(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0063048
(43) 공개일자 2010년06월10일

(51) Int. Cl.
C07K 2/00 (2006.01) *C07H 21/00* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7004280
(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년07월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2010년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/071858
(87) 국제공개번호 WO 2009/018500
국제공개일자 2009년02월05일
(30) 우선권주장
61/007,895 2007년07월31일 미국(US)
61/022,173 2008년01월18일 미국(US)

(71) 출원인
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400
루이지애나 주립대 및 농학 및 기계학 칼리지의 이사회
미국 70803-6100 루이지애나주 배턴 루지 루이지애나 이머징 테크놀로지 206
(72) 발명자
베디 아툴
미국 매릴랜드주 21093 티모늄 데일우드 로드 2211
라비 라쟈니
미국 매릴랜드주 21204 럭스톤 볼스톤 로드 7810
리 슐린
미국 루이지애나주 70820 베톤 루지 리버벤드 레이크 드라이브 6322
(74) 대리인
김성기, 강승옥

전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 신생물성 또는 감염성 장애의 면역예방 또는 면역치료를 위한 폴리펩티드-핵산 접합체

(57) 요 약

본 발명은 항체/펩티드-핵산 접합체의 성질을 이용함으로써 표적 세포에서 면역 매개 및 직접적 사멸 시그널링의 교차-활성화를 유도하는 조성물을 개시한다. 접합체는 다중 사멸 시그널링 기전을 동시에 활성화할 수 있다. 감염성 질병, 신생물성 질병 또는 기타 장애를 치료 또는 예방하기 위한 면역치료 방식으로서 본 발명의 접합체를 이용한 방법.

특허청구의 범위

청구항 1

세포 성분 또는 특이적 분자에 결합하는 표적화 부분;

하나 이상의 핵산 분자(들); 및

하나 이상의 항원성 펩티드 또는 하나 이상의 폴리펩티드

를 포함하는 단리된 표적화 부분-생물학적 활성 제제 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적화 부분이 항체, 펩티드, 압타머, 리간드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포 성분이 종양 항원, 종양 관련 항원 또는 종양 세포 표면 분자인 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포 성분이 정상 세포 상에 존재하는 세포 표면 분자인 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포 성분이 면역 세포 상에 존재하는 분자인 접합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포 성분이 병원체 또는 미생물의 항원 또는 항원성 결정자인 접합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 성분이 항원 및 택(tag)을 포함하는 융합 단백질인 접합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자가 이중 가닥 DNA(ds DNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 다중 가닥 DNA, 이중 가닥 RNA(ds RNA), 단일 가닥 RNA(ssRNA), 다중 가닥 RNA, DNA-RNA 하이브리드(단일 가닥 또는 다중 가닥), 펩티드 핵산(PNA), PNA-DNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), PNA-RNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), 잠금(locked) 핵산(LNA), LNA-DNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥) 및 LNA-RNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥)로 구성된 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자가 표적 세포 내에서 전사 및/또는 번역되는 코딩 서열을 포함하는 접합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 코딩 서열이 DNA 플라스미드 또는 플라스미드로부터 유래된 DNA 분자인 접합체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 핵산 분자가 세포-특이적 발현 조절 요소에 작용적으로 연결된 관심 유전자를 포함하는, 부위-특이적 재조합에 의해 플라스미드로부터 생성된 원형 이중 가닥 DNA 분자를 포함하고, 상기 DNA 분자가 복제 기점 또는 임의적으로는 마커 유전자를 함유하지 않는 접합체.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 DNA 분자가 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화하도록 미리결정된 뉴클레오

티드 서열을 포함하는 접합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 상기 DNA 분자와 다중 가닥 핵산을 형성하도록 구성되는 접합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 선형 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA인 접합체.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 선형 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 하이브리드 DNA-LNA, 또는 DNA-PNA인 접합체.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 표적화 부분이 상기 올리고뉴클레오티드에 결합되고, 상기 올리고뉴클레오티드가 DNA 분자에 추가로 결합되는 접합체.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 표적화 부분이 압타머 분자인 접합체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 압타머가 상기 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함하는 접합체.

청구항 19

세포 성분에 결합하는 표적화 부분; 및 면역 반응을 증진시키도록 설계된 하나 이상의 산물을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 단리된 표적화 부분-생물학적 활성 제제 접합체.

청구항 20

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 면역 반응을 자극할 수 있는 이중 가닥 DNA을 포함하는 접합체.

청구항 21

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 PAMP를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 면역자극 분자를 포함하는 접합체.

청구항 22

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 하나 이상의 항원성 결정자를 코딩하는 서열을 포함하는 접합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항원성 결정자가 CD4+T 세포 에피토프, CD8+ T 세포 에피토프, B 세포 에피토프 및 이들의 조합으로부터 선택되는 접합체.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항원성 결정자가 병원체 또는 미생물로부터의 것인 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항원성 결정자가 파상풍 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 간염 표면 항원 또는 pDOM1로부터 유래된 접합체.

청구항 26

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 종양 항원을 코딩하는 이중 가닥 DNA 분자; 및 병원체 또는 미생물로부터의 하나 이상의 CD4+T 세포 에피토프를 포함하는 접합체.

청구항 27

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 하나 이상의 산물이 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 알라민(Alarmin) 및/또는 손상 관련 분자 패턴(DAMP)을 포함하는 접합체.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 핵산 분자가 하나 이상의 면역자극 사이토카인을 추가로 코딩하는 접합체.

청구항 29

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 하나 이상의 공동자극 폴리펩티드를 추가로 코딩하는 접합체.

청구항 30

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 항원 제시 세포 또는 수지상 세포의 동원, 결합, 성숙/증식 또는 활성화를 행하는 하나 이상의 분자를 추가로 코딩하는 접합체.

청구항 31

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 하나 이상의 면역자극 RNA 분자를 코딩하는 접합체.

청구항 32

제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 하나 이상의 유전자의 발현을 간섭할 수 있는 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 접합체.

