTACGGCAATATCCCTCTGATGAAGGCCGCTTCAAGCGGA
GCTGCCTGAAGCACCACCCAAACAAGGGCGGAAACCCTGTGATCATGATGGAGC
TGAATACCCCTGTGGTCCAAGTTTCAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGTCCGATTT
CTCTATGTTGACGAGGTGGATGAGGCCCTATCTACGGCACCACCAAGTTCAAG
GAGTGGTGGCGCTCCGGCGCTCTCTGGCAAGGCCTACGAGTACGCCCTAAG
ACCCACACGGCACCAATAGCAGGTCCAGAAAGCCAAGCTCCAACGCCAGCAGGG
GAGCACCATCCGGATCTAGCCCACCTCACAGCCAGTCCTAGCTCCGGCTACGG
CTCTTTAGCGCCTCCAGGCCCTGACAGCCAGTCCAGAGGCCCGATATCCCA
CCCGAGCACCACGAGGGAGCCTACCTCTAGCTCCGGCTTAGCTCCGGAGGAG
ACAACCAACAGCGGCAGGGAGTCTAGCACCCAAACGGCACCTCCGTGCCAAGG
AATTCCCTAGGACCGACGGAACCGCCGAGGACCTGTTCTGCGATAAGTCCCTGA
GCTCCCTGAGCCTCCATCTAGCTCCGAGGGAGCCAGAGGGAGGCCCTTAGCAG
```

[0237]

GTCCTCTCCCAGACAGCCACCAAGCTCCTCTGCCGAGGAGGCAAGCTCCTCTCAG
 TTCACCGACGGAGGAGTACAGGAGCTCCTCTTACCAACCCCTAAGACCCCTCCAC
 CCTTCTCCCGAAGCGCAAGTTGGAGGCTCTAGGAGCTCCGCCTCTAGCGCCTC
 CTCTGCCAGCTCACCTCCACCCCTCCAAAGCCAAGAAGAACAGAGAGACACC
 CGTGCCCTACCGACTTCCTATCGACCTGAGCGATTACCTGTCCCACGCCGTGTAC
 TCTAATAAGACCGTGAGCTGTTGCCATCTACACCACAGCGACAAGGCCATCG
 AGCTGTACGATAAGATCGAGAAGTTCAAGGTGGACTCAAGTCCAGGCACGCAT
 GCGAGCTGGATGTATCCTGCTGTTCATCACCTGTCCAAGCACCACCGTGTCTGC
 CATCAAGAACTTCTGCAGCACCTTGTACCATCTCCTTGTATCTGCAAGGGCG
 TGAATAAGATGCCTGAGATGTACAACAACCTGTGCAAGCCCCCTACAAGCTGCT
 GCAGGAGAACAGCCACTGCTGAATTACGAGTCCAGGAGAAGGAGAAGGAGG
 CCAGCTGCAACTGGAATCTGGTGGCGAGTTCGCTGTGAGTACGAGCTGGACG
 ATCACTTATCATCCTGGCCACTACCTGGACTTCGCAAGCCATTCCCTGCCAG
 AAGTGTGAGAACAGGTCTAGACTGAAGCCACACAAGGCCACGAGGCCACCAC
 TCCAATGCCAAGCTGTTTACGAGTCTAAGAGCCAGAACGACCATCTGCCAGCAG
 GCAGCAGACACCGTGCTGGCAAAGAGGAGACTGGAGATGCTGGAGATGACCG
 GACCGAGATGCTGTGCAAGAAGTTCAAGAAGCACCTGGAGCGGCTGCGCGACCT
 GGATACCATCGATCTGCTGTACTACATGGCGCGTGGCTGGTACTGCTGTCTG
 TTCGAGGAGTTGAGAAGAACAGTGCAGAAAGATCATCCAGCTGCTGACCGAGAAC
 ATCCCAAAGTACAGAAATATCTGGTTCAAGGGCCCCATCAACTCTGGCAAGACC
 AGCTTCGCCGCCGCCCCGATCGACCTGCTGGAGGGCAAGGCCGTAACATCAATT
 GCCCTAGCGATAAGCTGCCATTGAGCTGGCTGTGCCCTGGACAAGTTCATGGT
 GGTGTTGAGGATGTGAAGGGCCAGAAACTCCCTGAATAAGGACCTGCAGCCGG
 CCAGGGCATCAACAATCTGGATAACCTGCGGGACCACCTGGATGGAGCAGTGGC
 CGTGAGCCTGGAGAACAGCACGTGAACAAGAACGACCCAGATCTCCACCCCTG
 CATCGTGACCGCCAATGACTACTTATCCAAAGACCCCTGATCGCCCGCTTCTCT
 TACACCCCTGCACTTAGCCCCAAGGCCAACCTGAGGGACAGCCTGGATCAGAAT
 ATGGAGATCAGAAAGAGGCGATCCTGCACTGAGATCAGCTACGGCAAGTTTGTCA
 AGAAACTGGAAAGCAGATCCTGCACTGAGATCAGCTACGGCAAGTTTGTCA
 TGATCGAGAACGTGGAGGCCAGGACCCCTGCTGAATATCCTGATCGAGG
 AGGAGGGCCCAGAGGAGACAGAGGAGACACAGGACTCCGGCACCTCTCAG

[0239] 서열번호:2: 변형된 합성 공통 MCV LTag의 아미노산 서열

MDLVLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPNKGGNPVIMMELN
 TLWSKFQQNIHKLRDSFSMFDEVDEAPIYGTTKFEWWRSGGFSFGKAYEYGPNPH
 GTNSRSRKPSSNASRGAPSGSSPPHSQSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHEPT
 SSSGSSSREETTNSGRESSTPNGTSPRNSSRTDGTAEDLFCDKSLSSPEPPSSEEPEP
 PSSRSSPRQPPSSAEEASSSQFTDEEYRSSSFTTPKTPPPFSRKRKFGGSRSSASSASSA
 SFTSTPPKPKKNRETPVPTDFPIDLSYLSHAVYSNKTVSCFAIYTTSDKAIELYDKIEK
 FKVDFKSRHACELGCILLFITLSKHRVSAIKNFCSTFCTISFLICKGVNKMPEMYNNLC
 KPPYKLLQENKPLLNYEFQEKEKEASCNWNLVAEFAEYELDDHFIIAHYLDFAKP
 FPCQKCENRSRLKPHKAHEAHHSNAKLFYESKSQKTCQQAADTVLAKRRLEMLEM
 TRTEMLCKKFKKHLERLRLDLDTIDLLYYMGGVAWYCCLEEEFEKKLQKIIQLLTENI
 PKYRNIWFKGPNSGKTSFAAALIDLLEGKALNINCPSDKLPFELGCALDKFMVVFED
 VKGQNSLNKDLQPGQQGINNLDNLDHLDGAVAVSLEKKHVNKKHQIFPPCIVTAND
 YFIPKTLIARFSYTLHFSPKANLRSDLQNMEIRKRRILQSGTLLCLIWCLPDFFKP
 CLQEEIKNWKQILQSEISYKGFCQMIENVEAGQDPLLNILIEEGPEETEETQDSGTFS

Q

[0240]

[0241] 서열번호:3: 변형된 합성 공통 MCV STAg를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열

ATGGACCTGGTCTGAACCGAAAGGAGAGGGAGGCCCTGTCAAGCTGCTGGAG
 ATCGCCCCTAACTGTTACGGCAATATCCCACTGATGAAGGCCGCTTCAAGAGGT
 CTTGCCTGAAGCACCAACCAAGGGCGGAATCCCGTATGATGATGGAGC
 TGAACACCCCTGTGGAGCAAGTTTCAAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGAGCGACT
 TCTCCATGTTGATGAGGTGAGCACCAAGTCCCGTATAACGCCAGGTTGCAGAGGCCCTGGCT
 GTATGCTGAAGCAGCTGCGGGACTCCAAGTGCCTGTATCTTGTCAAGCTGAG
 CCGCCAGCACTGTTCTGAAGACCCCTGAAGCAGAAGAATTGCCACATGGGG
 CGAGTGCTCTGTTATCAGTGTGTTATCCTGTGGTCGGCTTCCCCCTACATGGG
 AGTCCTCGATTGGTGGCAGAAAACCCCTGGAAGAAACCGACTACTGTCTGCTGCA
 TCTGCATCTGTT

[0242]

[0243] 서열번호:4: 변형된 합성 공통 MCV STAg의 아미노산 서열

MDLVLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPNKGGNPVIMMELN
 TLWSKFQQNIHKLRDSFSMFDEVSTKFPWEYGTAAAAAQSGYNARFCRGPGCMLK

QLRDSKCACISCKLSRQHCSLKLKQKNCATWGECFCYQCFILWFGFPPTWESFDW
 WQKTLEETDYCLLHLHLF

[0246]

서열번호:5: 퓨린 절단 부위와 연결된 변형된 합성 공통 LTag 및 STAg를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열

ATGGACCTGGTGTGAAACAGGAAGGAGAGAGAGGCCCCGTGCAAGCTGCTGGAG
 ATCGCCCCCACTGTTACGGCAATATCCCTCTGATGAAGGCCGCTTCAAGCGGA
 GCTGCCTGAAGCACCAACCAACAAAGGGCGCAACCCGTGATCATGATGGAGC
 TGAATACCCCTGTGGTCCAAGTTTACAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGTCCGATTT
 CTCTATGTTGACGAGGTGGATGAGGCCCTATCTACGGCACCAAGTTCAAG
 GAGTGGTGGCGCTCCGGCGCTCTTTGGCAAGGCCTACGAGTACGCCCTA
 ACCCACACGGCACCAATAGCAGGTCCAGAAAGCCAAGCTCCAACGCCAGCAGGG
 GAGCACCATCCGGATCTAGCCCACCTCACAGCCAGTCCTCTAGCTCCGGCTACGG
 CTCTTTAGCGCCTCCCAGGCCTCTGACAGCCAGTCCAGAGGCCCGATATCCA
 CCCGAGCACCACGAGGAGCCTACCTCTAGCTCCGGCTCTAGCTCCGGGAGGAG
 ACAACCAACAGCGGCAGGGAGTCTAGCACCCAAACGGCACCTCCGTGCCAAGG
 AATTCTCTAGGACCGACGGAACGCCGAGGACCTGTTCTGCGATAAGTCCCTGA
 GCTCCCTGAGCCTCCATCTAGCTCCGAGGAGCCAGAGGAGGCCCTCTAGCAG
 GTCCTCTCCCAGACAGCCACCAAGCTCCTCTGCCGAGGAGGCAAGCTCCTCTCAG
 TTCACCGACGAGGAGTACAGGAGCTCCTCTTACCAACCCCTAACAGCCCTCCAC
 CCTCTCCCGGAAGCGCAAGTTGGAGGCTCTAGGAGCTCCGCTCTAGCGCCTC
 CTCTGCCAGCTCACCTCCACCCCTCCAAAGCCAAGAAGAACAGAGAGACACC
 CGTGCCCTACCGACTTCTATCGACCTGAGCGATTACCTGTCCACGCCGTGTAC
 TCTAATAAGACCGTGAGCTGTTGCCATCTACACCAACCGACAGCAAGGCCATCG
 AGCTGTACGATAAGATCGAGAAGTTCAAGGTGGACTTCAAGTCCAGGCACGCAT
 GCGAGCTGGATGTATCCTGCTGTTCATCACCCGTCCAAGCACCGCGTGTCTGC
 CATCAAGAACCTCTGCAGCACCTTGTACCATCTCCTTCTGATCTGCAAGGGCG
 TGAATAAGATGCCTGAGATGTACAACAACCTGTGCAAGGCCCTACAAGCTGCT
 GCAGGAGAACAGCCACTGCTGAATTACGAGTTCCAGGAGAAGGAGAAGGAGG
 CCAGCTGCAACTGGAATCTGGTGGCCGAGTTCGCCTGTGAGTACGAGCTGGACG
 ATCACTTATCATCCTGGCCCACTACCTGGACTTGCACGCCAGCCATTCCCTGCCAG
 AAGTGTGAGAACAGGTCTAGACTGAAGCCACACAAGGCCACGCCAGGAGGCCACCAC
 TCCAATGCCAAGCTGTTTACGAGTCTAAGAGCCAGAACGCCATCTGCCAGCAG

[0247]

GCAGCAGACACCGTGCTGGCAAAGAGGGAGACTGGAGATGCTGGAGATGACCAG
 GACCGAGATGCTGTGCAAGAAGTTCAAGAACGCACCTGGAGCGGCTGCGCACCT
 GGATACCATCGATCTGCTGTACTACATGGGCGGCGTGGCCTGGTACTGCTGTCTG
 TTCGAGGAGTTGAGAAGAAGCTGCAGAAGATCATCCAGCTGCTGACCGAGAAC
 ATCCCAAAGTACAGAAATATCTGGTCAAGGGCCCCATCAACTCTGGCAAGACC
 AGCTTCGCCGCCGCCCCCTGATCGACCTGCTGGAGGGCAAGGCCCTGAACATCAATT
 GCCCTAGCGATAAGCTGCCATTGAGCTGGCTGTGCCCTGGACAAGTTCATGGT
 GGTGTTGAGGATGTGAAGGGCCAGAACTCCCTGAATAAGGACCTGCAGCCCG
 CCAGGGCATCAACAATCTGGATAACCTGCGGGACCACCTGGATGGAGCAGTGGC
 CGTGAGCCTGGAGAAGAACGTGAACAAGAACGACCAGATCTTCCCACCCCTG
 CATCGTGACCGCCAATGACTACTTATCCCAAAGACCCCTGATGCCGCTTCTCT
 TACACCTGCACTTAGCCCCAAGGCCAACCTGAGGGACAGCCTGGATCAGAAT
 ATGGAGATCAGAAAGAGGCCATCCTGCACTCCGGAACCCCTGCTGCTGTGC
 CTGATCTGGTGTCTGCCCTGACACCACCTCAAGCCATGCCCTGAGGAGGAGATCA
 AGAACTGGAAGCAGATCCTGCACTGAGATCAGCTACGGCAAGTTTGTCA
 TGATCGAGAACGTGGAGGCCAGGACCCCTGCTGAATATCCTGATCGAGG
 AGGAGGGCCCAGAGGAGACAGAGGAGACACAGGACTCCGGCACCTCTCAG
 AGAGGCCGAAAAGGAGGTCTGATCTGGTGTGAATCGGAAAGAGAGAGAGAAC
 CCTGTGCAAACGTGGAAATGCCCAAACGTTACGGCAACATCCCCCTGATG
 AAGGCCGCTTCAAGAGGTCTGCCCTGAAGCACCACCCAAACAAGGGCGGCAAT
 CCCGTGATCATGATGGAGCTGAACACCCCTGAGCAAGTTCAGCAGAATATCC
 ACAAGCTGCGGAGCGACTTCTCCATGTTGATGAGGTGAGCAGCACAGTCCGGCTATAACGCCAGGTT
 TTGCAGAGGCCAGGCTGTATGCTGAAGCAGCTGCCGGACTCCAAGTGCCTG
 TATCTCTGCAAGCTGAGGCCAGCACTGTTCTCTGAAGAACCCCTGAAGCAGAAG
 ATTGCGCCACATGGGCGAGTGCTTCTGTTACGTGTTATCCTGTGGITCGG
 CTTCCCCCTACATGGGAGTCCTCGATTGGTGGCAGAAAACCCCTGGAGGAAACT
 GATTACTGTCTGCTGCACCTGCACCTGTT

[0249]

서열번호:6: 퓨린 절단 부위와 연결된 변형된 합성 공통 LTag 및 STAg의 아미노산 서열.

MDLVLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSLKHHPNKGGNPVIMMELN
 TLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTKFEWWRSGGFSFGKAYEYGPNPH
 GTNSRSRKPSSNASRGAPSGSSPPHSQSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHEPT
 SSSGSSSREETTNSGRESSTPNGTSPRNSSRTDGTAEDLFCDKSLSSPEPPSSEEPEEP
 PSSRSSPRQPPSSAEEASSQFTDEEYRSSSFTTPKTPPPFSRKRKFGGSRSSASSASSA
 SFTSTPPKPKKNRETPVPTDFPIDLSYLSHAVYSNKTVSCFAIYTTSDKAIELYDKIEK
 FKVDFKSRHACELGCILLFITLSKHRVSAIKNFCSTFCTISFLICKGVNKMPEMYNNLC
 KPPYKLLQENKPLLNYEFQEKEKEASCNWNLVAEFACEYELDDHFIILAHYLDFAKP
 FPCQKCENRSRLKPHKAHEAHHSNAKLFYESKSQKTICQQAADTVLAKRRLEMLEM
 TRTEMLCKKFKKHLERLRDLDTIDLLYYMGGVAWYCCLFEFEKKLQKIIQLLTENI
 PKYRNIWFKGPINSGKTSFAAALIDLLEGKALNINCPSDKLPFELGCALDKFMVVFED
 VKGQNSLNKDLQPGQGINNLDNLDHLDGAVAVSLEKKHVNKKHQIFPPCIVTAND
 YFIPKTLIARFSYTLHFSPKANLRSDLQNMEIRKRRILQSGTLLCLIWCLPDTTFKP
 CLQEEIKNWQKQILQSEISYGFQMIENVEAGQDPLLNILIEEGPEETEETQDSGTFS
 QRGRKRRSDLVLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSLKHHPNKGGNP
 VIMMELNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVSTKFPWEETYGTAAAAAQSGYNARFCR
 GPGCMLKQLRDSKCACISCKLSRQHCSLKTLKQKNCATWGECFCYQCFILWFGFPPT
 WESFDWWQKTLEETDYCLLHLHLF

[0250]

서열번호:7: IgE 선도 서열의 아미노산 서열

MDWTWILFLVAAATRVHS

[0253]

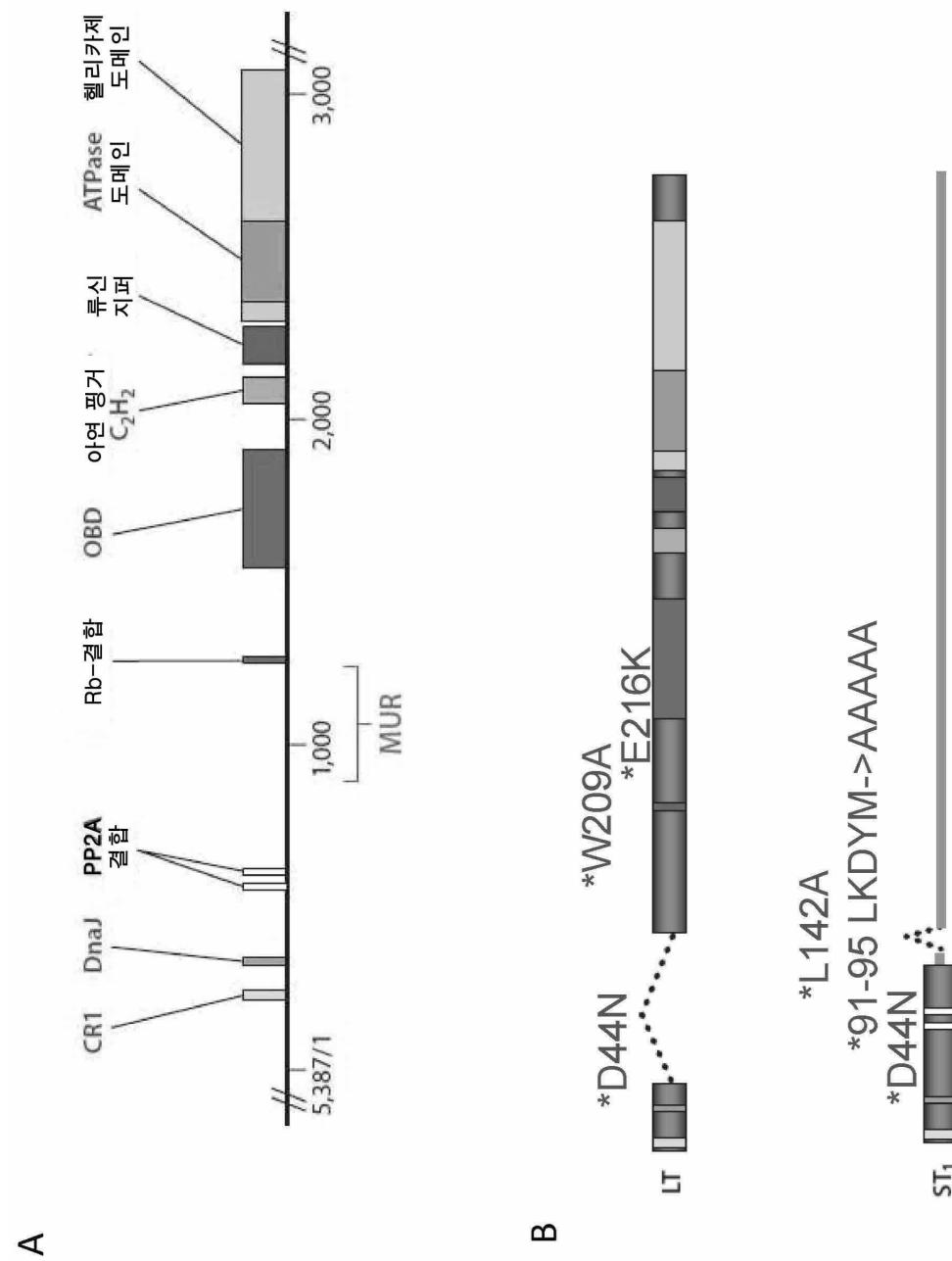
전술한 상세한 설명 및 첨부된 예들은 단지 설명적인 것이며, 첨부된 청구항들 및 그것의 등가물에 의해 단독으로 정의되는, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않는다고 이해된다.