청구항 33

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 표적 세포의 사멸을 유도하는 분자를 코딩하는 접합체.

청구항 34

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 표적 세포에서 기능적으로 활성인 전사 프로모터의 조절 하에 하나 이상의 관심 유전자를 코딩하는 접합체.

청구항 35

제1항 또는 제19항에 있어서, 양이온성 펩티드, 양이온성 리포좀, 친지성 부분 또는 나노입자를 추가로 포함하는 접합체.

청구항 36

제1항 또는 제19항에 있어서, 알라민을 추가로 포함하는 접합체.

청구항 37

제1항 또는 제19항에 있어서, 카텔리시딘-유래 LL37 펩티드를 추가로 포함하는 접합체.

청구항 38

제1항 또는 제19항에 있어서, 핵산 분자가 다중 가닥 핵산 나선, DNA, RNA, DNA-RNA 하이브리드, PNA-DNA 하이브리드, LNA-DNA 하이브리드 또는 LNA-RNA 하이브리드인 접합체.

청구항 39

제1항 또는 제19항에 있어서, 핵산 분자가 DNA, RNA, PNA 또는 LNA인 접합체.

청구항 40

제1항, 제19항 또는 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체가 항원 또는 항원성 결정자에 추가로 연결된 접합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 항원 또는 항원성 결정자가 양이온성 펩티드에 융합된 접합체.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 양이온성 펩티드가 LL37, His6 및 Arg9로 구성된 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 43

제5항, 제24항 또는 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 부분이 종양 세포, 종양 관련 항원 또는 종양 혈관계에 결합하는 접합체.

청구항 44

제1항 또는 제19항에 있어서, 표적화 부분이 정상 피부 또는 근육 세포 상에 존재하는 분자에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 45

제1항 또는 제19항에 있어서, 표적화 부분이 EGFR에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 46

제1항 또는 제19항에 있어서, 표적화 부분이 항원 제시 세포 또는 수지상 세포에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 47

제1항 또는 제19항에 있어서, 표적화 부분이 DC 항원 수용(uptake) 수용체에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 48

제47항에 있어서, 수용체가 C형 렙틴-유사 수용체, Fc 수용체, 인테그린 및 스캐빈저 수용체로 구성된 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 49

제1항 또는 제19항에 있어서, 수용체가 DEC205, Fcγ 수용체, αVβ5, CD36, Lox1 및 CD91로 구성된 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 50

제1항 또는 제19항에 있어서, 표적화 부분이 종양 항원, 종양 관련 항원 또는 종양 세포 표면 분자에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 51

제1항 또는 제19항에 있어서, 표적화 부분이 양이온성 펩티드에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 52

제40항에 있어서, 상기 표적화 부분이 상기 LL37, His6 또는 Arg9에 커플링된 접합체.

청구항 53

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 핵산 분자가 선형 DNA 또는 미니서클 DNA인 접합체.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 DNA가 병원체 또는 미생물로부터 유래된 항원성 결정자를 코딩하는 접합체.

청구항 55

제51항에 있어서, DAMP 또는 알라민을 포함한 비코딩 핵산 분자를 추가로 포함하는 접합체.

청구항 56

제1항, 제19항 또는 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산이 종양 항원을 코딩하는 접합체.

청구항 57

제53항에 있어서, 상기 항원성 결정자가 병원체로부터 유래된 접합체.

청구항 58

제53항에 있어서, 상기 핵산이 PAMP인 서열을 추가로 포함하는 접합체.

청구항 59

제51항에 있어서, 상기 미니서클이 병원체 또는 미생물 유래의 항원과 융합된 종양 항원을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 접합체.

청구항 60

.

청구항 61

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 표적화 부분이 EGFR에 결합할 수 있는 접합체.

청구항 62

치료 유효량의 제1항 또는 제19항의 접합체를, 신생물성 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 신생물성 장애의 치료 또는 예방 방법.

청구항 63

치료 유효량의 제1항 또는 제19항의 접합체를, 감염성 질병의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 감염성 질병의 치료 또는 예방 방법.

청구항 64

면역 세포를 제1항 또는 제19항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 면역 세포의 생체외 활성화 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 처리를 필요로 하는 대상에게 치료 유효량의 상기 면역 세포를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

제1항 또는 제19항의 조성물을, 상응하는 미생물 백신과 조합하여 투여하는 단계를 포함하는 종양의 치료 방법으로서, 상기 접합체가 상기 미생물로부터의 항원성 결정자를 포함하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역자극 치료 방식, 보다 구체적으로는 신생물성, 감염성 및/또는 기타 장애의 예방 또는 치료를 위한 항체/펩티드-핵산 접합체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역계는 인간 신체에 외래 물질 또는 잠재적으로 유해한 것으로 인식되는 미생물 및 물질을 인식하여 그것에 대해 자기 방어하는 수단을 제공한다. 감염성 유기체에 대한 예방 백신접종은 집단을 감염으로부터 보호함에 있어 주요 이점이 있었다. 그러나, 많은 편재적 감염성 질병 및 지속적 감염에 대해 유효한 면역예방 및 면역치료가 여전히 필요하다. 단클론 항체를 이용한 암의 수동적 면역치료 및 종양 세포를 공격하기 위한 T 세포의 수동적 전달이 임상적 효능을 나타낸 반면, 이들 면역 이펙터를 유도하고 종양 세포에 대한 면역학적 기억을 확립하고자 하는 활성 치료 백신접종의 목표가 여전히 과제로 남아 있다. 수가지 종양-특이적 및 종양-관련 항원이 확인되었으나, 이들 항원은 일반적으로 면역원성이 약하고, 종양이 면역학적 공격을 피하도록 하는 내인성(tolerance) 환경을 만들기 위한 다양한 기전을 이용한다. 그러한 면역 내인성을 극복하기 위한 기법과 및/또는 T 세포 반응의 강한 수준을 활성화하는 것이 효과적인 암 면역치료에 대한 핵심을 이룬다.

[0003] 수지상 세포(DC)는 일차 면역 반응의 개시 및 조절에 있어 중심 역할을 하는 분화된 항원 제시 세포(APC)이다. 즉 (i) 항원 수용(uptake) 및 제시: DC는 식균작용(phagocytosis), 세포흡수작용(endocytosis) 및 음세포 작용(pinocytosis)을 통해 병원체(세균, 바이러스), 사멸하였거나 사멸 중인 세포, 단백질 및 면역 복합체를 포획한다. 그것은 세포 표면 수용체의 배열을 가지고, 이는 또한 시그널링 및 세포-세포 상호작용에서 작용할 수도 있다(표 1). DC는 포획된 단백질을 주요 조직적합성 복합체 I형 및 II형(MHC I 및 II) 분자에 로딩된 펩티드 내로 가공하고, 이 펩티드-MHC 복합체는 항원-특이적 CD8+ T 세포(MHC I) 및 CD4+ T 세포(MHC II)에 의해 인식되도록 세포 표면에 수송된다. DC 시토졸 내에 내인적으로 합성된 항원은 통상 프로테아좀-매개 경로를 통해 내부원형질 망상 내로 가공되어, MHC I에 로딩되는 반면, 세포외환경으로부터 외인적으로 습득된 항원은 통상 엔도좀/리소좀 내에서 분해되어, MHC II로 로딩된다. 특이적 DC 항원 수용 수용체(표 2)에 연결된 한 대안적 경로는 또한 DC가 MHC I로 외인성 항원을 가공할 수 있도록 한다(교차-제시). 교차-제시는 종양 세포, 병원체-감염 세포 및 면역 복합체와 같은 외인성 항원에 대한 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응을 도출하도록 한다. (ii) DC 성숙-TLR의 역할: DC의 성숙은 DC를 분화된 항원 포획 세포로부터 T 세포를 자극할 수 있는 세포로 전환시키는 말단 분화 과정이다. DC 성숙은 병원체-유래 성분의 인식, 또는 염증 또는 조직 손상과 관련된 내인성 숙주 분자("위험 신호"로도 칭해짐)에 의해 유도된다. 이 성숙 신호는 DC 상에 발현된 수용체를 함입(engagement)시켜, 세포내 신호전달 경로를 촉발한다. 다양한 감염성 미생물(세균, 진균, 원생동물, 바이러스)에 의해 발현되는 병원체-관련 분자 패턴(PAMP) 및 손상된 숙주 조직에 의해 방출되는 분자(손상 관련 분자 패턴/알라민(alarmin))의 인식은 DC 상에 발현되는 Toll-유사 수용체(TLR) 패밀리의 구성원과 같은 패턴 인식 수용체(PRR)에 의해 매개된다. TLR은 I형 막 당단백질의 것이다. 인간에서, 특이적 발현 패턴, 세포내 국지분해 및 상이한 분자에 대한 인식능을 가지는 10개의 알려진 작용적 TLR이 있다. 인간에서, 골수성 DC는 TLR 1-5, 7 및/또는 8을 발현하는 반면, 형질세포성 DC는 TLR 1, 7 및 9를 발현한다. 일부 TLR은 소낭(vesicle)의 루멘을 샘플링하는 리간드 결합 도메인과 함께, 세포 표면(TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10)에서 작동하는 반면, TLR 3, 7, 8 및 9는 세포내 구획(주로 엔도좀 및 내부원형질 망상) 내에서 발현된다. 병원체-코딩 TLR 리간드의 TLR 인식은 구조적으로 유사한 분자의 3가지 광위 범주, 즉 지질 및 리포펩티드(TLR2/TLR1; TLR2/TLR6; TLR4), 단백질(TLR5) 및 핵산(TLR 3, 7, 8 및 9)으로 분류된다. 면역자극 핵산을 인식하는 TLR 중, TLR3은 ds RNA를 함입시키고, TLR7/8은 ss RNA를 함입시키며, TLR9은 DNA를 함입시킨다. 미생물 리간드에 대해 추가로, 대부분의 TLR에 대해 내인성 리간드가 확인되었다(TLR3에 대해서는 mRNA, TLR7/8에 대해서는 ss RNA 면역 복합체 및 TLR9에 대해서는 DNA 면역 복합체). 합성 리간드는 또한 TLR 3, 7, 8(ds RNA, ss RNA) 및 TLR9(비메틸화 CpG 모티프를 포함하는 올리고데옥시뉴클레오티드)를 활성화할 수 있는 면역자극 핵산 서열(INAS)을 포함한 대부분의 TLR에 대해서도 기재되었다(표 3). TLR의 리간드 결합은 상이한 어댑터 단백질의 동원을 초래하고, 이는 세포-형 특이적 신호전달 경로 및 반응의 활성화를 초래한다. 그러나, DC/APC의 서브세트 간에 TLR 발현의 차등적 패턴(인간 PDC는 TLR9을 발현하고 DNA에 반응하지 않나, MDC는 그러하지 않고; PDC 및 MDC는 ss RNA에 상이하게 반응함) 및 상이한 해부학적 부위에서의 APC의 세포성 분해의 차이는 상이한 TLR 리간드(천연 또는 합성)에 대한 다양한 반응 또는 동일한 리간드의 가변 투여 경로를 초래할 수 있다. TLR 작용자 또는 기타 자극물질(사이토카인, 면역 복합체, 접합 분자)에 의한 DC의 성숙에 감소된 식균적 기능, 림프양 조직으로의 이동, 및 T 세포의 활성화 능력의 증진이 수반된다. DC의 성숙은 MHC I 및 II 분자를 형성하는 능력을 증진시키고, 교차-제시를 유도하며, T 세포 활성화에 필요한 면역학적 시냅스와 연관된 접착 및 공동자극 분자의 발현을 증가시키고(CD40, CD80, CD86), T 세포 분화를 CD4+ T 헬퍼 유형(T_HI) 또는 CD8+ 세포독성 림프구(CTL)를 인도하는 사이토카인(IFN-γ, IFN-α, IL-12) 및 단핵구, DC 및 T 세포를 국소 환경으로 동원하는 케모카인의 분비를 유도한다. 성숙 DC는 또한 림프절의 T 세포 구역으로 이동할 수 있게 된다. 항원-특이적 T 세포 면역 반응을 프라이밍하는 능력에 부가하여, DC는 NK의 세포와 복합체 양방향 혼선에 관여하여, 면역 감시와 병원체 및 종양의 제거를 용이하게 한다. 활성화된 DC는 또한 B 세포 증식, 이소타입 스위칭 및 형질 세포의 분화를 유도하여, 항체를 생산한다. DC가 선천성 및 적응성 면역 반응의