[0254]

개시된 구현예에 대한 다양한 변경 및 변형은 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 본 발명의 학학 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 조성물, 제형, 또는 사용 방법과 관련된 것들을 비제한적으로 포함하는 그와 같은 변경 및 변형은 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

도면

도면1

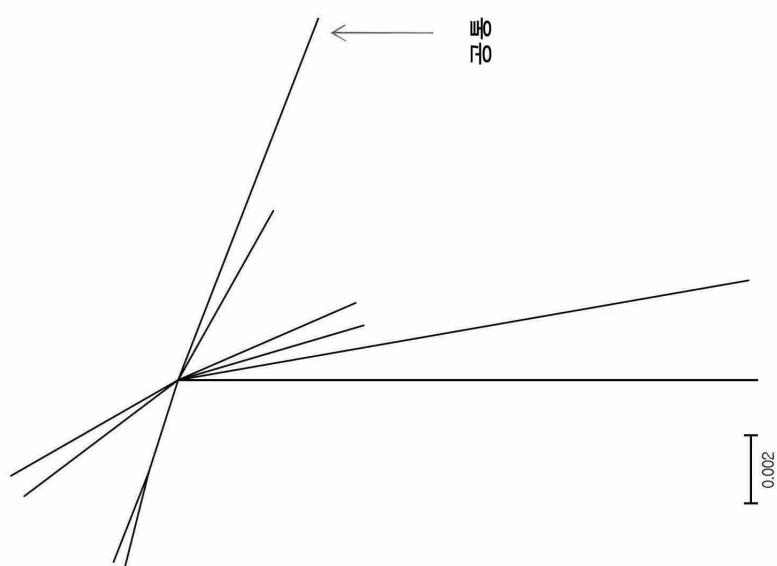


도면2

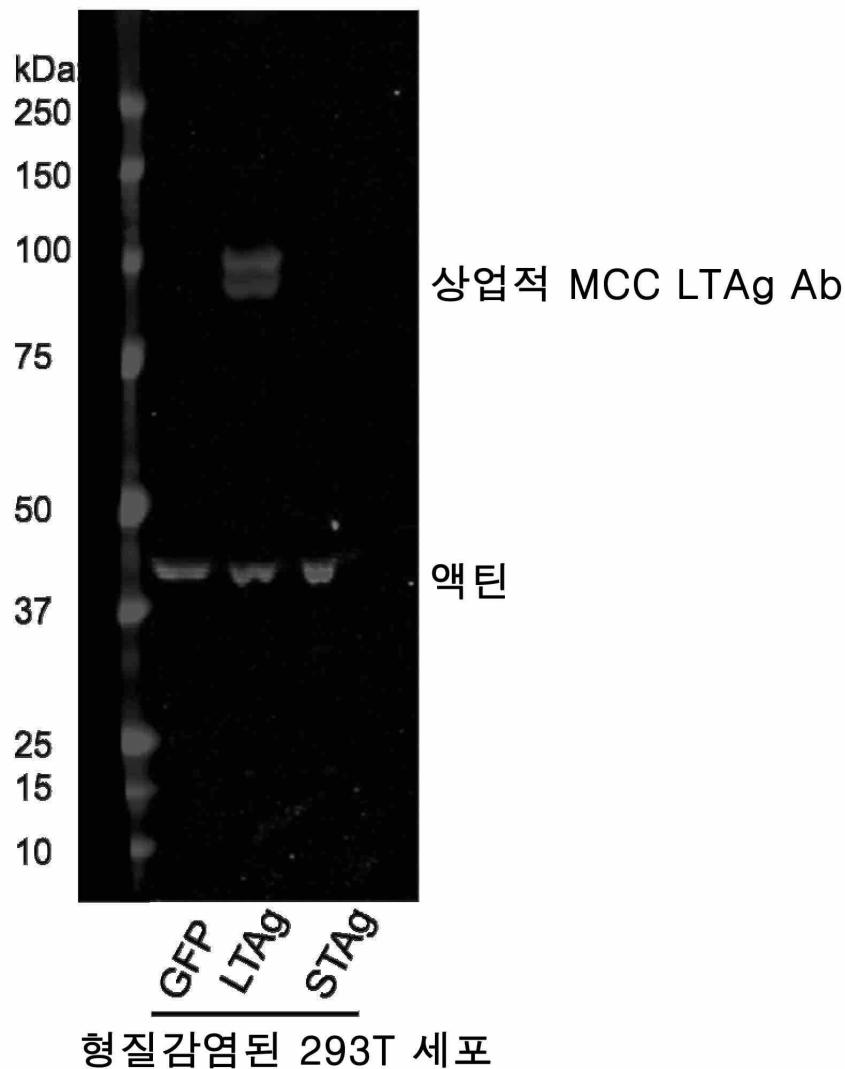
B MCC 작은 T 형원



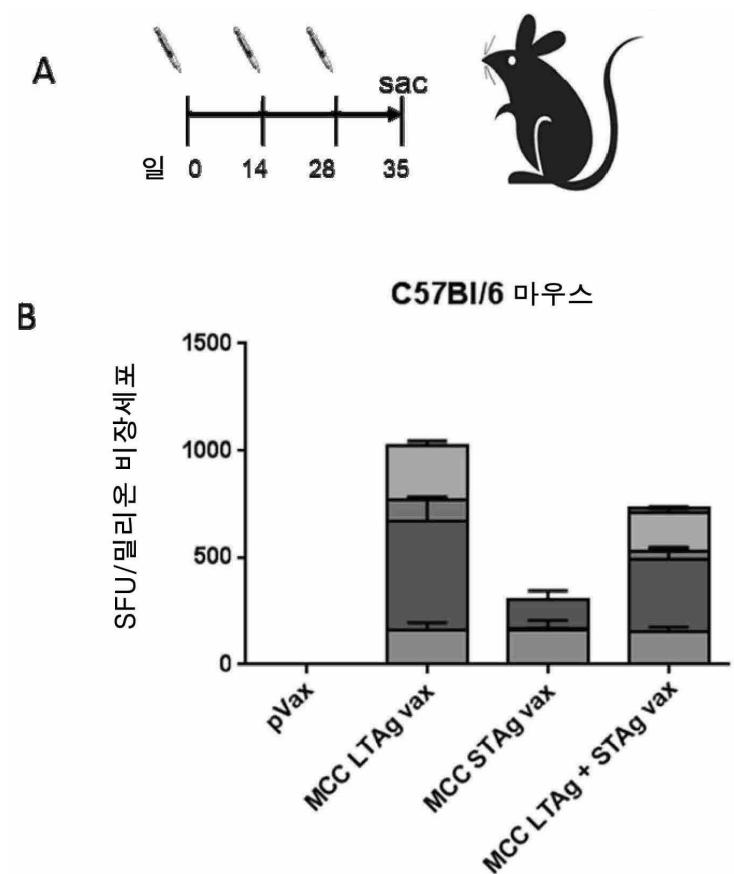
A MCC 큰 T 형원



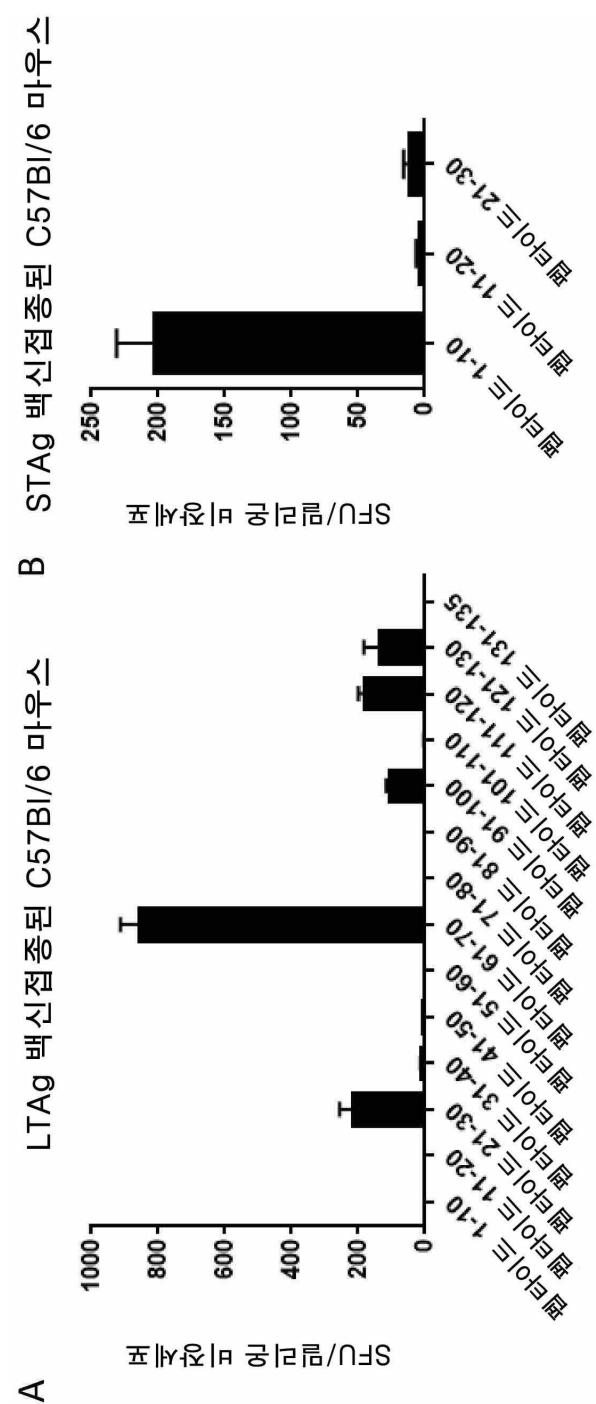
도면3



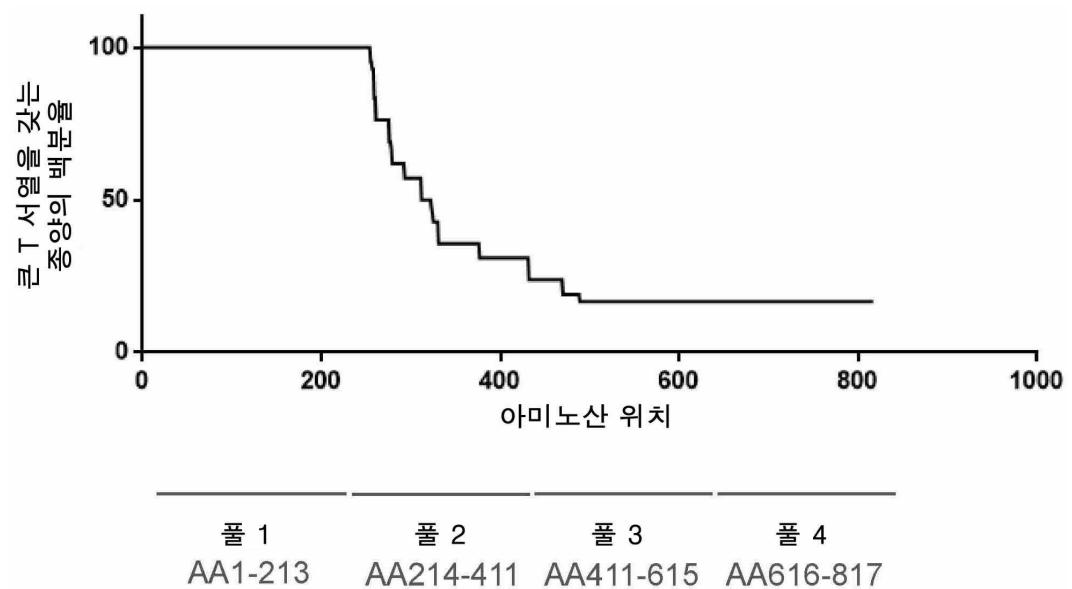
도면4



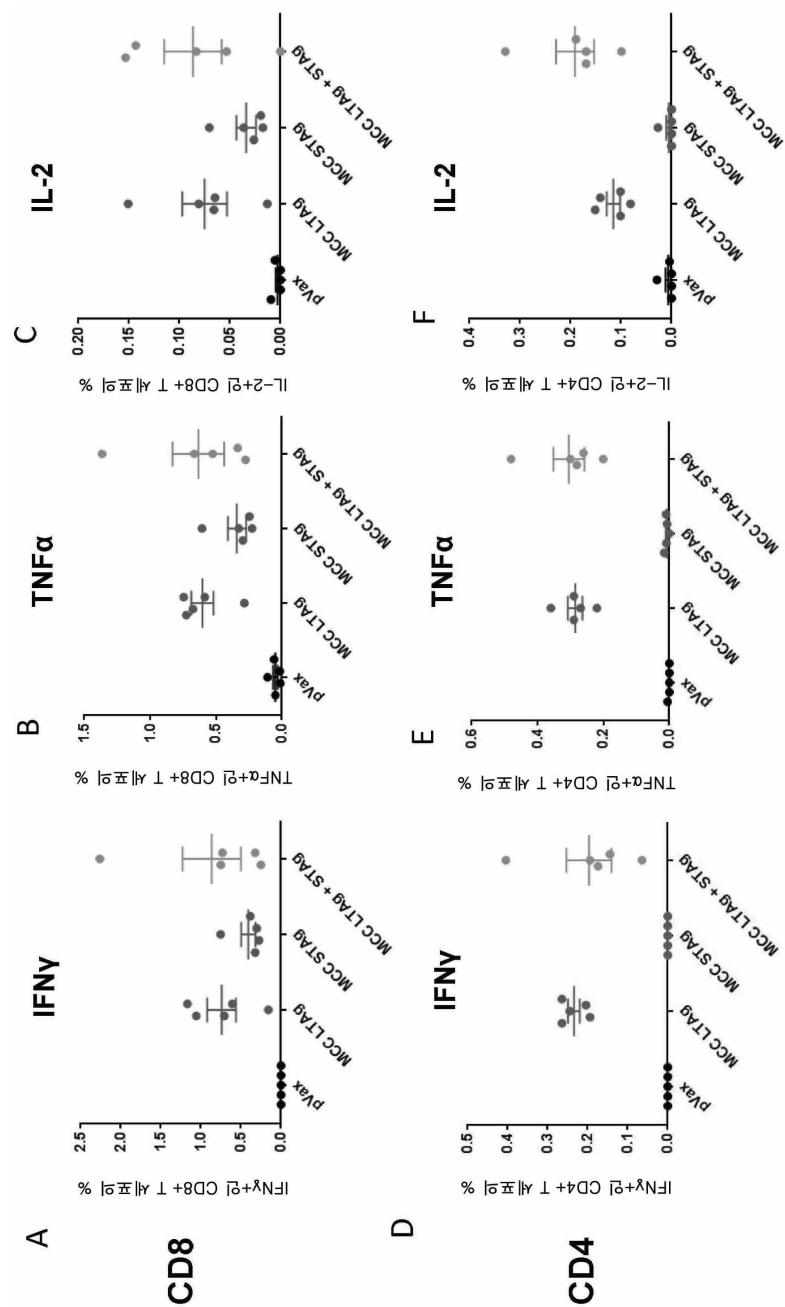
도면5



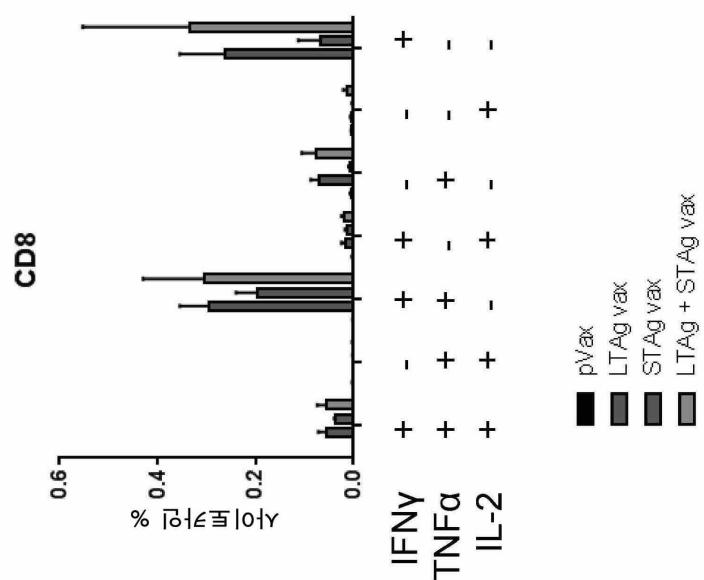
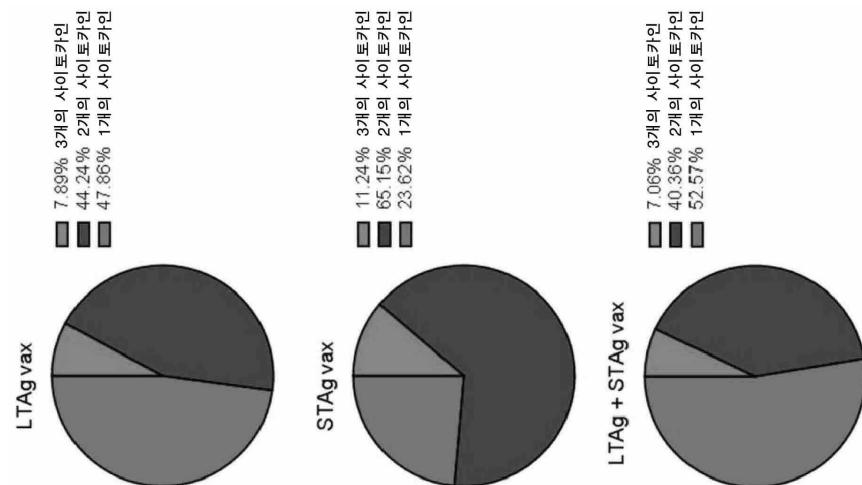
도면6



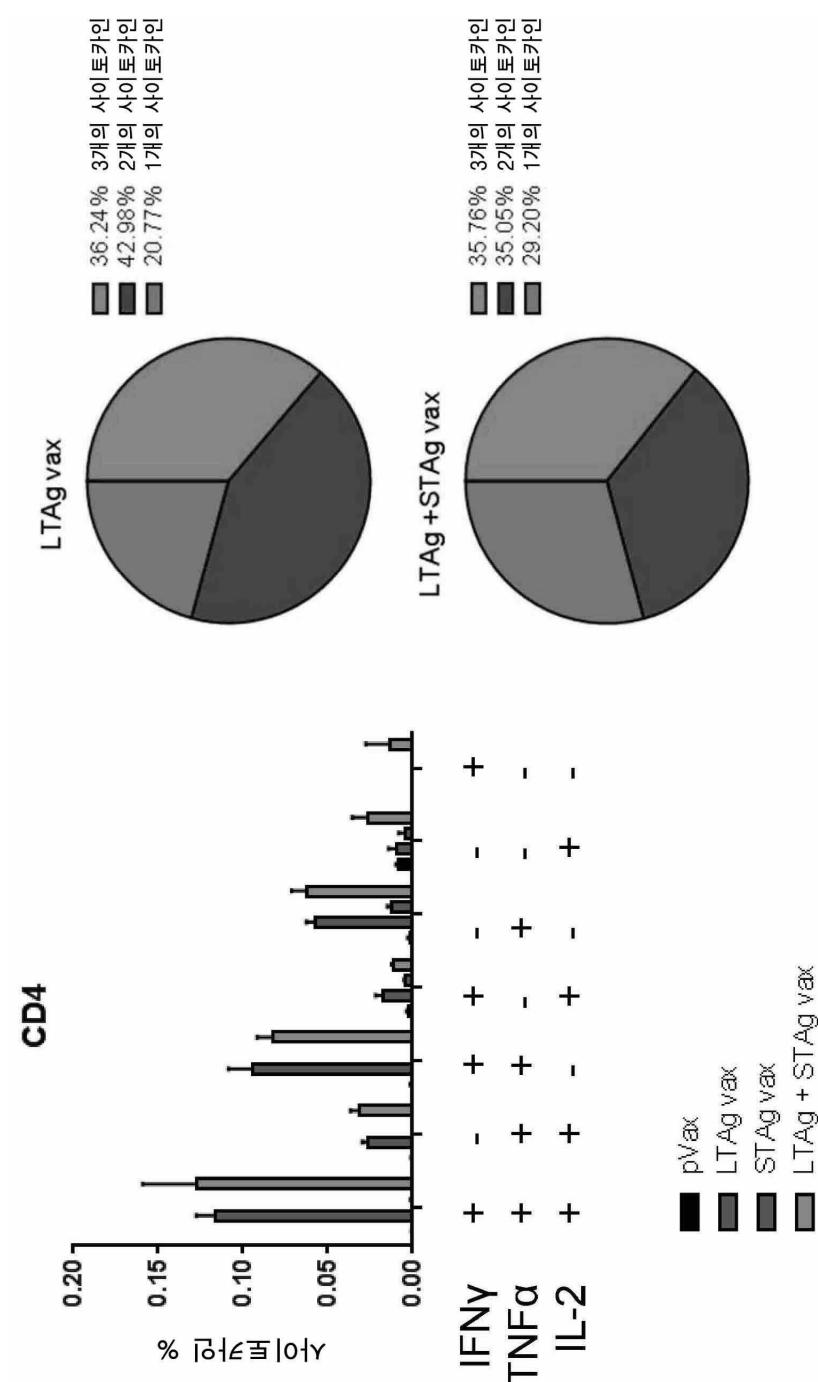
도면7



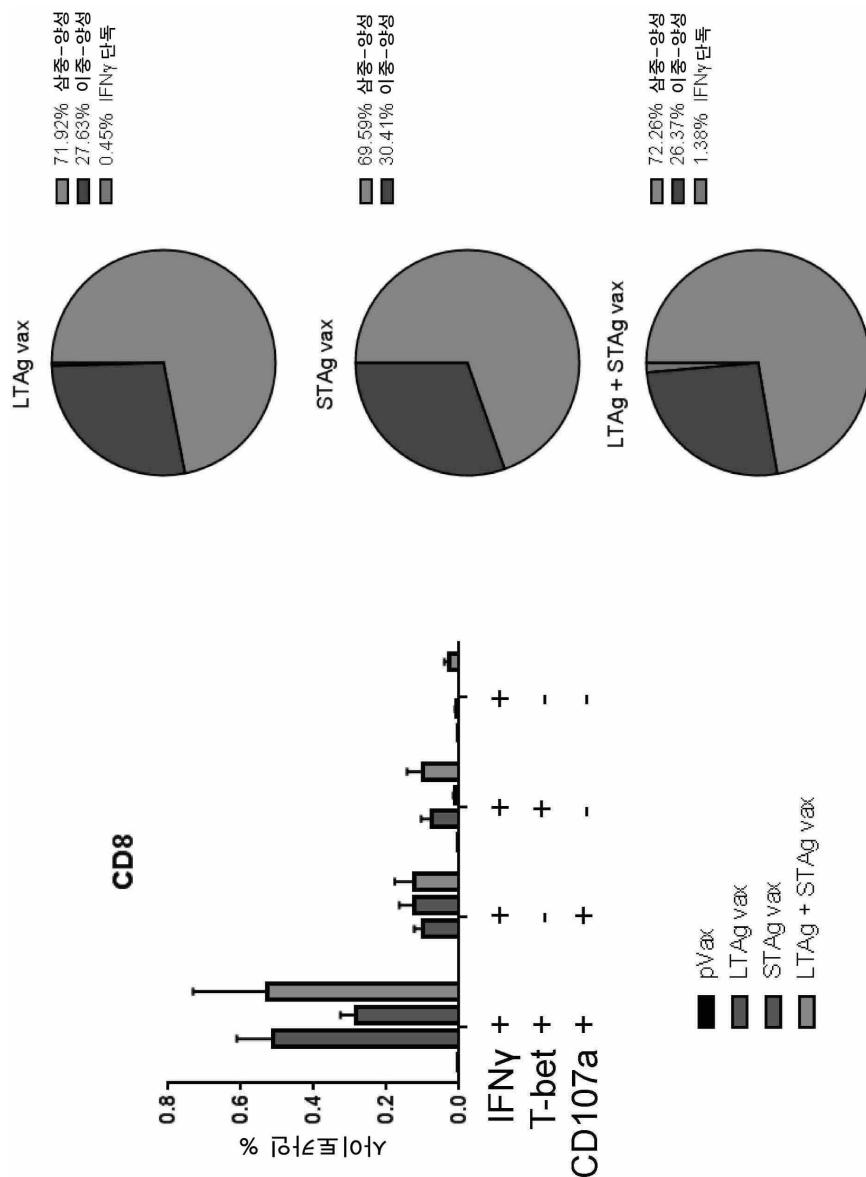
도면8



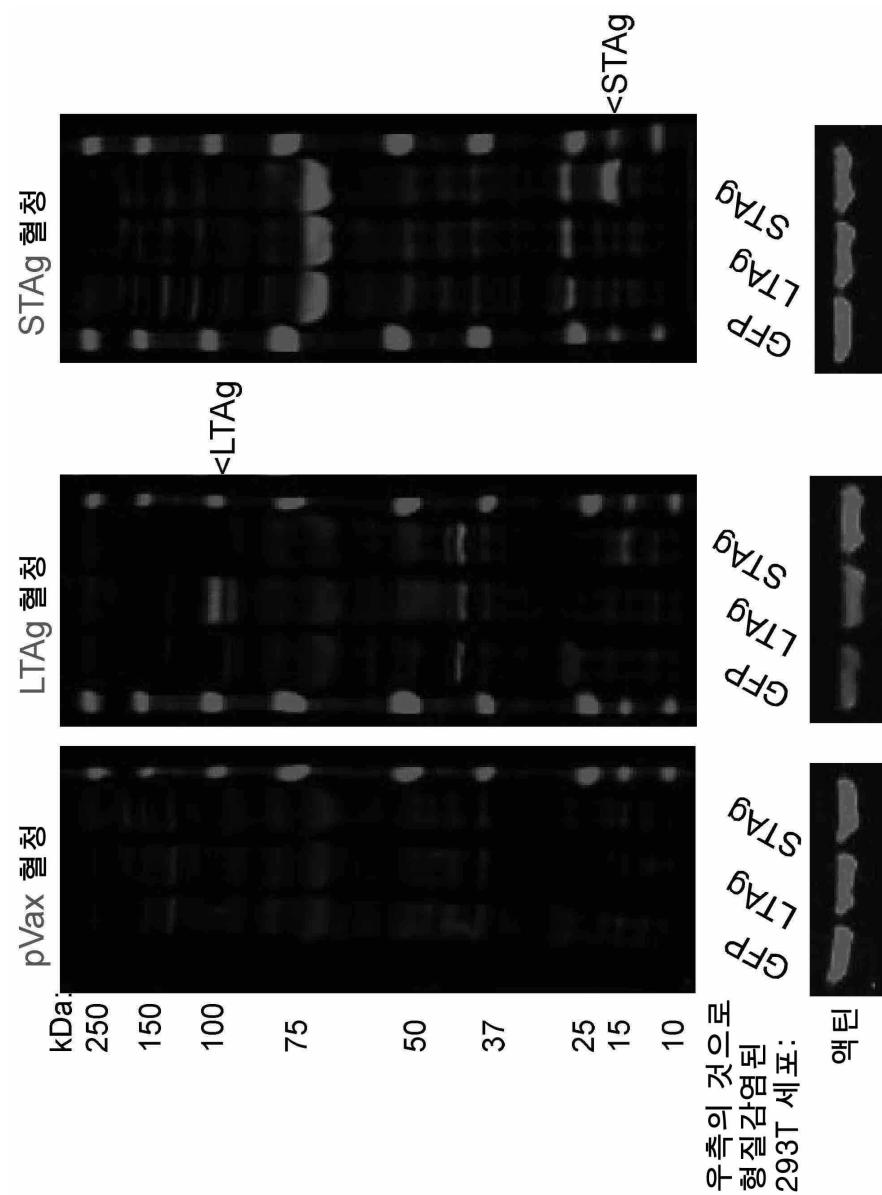
도면9



도면10

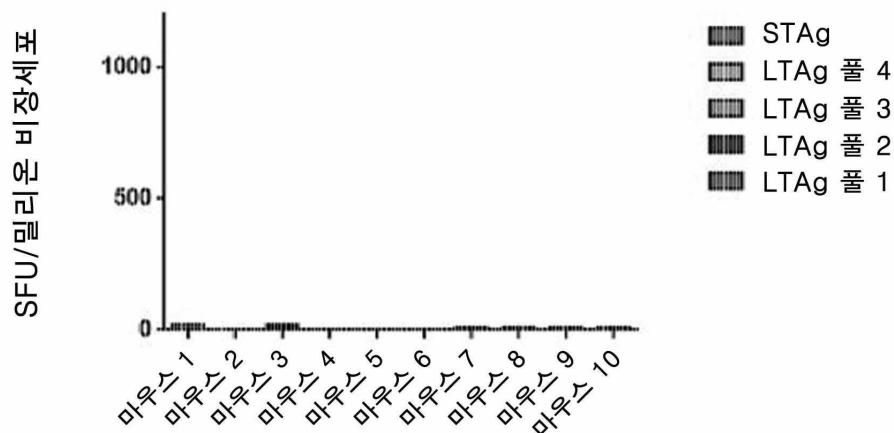


도면11

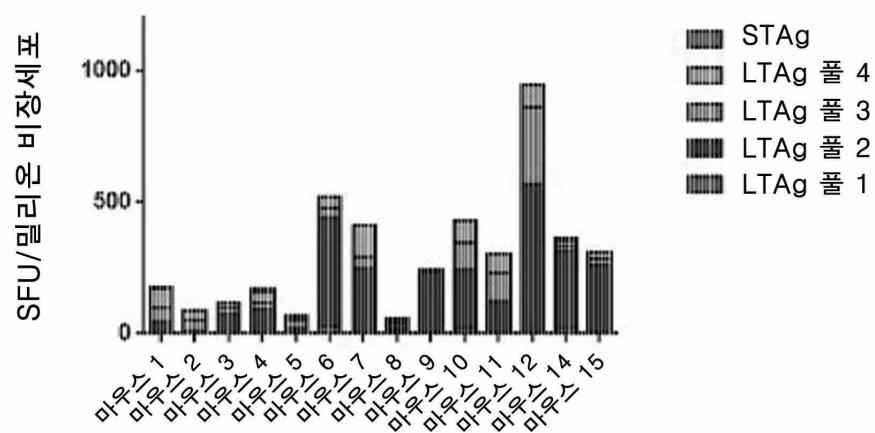


도면12

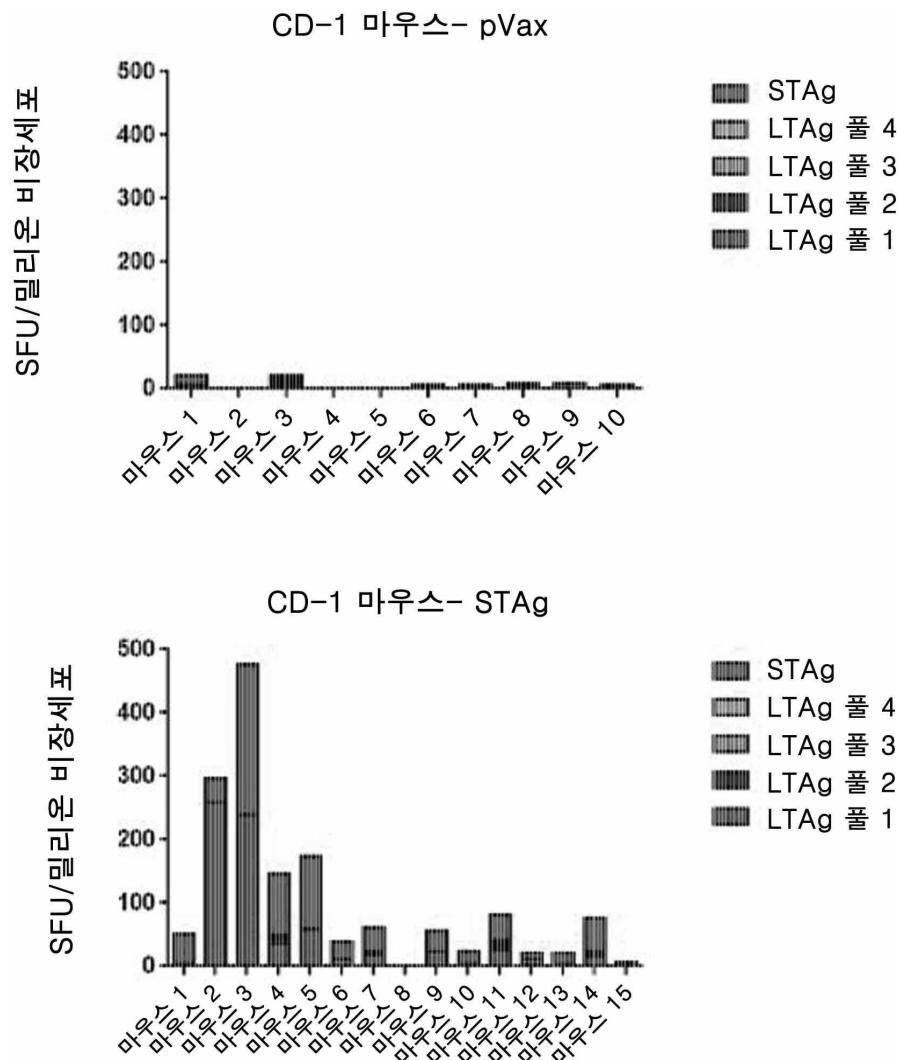
CD-1 마우스- pVax



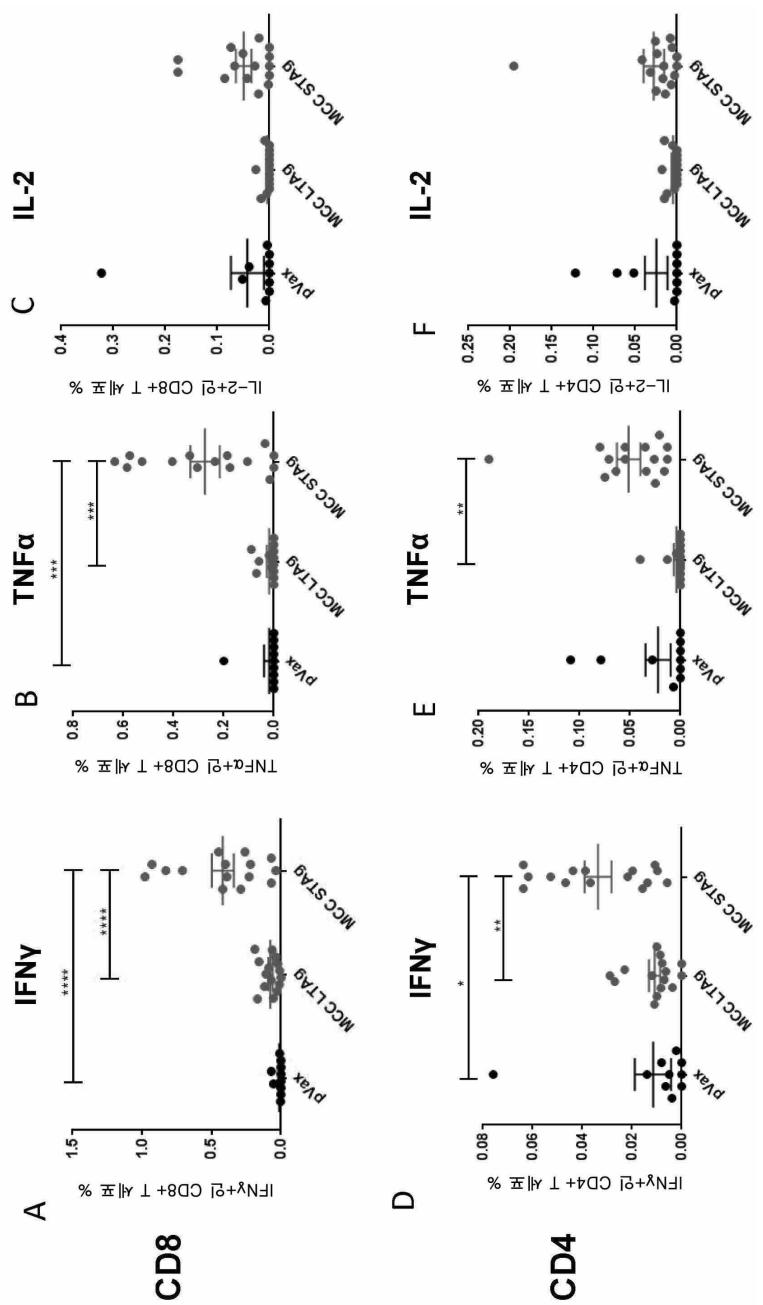
CD-1 마우스- LTag



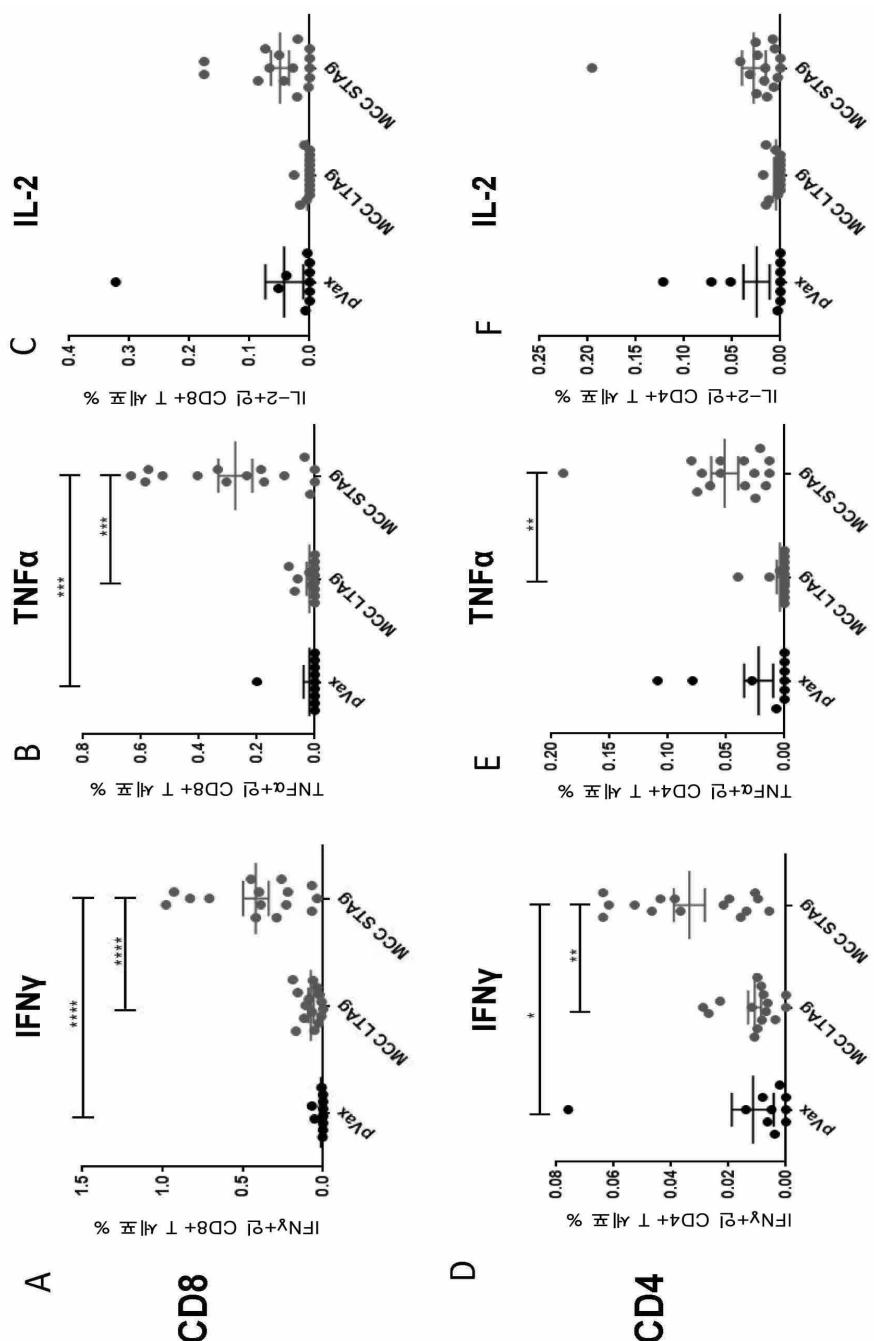
도면13



도면 14



도면15



서 열 목록

- <110> The Wistar Institute of Anatomy and Biology
 Weiner, David B.
 Duperret, Elizabeth
- <120> Large and Small T Antigens of Merkel Cell Polyomavirus, Nucleic Acid Constructs and Vaccines Made Therefrom, and Methods of Using
 Same
- <130> MPI20-011

<150> US 62/619161

<151> 2018-01-19

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2451

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding modified synthetic consensus MCV

LTag

<400> 1

atggacctgg tgcgtgaacag gaaggagaga gaggccctgt gcaagctgct ggagatcgcc	60
cccaactgtt acggcaatat ccctctgtat aaggccgcct tcaagcggag ctgcctgaag	120
caccacccca acaagggcgg caaccctgtg atcatgtatgg agctgaatac cctgtggcc	180
aagtttcagc agaatatcca caagctgcgg tccgatttct ctatgttga cgagggtggat	240
gaggcccta tctacggcac caccaagttc aaggagtggt ggcgcctccgg cggcttctct	300
tttggcaagg cctacgagta cggccctaacc cacacaggca ccaatagcag gtccagaaag	360
ccaagctcca acggcagcag gggagcacca tccggatcta gcccacctca cagccagtcc	420
tctagctccg gctacggctc ttttagcgcc tcccaggcct ctgacagcca gtccagaggc	480
cccgatatcc caccggagca ccacgaggag cctacctcta gctccggctc tagctccgg	540
gaggagacaa ccaacagcgg cagggagtct agcaccctaa acggcacctc cgtgccaagg	600
aattcctcta ggaccgacgg aaccggccgag gacctgttct gcgataagtc cctgagctcc	660
cctgagccctc catctagctc cgaggagcca gaggagcccc ctcttagcag gtcctctccc	720
agacagccac caagctcctc tgccgaggag gcaagctcct ctctagttcac cgacgaggag	780
tacaggagct cctttttac cacccttaag accccctccac cttctcccg gaagcgcaag	840
tttggaggct ctaggagctc cgcctctagc gcctctctg ccagcttac ctccacccct	900
ccaaagccca agaagaacag agagacaccc gtgcctaccg actttcttat cgacctgagc	960
gattacctgt cccacggcgt gtactctaatt aagaccgtga gctgtttcgc catctacacc	1020
accagcgaca aggccatcga gctgtacgt aagatcgaga agttcaaggt ggacttcaag	1080
tccaggcacg catgcgagct gggatgtatc ctgctgttca tcaccctgtc caagcaccgc	1140
gtgtctgcca tcaagaactt ctgcagcacc tttgtacca ttcctttct gatctgcaag	1200

ggcgtgaata agatgcctga gatgtacaac aacctgtca agccccccta caagctgctg	1260
caggagaaca agccactgct gaattacgag ttccaggaga aggagaagga ggccagctgc	1320
aactggaatc tggggccga gttcgctgt gagtacgagc tggacgtca ctatcatc	1380
ctggccact acctggactt cgccaaagcca tttccctgcc agaagtgtga gaacaggct	1440
agactgaagc cacacaaggc ccacgaggcc caccactcca atgccaagct gtttacgag	1500
tctaagagcc agaagaccat ctgccagcag gcagcagaca ccgtgctggc aaagaggaga	1560
ctggagatgc tggagatgac caggaccgag atgctgtca agaagttcaa gaagcacctg	1620
gagcggctgc gcgacctgga taccatcgat ctgctgtact acatggcgg cgtggcctgg	1680
tactgctgtc tggcgagga gtttggaaag aagctgcaga agatcatcca gctgctgacc	1740
gagaacatcc caaagtacag aaatatctgg ttcaaggccc ccatcaactc tggcaagacc	1800
agcttcgccc ccgcctgtat cgacctgctg gaggcaagg ccctgaacat caattgcct	1860
agcgataagc tgccattcga gctggcgtgt gcccggaca agttcatggt ggtttttag	1920
gatgtgaagg gccagaactc cctgaataag gacctgcagc cggccaggg catcaacaat	1980
ctggataacc tgcgggacca cctggatgga gcagtggccg tgaggctgga gaagaagcac	2040
gtgaacaaga agcaccagat cttccaccc tgcattgtca ccgcataatga ctactttatc	2100
ccaaagaccc tgcgtcccg cttctttac accctgcact ttagcccaa ggccaaacctg	2160
agggacagcc tggatcagaa tatggagatc agaaagaggc gcatcctgca gtccggacc	2220
accctgtgc tgcgtgtat ctgggtctg cctgacacca cttcaagcc atgcctgcag	2280
gaggagatca agaactggaa gcagatcctg cagtctgaga ttagtacgg caagtttgt	2340
cagatgatcg agaacgtgga ggccggccag gacccctgc tgaatatcct gatcgaggag	2400
gaggggccag aggagacaga ggagacacag gactccggca cttctctca g	2451
<210> 2	
<211> 817	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of modified synthetic consensus MCV LTag

<400> 2

Met Asp Leu Val Leu Asn Arg Lys Glu Arg Glu Ala Leu Cys Lys Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Glu Ile Ala Pro Asn Cys Tyr Gly Asn Ile Pro Leu Met Lys Ala

20	25	30
----	----	----

Ala Phe Lys Arg Ser Cys Leu Lys His His Pro Asn Lys Gly Gly Asn

35 40 45

Pro Val Ile Met Met Glu Leu Asn Thr Leu Trp Ser Lys Phe Gln Gln

50 55 60

Asn Ile His Lys Leu Arg Ser Asp Phe Ser Met Phe Asp Glu Val Asp

65 70 75 80

Glu Ala Pro Ile Tyr Gly Thr Thr Lys Phe Lys Glu Trp Trp Arg Ser

85 90 95

Gly Gly Phe Ser Phe Gly Lys Ala Tyr Glu Tyr Gly Pro Asn Pro His

100 105 110

Gly Thr Asn Ser Arg Ser Arg Lys Pro Ser Ser Asn Ala Ser Arg Gly

115 120 125

Ala Pro Ser Gly Ser Ser Pro Pro His Ser Gln Ser Ser Ser Gly

130 135 140

Tyr Gly Ser Phe Ser Ala Ser Gln Ala Ser Asp Ser Gln Ser Arg Gly

145 150 155 160

Pro Asp Ile Pro Pro Glu His His Glu Glu Pro Thr Ser Ser Ser Gly

165 170 175

Ser Ser Ser Arg Glu Glu Thr Thr Asn Ser Gly Arg Glu Ser Ser Thr

180 185 190

Pro Asn Gly Thr Ser Val Pro Arg Asn Ser Ser Arg Thr Asp Gly Thr

195 200 205

Ala Glu Asp Leu Phe Cys Asp Lys Ser Leu Ser Ser Pro Glu Pro Pro

210 215 220

Ser Ser Ser Glu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Ser Ser Arg Ser Ser Pro

225 230 235 240

Arg Gln Pro Pro Ser Ser Ala Glu Glu Ala Ser Ser Ser Gln Phe

245 250 255

Thr Asp Glu Glu Tyr Arg Ser Ser Ser Phe Thr Thr Pro Lys Thr Pro

260 265 270

Pro Pro Phe Ser Arg Lys Arg Lys Phe Gly Gly Ser Arg Ser Ser Ala

275	280	285
Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Phe Thr Ser Thr Pro Pro Lys Pro Lys		
290	295	300
Lys Asn Arg Glu Thr Pro Val Pro Thr Asp Phe Pro Ile Asp Leu Ser		
305	310	315
Asp Tyr Leu Ser His Ala Val Tyr Ser Asn Lys Thr Val Ser Cys Phe		
325	330	335
Ala Ile Tyr Thr Ser Asp Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Asp Lys Ile		
340	345	350