조정된 활성화에 있어 중대한 역할을 하기 때문에, 항원-특이적 T 세포 및 NK 세포의 DC-매개 활성화를 자극하는 기법은 선천성 면역계의 직접적 항-종양 또는 항-병원체 효과를 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 장기 지속 적응성 종양-특이적 또는 병원체-특이적 면역 반응의 발생을 용이하게 할 수 있다.

[0004] 항원-제시 세포가 이차 림프양 조직 상에 T 세포를 "프라이밍"하도록 항원을 제시할 때 정통적 면역 반응이 개시되고, 이는 T 세포 활성화, 증식, 및 이펙터 T 림프구 및 기억 세포로의 분화를 초래한다. T 세포 반응의 성질은 DC 상에서의 항원의 농도, 상응하는 pMHC에 대한 T 세포 수용체의 친화도 및 DC 성숙의 상태에 의존한다. 미성숙 DC는 항원-특이적 T 세포의 활성화-유도 세포사로 초기 증식을 막고, 또한 조절 T 세포의 유도를 통해 내인성을 유도할 수 있다. 그러나, 성숙 DC에 의한 자극은 장기 T 세포 생존, 및 기억 및 이펙터 세포 내로의 분화를 초래하고, 이와 동시에 천연 발생의 Tr 세포가 억제된다. 항원, 예컨대 감염으로부터 비롯되는 항원에 노출된 후, 나이브(naive) T 세포가 상이한 작용을 갖는 T_H1 및 T_H2 세포로, 또는 T_H3 세포, Tr1 세포, T_H17 세포, 또는 조절 T 세포(T_{regs})로 분화될 수 있다. CD4+ T 헬퍼(T_H) 세포는 면역 반응 및 기억의 유도 및 유지에 중요하다. 이 효과는 T_H 세포와 DC 간의 리간드/수용체 상호작용에 의해, 예컨대 DC 상에 발현되는 CD40의 CD40L 함입을 통해 매개된다. 프라이밍 시의 T_H 세포 헬프(help)는 CD8+ T 세포의 프라이밍 및 이차 확장에, 및 항체 생산을 위해 B 세포에 헬프를 제공하는 데 중히 필요하다. 일단 유도되면, CD8+ 기억 T 세포는 더 이상 연속되는 항원-특이적 T_H 지지에 의존하지 않는다. 자가종양 항원이 통상 유의적 T_H 반응을 유도할 수 없기 때문에, 종양 세포에 대한 내인성 CD8+ 이펙터 T 세포 반응이 저해된다. 종양은 또한 항원의 손실이나 MHC 발현 또는 면역 억제 기전, 예컨대 TGF-L1의 발현을 통해 세포면역력을 피할 수 있다. 면역 반응의 구심성(afferent) 팔을 간섭하는 것에 추가하여, 종양 세포가 또한 세포독성 T 세포에 의해 동반되는 원심성(efferent) 사멸에 의한 아포프토시스에 대한 감수성을 감소시키는 증진된 성장 인자 수용체-매개 생존 경로 또는 유전적 일탈을 보유할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] **발명의 개요**

[0006] 본 발명은 종양 또는 병원체에 대한 선천성 및 적응성 면역 반응의 효과적 발생을 가능하게 하는 다중작용적 표적 면역접합체 부분에 대해 기술한다. 이 면역접합체는 표적 종양 또는 병원체에 대한 효과적인 항체- 및/또는 세포-매개 면역 반응을 개시하기 위한 하기의 다수의 핵심 요건을 동시에 만족시킬 수 있다: (i) 항원 제시 세포(APC)/수지상 세포(DC)에 의한 종양- 또는 병원체 항원(들) 또는 항원성 결정자(들)의 수용 및 교차-제시의 유도 또는 증강; (ii) 표적 세포 환경에서의 수지상 세포(DC)의 성숙의 촉진; (iii) 종양 또는 병원체에 대한 CD8+ T 세포 기억 및 항체를 생성시키기 위한 CD4+ T 세포 헬프의 제공; (iv) 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC) 및 T-세포 매개 사멸에 대한 표적 종양 세포의 감작화. 또한, 본 발명은 신생물성 질병, 감염성 질병 및 기타 장애의 표적 면역치료 또는 면역예방을 위해 사용될 수 있다.

[0007] 일반적으로, 본 발명의 조성물 및 방법은 목적 항원 또는 세포에 대한 면역 반응을 증진시키는 표적 분자 또는 세포 성분 및 하나 이상의 활성 제제(들)에 결합할 수 있는 표적화 부분을 포함하는 치료 또는 진단 화합물을 수반한다. 본원에 추가 기재된 바와 같이, 표적화 부분은 암 또는 종양, 정상 세포(예컨대, 수지상 세포 또는 각질형성세포(keratinocyte)), 또는 감염 제제 또는 병원체의 분자 또는 성분에 대해 특이적이다. 또한, 활성 제제는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 리포펩티드, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0008] 본 발명의 첫 번째 측면에서, 본 발명의 산물 및 방법은 *표적화 부분*(T) 및 1개, 2개, 3개 또는 그 이상 개수의 활성제(A)를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0009] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 활성 제제에 커플링된 표적화 부분을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 표적화 부분, 및 비코딩 또는 코딩 핵산 분자 및 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 리포펩티드를 포함하는 적어도 2개의 활성 제제를 포함한다. 한 추가 실시양태에서, 적어도 2개의 활성제는 비코딩 핵산 분자 및 코딩 핵산 분자(예를 들어, 플라스미드 또는 미니서클(minicircle))를 포함한다. 다른 한 추가 실시양태에서, 적어도 2개의 활성제는 비코딩 또는 코딩 핵산 분자 및 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 간단히 설명하자면, 본 발명의 조성물은 하기 식으로 설명될 수 있다: T-A_1 또는 T-A_1-A_2(여기에서, T= 표적화 부분; A_1는 핵산 분자 또는 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 리포펩티드이고; A_2는 핵산 분자 또는 펩티드 또는 폴리펩티드