Glu Lys Phe Lys Val Asp Phe Lys Ser Arg His Ala Cys Glu Leu Gly		
355	360	365
Cys Ile Leu Leu Phe Ile Thr Leu Ser Lys His Arg Val Ser Ala Ile		
370	375	380
Lys Asn Phe Cys Ser Thr Phe Cys Thr Ile Ser Phe Leu Ile Cys Lys		
385	390	395
Gly Val Asn Lys Met Pro Glu Met Tyr Asn Asn Leu Cys Lys Pro Pro		
405	410	415
Tyr Lys Leu Leu Gln Glu Asn Lys Pro Leu Leu Asn Tyr Glu Phe Gln		
420	425	430
Glu Lys Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asn Trp Asn Leu Val Ala Glu Phe		
435	440	445
Ala Cys Glu Tyr Glu Leu Asp Asp His Phe Ile Ile Leu Ala His Tyr		
450	455	460
Leu Asp Phe Ala Lys Pro Phe Pro Cys Gln Lys Cys Glu Asn Arg Ser		
465	470	475
Arg Leu Lys Pro His Lys Ala His Glu Ala His His Ser Asn Ala Lys		
485	490	495
Leu Phe Tyr Glu Ser Lys Ser Gln Lys Thr Ile Cys Gln Gln Ala Ala		
500	505	510
Asp Thr Val Leu Ala Lys Arg Arg Leu Glu Met Leu Glu Met Thr Arg		
515	520	525
Thr Glu Met Leu Cys Lys Lys Phe Lys Lys His Leu Glu Arg Leu Arg		

530	535	540
Asp Leu Asp Thr Ile Asp Leu Leu Tyr Tyr Met Gly Gly Val Ala Trp		
545	550	555
560		
Tyr Cys Cys Leu Phe Glu Glu Phe Glu Lys Lys Leu Gln Lys Ile Ile		
565	570	575
Gln Leu Leu Thr Glu Asn Ile Pro Lys Tyr Arg Asn Ile Trp Phe Lys		
580	585	590
Gly Pro Ile Asn Ser Gly Lys Thr Ser Phe Ala Ala Ala Leu Ile Asp		
595	600	605
Leu Leu Glu Gly Lys Ala Leu Asn Ile Asn Cys Pro Ser Asp Lys Leu		
610	615	620
Pro Phe Glu Leu Gly Cys Ala Leu Asp Lys Phe Met Val Val Phe Glu		
625	630	635
640		
Asp Val Lys Gly Gln Asn Ser Leu Asn Lys Asp Leu Gln Pro Gly Gln		
645	650	655
Gly Ile Asn Asn Leu Asp Asn Leu Arg Asp His Leu Asp Gly Ala Val		
660	665	670
Ala Val Ser Leu Glu Lys Lys His Val Asn Lys Lys His Gln Ile Phe		
675	680	685
Pro Pro Cys Ile Val Thr Ala Asn Asp Tyr Phe Ile Pro Lys Thr Leu		
690	695	700
Ile Ala Arg Phe Ser Tyr Thr Leu His Phe Ser Pro Lys Ala Asn Leu		
705	710	715
720		
Arg Asp Ser Leu Asp Gln Asn Met Glu Ile Arg Lys Arg Arg Ile Leu		
725	730	735
Gln Ser Gly Thr Thr Leu Leu Leu Cys Leu Ile Trp Cys Leu Pro Asp		
740	745	750
Thr Thr Phe Lys Pro Cys Leu Gln Glu Glu Ile Lys Asn Trp Lys Gln		
755	760	765
Ile Leu Gln Ser Glu Ile Ser Tyr Gly Lys Phe Cys Gln Met Ile Glu		
770	775	780

Asn Val Glu Ala Gly Gln Asp Pro Leu Leu Asn Ile Leu Ile Glu Glu
 785 790 795 800
 Glu Gly Pro Glu Glu Thr Glu Glu Thr Gln Asp Ser Gly Thr Phe Ser
 805 810 815
 Gln

<210> 3
 <211> 558
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence encoding modified synthetic consensus MCV

STAg

<400> 3

atggacctgg tgctgaaccg aaaggagagg gaggccctgt gcaagctgct ggagatcgcc 60

cctaactgtt acggcaatat cccactgatg aaggccgcct tcaagaggtc ttgcctgaag 120
 caccacccaa acaagggcgg caatccctg atcatgatgg agctgaacac cctgtggagc 180
 aagtttcagc agaatatcca caagctgcgg agcgacttct ccatgttga tgaggtgagc 240
 accaagtcc cctgggagga gtacggaaca gcagcagcag cagcacagtc cggctataac 300
 gccaggttt gcagaggccc tggctgtatg ctgaaggcgc tgccggactc caagtgcgcc 360
 tgtatcttt gcaagctgag ccgccagcac tttctctga agaccctgaa gcagaagaat 420
 tgcgccacat gggcgagtg cttctgttat cagtgtttta tcctgtgggtt cggcttccc 480

cctacatggg agtccttcga ttggtggcag aaaaccctgg aagaaaccga ctactgtctg 540
 ctgcacatgc atctgttc 558

<210> 4
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of modified synthetic consensus MCV STAg