또는 리포펩티드임). 또한, 핵산 분자는 본원에 추가 기재되는 바와 같은 코딩 또는 비코딩 서열일 수 있다. 추가 실시양태들에서, A_1은 핵산 분자, 펩티드, 폴리펩티드 또는 리포펩티드를 포함하는 부가적 성분에 (직접적으로 또는 간접적으로) 커플링될 수 있다. 대안적으로, 추가 실시양태들에서, 활성제는 핵산 분자의 팩키징 및/또는 전달을 위한 성분이다.

[0010] 본원에 사용되는 "표적화 부분"(또는 부분들)은 정상 세포/조직 및/또는 암 세포/종양에 존재하는 표적 분자 또는 기타 분자에 국지화하여 결합하는 능력을 가지는 분자(들)를 지칭한다. 즉, 그러한 표적화 부분을 포함하는 본 발명의 조성물은 표적 세포 또는 분자에 (직접적으로 또는 간접적으로) 결합할 수 있다. 생물학적 활성 제제와 함께 사용하기 위해 고려되는 본 발명의 표적화 부분에는 표적 세포 또는 분자의 성분에 결합할 수 있는 항체, 폴리펩티드, 펩티드, 압타머, 기타 리간드 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다.

[0011] 본원에 개시된 바와 같이, 핵산 분자는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: 이중 가닥 DNA(ds DNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 다중 가닥 DNA, 이중 가닥 RNA(ds RNA), 단일 가닥 RNA(ssRNA), 다중 가닥 RNA, DNA-RNA 하이브리드(단일 가닥 또는 다중 가닥), 펩티드 핵산(PNA), PNA-DNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), PNA-RNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), 잠금(locked) 핵산(LNA), LNA-DNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), LNA-RNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥). 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 세포를 활성화할 수 있는 하나 이상의 면역자극 핵산 서열(INAS)을 포함한다.

[0012] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 암 또는 종양의 표적 분자 또는 성분에 결합하는 하나 이상의 표적화 부분(T)(***종양-표적화 부분***)을 포함한다. 표적 분자는 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 성분일 수 있다.

[0013] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩하고, 면역 반응을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다.

[0014] 한 관련 실시양태에서, 종양-표적 접합체의 핵산 분자는 T 세포 및/또는 B 세포에 의한 인식을 위해 가공되고 제시될 수 있는 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자를 코딩한다. 코딩된 항원성 결정자는 각각의 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: $CD4^+$ T 세포 에피토프, $CD8^+$ T 세포 에피토프, B 세포 에피토프. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자를 코딩한다. 예를 들어, 핵산은 파상풍 독소(tetanus toxin)로부터 유래된 서열을 코딩하여, $CD4^+$ T-세포 헬프를 제공한다[예를 들어, 파상풍 유래 T_H 활성화 서열: 단편 C(FrC), FrC 도메인 DOM1 또는 원시(promiscuous) MHC II형-결합 펩티드 p30]. 한 관련 실시양태에서, 핵산은 미생물 백신 또는 기타 비자가 공급원(예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 외독소, 녹색 형광 단백질, 식물 바이러스 외피 단백질)으로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자를 코딩한다.

[0015] 한 관련 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 및/또는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 및 하나 이상의 PAMP(들)를 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 하나 이상의 PAMP(들), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다.

[0016] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민(들), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분 및 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원

또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 하나 이상의 DAMP/알라민(들), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다.

[0017] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프), (ii) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (iii) 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP)/알라민(들), (iv) 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, DC 수용 수용체, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자를 위한 리간드/항체)를 포함하는 하나 이상의 면역자극 분자. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 종양 항원/항원성 결정자 또는 종양 항원-함유 융합 단백질을 추가로 코딩한다. 한 측면에서, 종양 항원의 융합 파트너는 DC, 면역 인식 및/또는 면역 활성화에 의해 항원 수용을 용이하게 한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 분자를 포함한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자이다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0018] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 하나 이상의 표적 세포 유전자의 발현을 간섭할 수 있는 하나 이상의 RNA 분자[예를 들어, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)]를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 접합체의 핵산 분자는 하나 이상의 면역자극 RNA 분자를 코딩한다.

[0019] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 표적 세포의 사멸을 유도하는 분자를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다.

[0020] 본원에 기재된 각각의 표적화 부분-핵산 접합체에서, 핵산 분자는 목적 세포 내에서 기능적으로 활성인 전사 프로모터의 조절 하에 하나 이상의 관심 유전자를 코딩한다. 한 실시양태에서, 조직 또는 종양 세포 선택적 프로모터는 목적 세포 유형의 표적 발현을 위해 사용된다.

[0021] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 각각의 종양 표적화 부분-핵산 접합체는 핵산 분자 또는 접합체의 팩키징 및/또는 전달을 위해 하나 이상의 성분에 연결된다. 예를 들어, 이들 분자에는 양이온성 펩티드, 세포 투과 펩티드, DC 표적화 펩티드, 핵산 결합 분자, 핵 국소화 펩티드, 양이온성 리포좀, 친지성 부분, 나노입자가 포함된다.