<400> 4

Met Asp Leu Val Leu Asn Arg Lys Glu Arg Glu Ala Leu Cys Lys Leu

1 5 10 15

Leu Glu Ile Ala Pro Asn Cys Tyr Gly Asn Ile Pro Leu Met Lys Ala

20	25	30
Ala Phe Lys Arg Ser Cys Leu Lys His His Pro Asn Lys Gly Gly Asn		
35	40	45
Pro Val Ile Met Met Glu Leu Asn Thr Leu Trp Ser Lys Phe Gln Gln		
50	55	60
Asn Ile His Lys Leu Arg Ser Asp Phe Ser Met Phe Asp Glu Val Ser		
65	70	75
Thr Lys Phe Pro Trp Glu Glu Tyr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Gln		
85	90	95

Ser Gly Tyr Asn Ala Arg Phe Cys Arg Gly Pro Gly Cys Met Leu Lys		
100	105	110
Gln Leu Arg Asp Ser Lys Cys Ala Cys Ile Ser Cys Lys Leu Ser Arg		
115	120	125
Gln His Cys Ser Leu Lys Thr Leu Lys Gln Lys Asn Cys Ala Thr Trp		
130	135	140
Gly Glu Cys Phe Cys Tyr Gln Cys Phe Ile Leu Trp Phe Gly Phe Pro		
145	150	155
Pro Thr Trp Glu Ser Phe Asp Trp Trp Gln Lys Thr Leu Glu Glu Thr		

165	170	175
Asp Tyr Cys Leu Leu His Leu His Leu Phe		
180	185	
<210>	5	
<211>	3027	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide sequence encoding modified synthetic consensus LTag		
and STAg linked with a furin cleavage site		

<400>	5	
atggacacctgg tgcgtgaacag gaaggagaga gaggccctgt gcaagctgct ggagatcgcc		60
cccaactgtt acggcaatat ccctctgtat aaggccgcct tcaagcggag ctgcctgaag		120

caccacccca acaagggcgg caaccctgtg atcatgtatgg agctgaatac cctgtggcc		180
aagtttcagc agaatatcca caagctgcgg tccgatttct ctatgttga cgagggtggat		240

gaggccccta tctacggcac caccaagttc aaggagtggt ggccgtccgg cggcttctct	300
tttggcaagg cctacgagta cggccctaac ccacacggca ccaatagcag gtccagaaag	360
ccaagctcca acgccagcag gggagcacca tccggatcta gcccacctca cagccagtcc	420
tctagctccg gctacggctc ttttagcgcc tcccaggcct ctgacagcca gtccagaggc	480
cccgatatcc caccggagca ccacgaggag cctacctcta gctccggctc tagctccgg	540
gaggagacaa ccaacagcgg cagggagtct agcacccaa acggcacctc cgtgccaagg	600
aattcctcta ggaccgacgg aaccggcag gacctgttct gcgataagtc cctgagctcc	660
cctgagcctc catctagctc cgaggagcca gaggagcccc ctctagcag gtcctctccc	720
agacagccac caagctcctc tgccgaggag gcaagctcct ctcaagtac cgacgaggag	780
tacaggagct cctctttac cacccctaag acccctccac cttctcccg gaagcgcag	840
tttgaggct ctaggagctc cgcctctagc gcctctctg ccagcttac acccaccct	900
ccaaagccca agaagaacag agagacaccc gtgcctaccg acttcctat cgacctgagc	960
gattacctgt cccacgcccgt gtactcta aagaccgtga gctgtttcgc catctacacc	1020
accagcgaca aggccatcga gctgtacgt aagatcgaga agtcaaggt ggacttcaag	1080
tccaggcacg catgcgagct gggatgtatc ctgctgttca tcaccctgtc caagcaccgc	1140
gtgtctgcca tcaagaactt ctgcagcacc tttgtacca ttcctttct gatgtcaag	1200
ggcgtgaata agatgcctga gatgtacaac aacctgtca agccccctta caagctgctg	1260
caggagaaca agccactgct gaattacgag ttccaggaga aggagaagga ggccagctgc	1320
aactggaatc tggtgccga gttcgctgt gagtacgagc tggacgatca ctatcatc	1380
ctggcccact acctggactt cgccaaagcca tttccctgcc agaagtgtga gaacaggct	1440
agactgaagc cacacaaggc ccacgaggcc caccactcca atgccaagct gtttacgag	1500
tctaagagcc agaagaccat ctgccagcag gcagcagaca ccgtgtggc aaagaggaga	1560
ctggagatgc tggagatgac caggaccgag atgctgtca agaagtcaa gaagcacctg	1620
gagccgtgc gcgacctgga taccatcgat ctgctgtact acatggcgg cgtggcctgg	1680
tactgctgtc tttcgagga gtttgagaag aagatgcaga agatcatcca gctgtgacc	1740
gagaacatcc caaagtacag aaatatctgg ttcaaggccc ccatcaactc tggcaagacc	1800
agcttcgccc cgcctgtat cgacctgtg gaggcaagg ccctgaacat caatggcct	1860
agcgataagc tgccattcga gctggcgtgt gcccggaca agttcatggt ggtgttttag	1920
gatgtgaagg gccagaactc cctgaataag gacctgcagc ccggccaggg catcaacaat	1980
ctggataacc tgcgggacca cctggatgga gcagtggccg tgagcctgga gaagaagcac	2040
gtgaacaaga agcaccagat cttccaccc tgcacgtga ccgccaatga ctactttatc	2100

ccaaagaccc ttagccccaa ggccaacctg	2160
agggacagcc tggatcagaa tatggagatc agaaagaggc gcatcctgca gtccggacc	2220
accctgctgc tggcctgat ctgggtctg cctgacacca cttcaagcc atgcctgcag	2280
gaggagatca agaactggaa gcagatcctg cagtctgaga ttagctacgg caagtttgt	2340
cagatgatcg agaacgtgga ggccggccag gacccctgc tgaatatcct gatcaggag	2400
gagggcccg aggagacaga ggagacacag gactccggca cttctctca gagaggccgc	2460
aaaaggaggt ctgatctggt gctgaatcgg aaagagagag aagccctgtg caaactgctg	2520
gaaatcgccc caaactgtta cggcaacatc cccctgatga aggccgcctt caagaggct	2580
tgcctgaagc accacccaaa caagggcggc aatccgtga tcatgtgga gctgaacacc	2640
ctgtggagca agttttagca gaatatccac aagctgcgga gcgacttctc catgtttat	2700
gaggtgagca ccaagttccc ttgggaggag tacggaacag cagcagcagc agcacatcc	2760
ggctataacg ccaggtttg cagaggccca ggctgtatgc tgaagcagct gcgggactcc	2820
aagtgcgcct gatatcttg caagctgagc cgccagcact gttctctgaa gaccctgaa	2880
cagaagaatt ggcacatg gggcgagtgc ttctgttac agtgtttat cctgtggttc	2940
ggcttcccc ctacatggga gtccttcgat tggtggcaga aaaccctgga ggaaactgat	3000
tactgtctgc tgcacctgca cctgttc	3027

<210> 6

<211> 1009

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of modified synthetic consensus LTag and STAg
linked with a furin cleavage site

<400> 6

Met Asp Leu Val Leu Asn Arg Lys Glu Arg Glu Ala Leu Cys Lys Leu

1 5 10 15

Leu Glu Ile Ala Pro Asn Cys Tyr Gly Asn Ile Pro Leu Met Lys Ala

20 25 30

Ala Phe Lys Arg Ser Cys Leu Lys His His Pro Asn Lys Gly Gly Asn

35 40 45

Pro Val Ile Met Met Glu Leu Asn Thr Leu Trp Ser Lys Phe Gln Gln

50 55 60

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

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

 180 185 190
 Pro Asn Gly Thr Ser Val Pro Arg Asn Ser Ser Arg Thr Asp Gly Thr
 195 200 205
 Ala Glu Asp Leu Phe Cys Asp Lys Ser Leu Ser Ser Pro Glu Pro Pro
 210 215 220
 Ser Ser Ser Glu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Ser Ser Arg Ser Ser Pro
 225 230 235 240
 Arg Gln Pro Pro Ser Ser Ala Glu Glu Ala Ser Ser Ser Gln Phe
 245 250 255

 Thr Asp Glu Glu Tyr Arg Ser Ser Phe Thr Thr Pro Lys Thr Pro
 260 265 270
 Pro Pro Phe Ser Arg Lys Arg Lys Phe Gly Gly Ser Arg Ser Ser Ala
 275 280 285
 Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Phe Thr Ser Thr Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300
 Lys Asn Arg Glu Thr Pro Val Pro Thr Asp Phe Pro Ile Asp Leu Ser
 305 310 315 320

Asp Tyr Leu Ser His Ala Val Tyr Ser Asn Lys Thr Val Ser Cys Phe

325 330 335

Ala Ile Tyr Thr Thr Ser Asp Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Asp Lys Ile

340 345 350

Glu Lys Phe Lys Val Asp Phe Lys Ser Arg His Ala Cys Glu Leu Gly

355 360 365

Cys Ile Leu Leu Phe Ile Thr Leu Ser Lys His Arg Val Ser Ala Ile

370 375 380

Lys Asn Phe Cys Ser Thr Phe Cys Thr Ile Ser Phe Leu Ile Cys Lys

385 390 395 400

Gly Val Asn Lys Met Pro Glu Met Tyr Asn Asn Leu Cys Lys Pro Pro