[0022] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 하나 이상의 핵산 분자(들), 및 하나 이상의 펩티드/폴리펩티드/리포펩티드(들)의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같이(주: 0017), 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고/하거나, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 각종 관련 실시양태들에서, 펩티드/폴리펩티드/리포펩티드(들)는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, CD4+ T 세포 에피토프), (ii) 알라민, (iii) DC 결합 분자(예를 들어, DC 수용 수용체의 리간드). 한 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 펩티드/폴리펩티드는 상호 간에 및/또는 핵산 결합 펩티드 또는 세포 투과 펩티드(예를 들어 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37)에 융합/연결될 수 있다.

[0023] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체 또는 압타머 및 하기의 것들 중 하나 이상의 접합체를 포함한다: (a) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (b) 하기 펩티드/폴리펩티드/리포펩티드(들) 중 하나 이상: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, CD4+ T 세포 에피토프), (ii) 알라민, (iii) DC 결합 분자(예를 들어, DC 수용 수용체의 리간드). 한 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 펩티드/폴리펩티드는 상호 간에 및/또는 핵산 결합 펩티드(예를 들어, 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37)에 융합/연결될 수 있다. 한 측면에서, 접합체는 면역자극 핵산을 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, 본 발명은 표적화 부분, 예컨대 항체, 및 압타머인 핵산 분자의 접합체를 포함한다. 한 실시

양태에서, 항체 및 핵산 압타머는 동일한 세포 유형 또는 상이한 세포 유형 상의 상이한 표적에 결합한다. 한 실시양태에서, 접합체는 종양 세포 표면 수용체(EGFR)를 표적으로 하는 항체 및 전립선 특이적 막 항원(PSMA)을 표적으로 하는 압타머를 포함함으로써, 전립선 암 세포 내 양 단백질 모두를 표적으로 한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같이(주: 0017), 압타머 및 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: (i) PAMP 또는 기타 면역자극 핵산, (ii) 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩하는 DNA.

[0025] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 피부 내 정상 세포 또는 조직, 예컨대 각질형성세포의 표적 분자 또는 성분에 결합하는 하나 이상의 표적화 부분(T)(***조직-표적화 부분***)을 포함한다. 한 실시양태에서, 표적화 부분 은각질형성세포 상의 세포 표면 분자 또는 수용체, 예컨대 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합한다.

[0026] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩하고, 면역 반응을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다.

[0027] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 포함하고, 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩한다.

[0028] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다.

[0029] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다.

[0030] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하고 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하거나 아무것도 코딩하지 않는 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (ii) 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP)/알라민(들), (iii) 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, DC 수용 수용체를 위한 리간드/항체, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 포함하는 하나 이상의 면역자극 분자. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 항원/항원성 결정자를 융합 단백질로서 코딩한다. 한 측면에서, 항원의 융합 파트너는 DC에 의한 항원 수용, 면역 인식 및/또는 면역 활성화를 용이하게 한다. 또 다른 측면에서, 융합 파트너는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 분자를 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0031] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 및 하나 이상의 종양 항원/항원성 결정자를 코딩하고 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, CD4+ T 세포 에피토프), (ii) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (ii) 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP)/알라민(들), (iii) 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, DC 수용 수용체를 위한 리간드/항체, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 포함하는 하나 이상의 면역자극 분자. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 종양 항원-함유 융합 단백질을 코딩한다. 한 측면에서, 종양 항원의 융합 파트너는 DC에 의한 항원 수용, 면역 인식 및/또는 면역 활성화를 용이하게 한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 분자를 포함한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(CD4+ T 세포 에피토프)이다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에

기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0032] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및/또는 알라민, 및 하기의 것들 중 하나 이상을 포함하는 항원성 펩티드/폴리펩티드의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자, (ii) 하나 이상의 종양 항원 또는 항원성 결정자. 접합체의 한 측면에서, 종양 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자는 알라민(예를 들어, LL 37)에 연결되거나 융합된다.

[0033] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 핵산 분자(들), 및 하나 이상의 펩티드/폴리펩티드의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같이(주: 0030, 0031), 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고/하거나, 항원-특이적 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 접합체의 각종 실시양태들에서, 펩티드/폴리펩티드는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체 및/또는 종양 항원 또는 항원성 결정자, (ii) 알라민, (iii) DC 결합 분자(예를 들어, DC 수용 수용체의 리간드). 한 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 펩티드/폴리펩티드는 상호 간에 및/또는 핵산 결합 펩티드(예를 들어, 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37, 핵 국지화 펩티드)에 융합/연결될 수 있다.

[0034] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 정상 면역 세포 또는 조직, 예컨대 항원 제시성 세포 또는 수지상 세포의 표적 분자 또는 성분에 결합하는 하나 이상의 표적화 부분(T)(***APC/DC-표적화 부분***)을 포함한다. 한 실시양태에서, 표적화 부분은 수지상 세포 수용 수용체, 예컨대 DEC-205에 결합한다.

[0035] 한 실시양태에서, 본 발명은 항원 제시 세포(APC)/수지상 세포(DC), 예컨대 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분, 예컨대 관심 유전자를 코딩하는 핵산 분자를 포함한 접합체를 포함한다.

[0036] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)를 코딩하고, 면역 반응을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다.

[0037] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 예컨대 DEC-205에 대한 항체 및 하나 이상의 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 포함하고, 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0038] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및 하나 이상의 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0039] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민 및 하나 이상의 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다.

[0040] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하고 하나 이상의 면역자극 분자, 예컨대 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 항원/항원성 결정자를 융합 단백질로서 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 접합체는 하나 이상의 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자를 포함한 하나 이상의 펩티드를 추가로 포함한다.

[0041] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 및 하나 이상의 종양 항원을 코딩하고 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, CD4+ T 세포 에피토프), (ii) 하나 이상의 면역자극 분자, 예컨대 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자). 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 종양 항원을 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(CD4+ T 세포 에피토프)를 갖는 융합 단백질로서 코딩한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 접합체는 하나 이상의 병원체-유래 또는 종양 항원 또는 항원성 결정자를 포함한 하나 이상의 펩티드를 추가로 포함한다.