405 410 415

Tyr Lys Leu Leu Gln Glu Asn Lys Pro Leu Leu Asn Tyr Glu Phe Gln

420 425 430

Glu Lys Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asn Trp Asn Leu Val Ala Glu Phe

435 440 445

Ala Cys Glu Tyr Glu Leu Asp Asp His Phe Ile Ile Leu Ala His Tyr

450 455 460

Leu Asp Phe Ala Lys Pro Phe Pro Cys Gln Lys Cys Glu Asn Arg Ser

465 470 475 480

Arg Leu Lys Pro His Lys Ala His Glu Ala His His Ser Asn Ala Lys

485 490 495

Leu Phe Tyr Glu Ser Lys Ser Gln Lys Thr Ile Cys Gln Gln Ala Ala

500 505 510

Asp Thr Val Leu Ala Lys Arg Arg Leu Glu Met Leu Glu Met Thr Arg

515 520 525

Thr Glu Met Leu Cys Lys Lys Phe Lys Lys His Leu Glu Arg Leu Arg

530 535 540

Asp Leu Asp Thr Ile Asp Leu Leu Tyr Tyr Met Gly Gly Val Ala Trp

545 550 555 560

Tyr Cys Cys Leu Phe Glu Glu Phe Glu Lys Lys Leu Gln Lys Ile Ile

565	570	575
Gln Leu Leu Thr Glu Asn Ile Pro Lys Tyr Arg Asn Ile Trp Phe Lys		
580	585	590
Gly Pro Ile Asn Ser Gly Lys Thr Ser Phe Ala Ala Ala Leu Ile Asp		
595	600	605
Leu Leu Glu Gly Lys Ala Leu Asn Ile Asn Cys Pro Ser Asp Lys Leu		
610	615	620
Pro Phe Glu Leu Gly Cys Ala Leu Asp Lys Phe Met Val Val Phe Glu		
625	630	635
Asp Val Lys Gly Gln Asn Ser Leu Asn Lys Asp Leu Gln Pro Gly Gln		
645	650	655
Gly Ile Asn Asn Leu Asp Asn Leu Arg Asp His Leu Asp Gly Ala Val		
660	665	670
Ala Val Ser Leu Glu Lys Lys His Val Asn Lys Lys His Gln Ile Phe		
675	680	685
Pro Pro Cys Ile Val Thr Ala Asn Asp Tyr Phe Ile Pro Lys Thr Leu		
690	695	700
Ile Ala Arg Phe Ser Tyr Thr Leu His Phe Ser Pro Lys Ala Asn Leu		
705	710	715
Arg Asp Ser Leu Asp Gln Asn Met Glu Ile Arg Lys Arg Arg Ile Leu		
725	730	735
Gln Ser Gly Thr Thr Leu Leu Leu Cys Leu Ile Trp Cys Leu Pro Asp		
740	745	750
Thr Thr Phe Lys Pro Cys Leu Gln Glu Ile Lys Asn Trp Lys Gln		
755	760	765
Ile Leu Gln Ser Glu Ile Ser Tyr Gly Lys Phe Cys Gln Met Ile Glu		
770	775	780
Asn Val Glu Ala Gly Gln Asp Pro Leu Leu Asn Ile Leu Ile Glu Glu		
785	790	795
Glu Gly Pro Glu Glu Thr Glu Glu Thr Gln Asp Ser Gly Thr Phe Ser		
805	810	815
Gln Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asp Leu Val Leu Asn Arg Lys Glu		

820 825 830

Arg Glu Ala Leu Cys Lys Leu Leu Glu Ile Ala Pro Asn Cys Tyr Gly

835 840 845

Asn Ile Pro Leu Met Lys Ala Ala Phe Lys Arg Ser Cys Leu Lys His

850 855 860

His Pro Asn Lys Gly Gly Asn Pro Val Ile Met Met Glu Leu Asn Thr

865 870 875 880

Leu Trp Ser Lys Phe Gln Gln Asn Ile His Lys Leu Arg Ser Asp Phe

885 890 895

Ser Met Phe Asp Glu Val Ser Thr Lys Phe Pro Trp Glu Glu Tyr Gly

900 905 910

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly Tyr Asn Ala Arg Phe Cys Arg

915 920 925

Gly Pro Gly Cys Met Leu Lys Gln Leu Arg Asp Ser Lys Cys Ala Cys

930 935 940

Ile Ser Cys Lys Leu Ser Arg Gln His Cys Ser Leu Lys Thr Leu Lys

945 950 955 960

Gln Lys Asn Cys Ala Thr Trp Gly Glu Cys Phe Cys Tyr Gln Cys Phe

965 970 975

Ile Leu Trp Phe Gly Phe Pro Pro Thr Trp Glu Ser Phe Asp Trp Trp

980 985 990

Gln Lys Thr Leu Glu Glu Thr Asp Tyr Cys Leu Leu His Leu His Leu

995 1000 1005

Phe

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of IgE leader sequence

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Thr Arg Val

1

5

10

15

His Ser