[0042] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및/또는 하나 이상의 알라민, 및 하나 이상의 종양 항원 및/또는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 포함한 하나 이상의 항원성 펩티드의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항원성 펩티드는 표적화 부분에 융합되거나 그 안에 도입된다. 또 다른 측면에서, 항원성 펩티드는 알라민(예를 들어, LL-37)에 융합된다.

[0043] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 핵산 분자 및 하나 이상의 항원성 펩티드의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 포함하고, 항원성 펩티드는 종양 항원 및/또는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 포함한다. 한 실시양태에서, 항원성 펩티드는 표적화 부분에 융합되거나 그 안에 도입된다. 접합체의 한 관련 실시양태에서, 항원성 펩티드는 핵산 결합 펩티드(예를 들어, 양이온성 펩티드, NLS, Tat, 프로타민, His6, Arg9, LL-37)에 융합된다. 또 다른 측면에서, 항원성 펩티드는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 펩티드 모티프에 융합된다. 한 측면에서, 항원성 펩티드는 표적화 부분에 융합되거나 그 안에 도입된다. 또 다른 측면에서, 항원성 펩티드는 알라민에 융합된다.

[0044] 한 실시양태에서, 본 발명은 DC 표적화 펩티드, 항원성 펩티드 및 핵산 결합 펩티드(알라민, 예를 들어 LL-37)를 포함한 접합체 또는 융합 단백질을 포함하는데, 여기에서 상기 단백질은 공유 또는 비공유 결합으로 핵산 분자(코딩 또는 비코딩)에 연결된다. 한 측면에서, 핵산 분자는 하나 이상의 PAMP를 포함한다. 또 다른 측면에서, 핵산 분자는 하기의 것들 중 하나 이상을 추가로 코딩한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 종양 항원 또는 항원성 결정자, (ii) 하나 이상의 면역자극 분자, 예컨대 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자).

[0045] 한 실시양태에서, 본 발명은 융합 항원성 펩티드/단백질 및 항체의 면역 복합체를 포함한 접합체를 포함하는데, 여기에서 융합 펩티드/단백질은 상기 항체에 결합하는 특이적 tag 펩티드 및 항원성 펩티드를 포함한다. 접합체의 한 측면에서, 면역 복합체 내의 융합 펩티드/단백질은 핵산 결합 펩티드(예를 들어, 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37, 핵 국지화 펩티드)를 추가로 포함한다. 접합체의 또 다른 측면에서, 면역 복합체 내의 융합 펩티드는 알라민(예를 들어, LL-37)을 추가로 포함한다. 접합체의 또 다른 측면에서, 면역 복합체 내의 융합 펩티드는 DC 수용 수용체에 결합하는 펩티드를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 접합체는 항체 또는 융합 펩티드 항원에 연결된 면역자극 핵산 분자를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 PAMP를 포함한다. 또 다른 측면에서, 핵산 분자는 하기의 것들 중 하나 이상을 추가로 코딩한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 종양 항원 또는 항원성 결정자, (ii) 하나 이상의 면역자극 분자.

[0046] 본 발명에 따른 예시적 방법 및 조성물이 상세히 기술된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 뉴클레오티드(DNA/RNA)-접합 항체를 도시한다.

도 2는 뉴클레오티드(DNA/RNA)-접합 종양 표적 펩티드를 도시한다.

도 3은 핵산-항체 접합체의 작용의 기전(들)을 도시한다(INAS=면역자극 핵산 서열).

도 4는 DNA 또는 RNA(INAS)의 항체/폴리펩티드/펩티드에 대한 공유 접합 방법을 도시한다.

단계 1. 카르보디이미드 교차-링커 EDC를 이용하여 올리고뉴클레오티드(예를 들어, CpG DNA)의 3'-인산염 기를 항체의 아민기와 접합시키고;

단계 2. EDC 활성화 올리고뉴클레오티드를 이미다졸과 상호 작용하여, 접합을 위한 활성 중간체를 형성하며;

단계 3. 활성 뉴클레오티드 중간체가 표적 항체(예컨대, 항-EGFR 또는 항-HER2)와 공유 결합을 형성하고;

단계 4. 10 kD 컷오프 칼럼 통과+PBS 세정에 의해 이미다졸 및 비접합 뉴클레오티드 잔기를 제거함.

도 5는 DNA- 또는 RNA-접합 항-EGFR 항체 및 항-HER2 항체를 나타내는 면역 블롯을 보여준다.

항-인간 EGFR 항체-DNA 접합체(DNA=서열 번호 1)

항-인간 HER2 항체-DNA 접합체(DNA=서열 번호 1)

항-EGFR 항체-RNA 접합체(EGFR 항체-SVM274)

도 6은 항-EGFR 항체(EGFR Ab) 또는 DNA-접합 항-EGFR 항체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2)에 의한 EGFR 인산화(Tyr 1068)의 억제를 나타내는 면역블롯이다.

도 7은 EGFR 항체에 의한 것이 아닌, DNA-접합 항-EGFR 항체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1)에 의해 의한 수지상 세포의 성숙을 나타내는 FACS 분석의 도면이다.

도 8은 PBMC에서의 인터페론-γ(IFN-γ) 및 Apo2L/TRAIL의 발현에 대한 DNA-접합 항체의 효과를 나타내는 막대 그래프이다. A)는 항-EGFR 항체(항-EGFR Ab) 5 ㎍/ml, 항-인간 HER2 항체(항-HER2 Ab) 5 ㎍/ml, DNA(ODN-서열 번호 1) 5 ㎍/ml, 항-EGFR Ab-DNA 5 ㎍/ml, 항-HER2 Ab-DNA 5 ㎍/ml로 처리한 PBMC 또는 좌측 비처리 PBMC(대조군)의 상등액에서의 ELISA에 의한 IFN-γ(pg/ml)의 정량화를 보여준다. B)는 항-EGFR 항체(항-EGFR Ab) 5 ㎍/ml, 항-인간 HER2 항체(항-HER2 Ab) 5 ㎍/ml, DNA(ODN-서열 번호 1) 5 ㎍/ml, 항-EGFR Ab-DNA 5 ㎍/ml, 항-HER2 Ab-DNA 5 ㎍/ml로 처리한 PBMC 또는 좌측 비처리 PBMC(대조군)의 상등액에서의 ELISA에 의한 Apo2L/TRAIL(pg/ml)의 정량화를 보여준다.

도 9는 EGFR 항체를 이용한 것이 아닌, EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1)를 이용한 처리 후, $CD56^{+}$ PBMC의 확장의 유세포분류 분석법의 도면이다.

도 10은 EGFR 항체-뉴클레오티드 접합체(EGFR-DNA 또는 EGFR-RNA)로 처리한 후, PBMC 중 MHC 분자(DR; II형)의 발현 증가를 나타내는 표이다.

도 11은 EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2)를 이용한 처리에 의한 EGFR-발현 종양 세포(MDA-MB468), 및 HER2 항체-DNA 접합체(HER2 Ab-DNA 서열 번호 1 또는 HER2 Ab-DNA 서열 번호 2)를 이용한 처리에 의한 HER2/neu-발현 종양 세포(SKBr-3)에서의 Apo2L/TRAIL의 유도를 나타내는 표이다.

도 12는 EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2)에 의한 EGFR-발현 인간 결장암 세포(HT29 세포)의 (세포 과융합(hyperfusion)에 의한) 직접적 사멸의 유도를 나타내는 현미경사진을 보여준다.

도 13은 EGFR 항체 또는 비접합 핵산(DNA 서열 번호 1)를 이용한 것이 아닌, EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1)를 이용한 처리에 의한 EGFR-발현 인간 결장암 세포(HT29 세포)의 (콜로니 형성의 손실에 의한) 직접적 사멸의 유도를 나타내는 세포 배양 플레이트를 보여준다.

도 14는 EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1)를 이용한 처리에 의한 EGFR-발현 인간 유방암 세포(MCF-7 또는 MDA-MB468 세포)의 직접적 사멸의 유도를 나타내는 현미경사진을 보여준다.

도 15는 EGFR 항체 또는 비접합 핵산(DNA 서열 번호 1 또는 DNA 서열 번호 2)를 이용한 것이 아닌, EGFR 항체-DNA 접합체[EGFR Ab-DNA 1(서열 번호 1) 또는 EGFR Ab-DNA 2(서열 번호 2)]를 이용한 처리에 의한 EGFR-발현 인간 유방암 세포(MCF-7 세포)의 (콜로니 형성의 손실에 의한) 직접적 사멸의 유도를 나타내는 세포 배양 플레이트를 보여준다.

도 16은 HER2 항체-DNA 접합체[HER2 Ab-DNA 1(서열 번호 1) 또는 HER2 Ab-DNA 2(서열 번호 2)]를 이용한 처리

에 의한 HER2/neu-발현 인간 유방암 세포(MCF-7 및 SKBr-3 세포)의 (세포 과융합에 의한) 직접적 사멸의 유도를 나타내는 현미경사진을 보여준다. 4개의 과융합 유착 세포체의 분석은 (트립판-블루로 염색된) 비생육성 세포 및 산재된 세포 단편을 나타낸다.

도 17은 Neu 항체-DNA 접합체[Neu Ab-DNA 1(서열 번호 1) 또는 Neu Ab-DNA 2(서열 번호 2)]를 이용한 처리에 의한 Neu-발현 쥐 유방암 세포의 세포 과융합에 의한) 직접적 사멸의 유도를 나타내는 현미경사진을 보여준다.

도 18는 PBMC:종양 세포 비의 함수(A) 또는 시간의 함수(B)로서의 항-EGFR 항체 또는 항-EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1)에 의한 HT-29 종양 세포사의 유도를 나타내는 그래프를 보여준다.

도 19는 EGFR 항체 단독, DNA 단독(DNA 서열 번호 1), 또는 비접합 항체 및 핵산의 조합을 이용한 처리와 대비한, DNA-접합 항-EGFR 항체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1)의 투여 후, EGFR-발현 HT-29 종양 성장의 억제를 보여준다.

도 20은 Neu 항체 단독 또는 DNA 단독(DNA 서열 번호 1)을 이용한 처리와 대비한, Neu 항체-DNA 접합체[Neu Ab-DNA 서열 번호 1]를 이용한 처리에 의한 FVB 마우스에서의 동계(syngeneic) Neu+ 종양의 성장 억제 및 체적 감소를 나타내는 그래프를 보여준다.

도 21A 및 21B는 DNA-접합 항-neu 항체의 종양내 또는 전신 투여에 의한 (neu-N)-유전자도입 마우스에서의 종양의 성장 억제를 나타내는 그래프이다: (A) 비처리 대조군 마우스에서의 종양 체적. (B) Neu 항체-DNA 접합체-처리 마우스에서의 종양 체적[Neu Ab-DNA 서열 번호 1].

도 22는 바실러스 안트라시스(Bacillus Anthracis)의 히스티딘(His)-태깅 보호 항원(PA)의 올리고뉴클레오티드와의 결합을 도시한다.

도 23은 올리고뉴클레오티드와 플라스미드 간의 삼중 나선 형성을 도시한다.

도 24는 항-EGFR 항체-HIV Tat 펩티드 복합체에 의한 플라스미드 전달 및 유전자 발현을 도시한다.

참조 인용

본 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허출원은, 각 개별 공보 또는 특허출원이 참조 인용되는 것으로 구체적이고 도 개별적으로 표시되는 것과 같은 정도로 본원에 참조 인용된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] **발명의 상세한 설명**

[0049] 본 발명의 조성물, 방법 및 방법론을 기술하기에 앞서, 상기 조성물, 방법 및 실험 조건은 달라질 수 있기 때문에, 본 발명이 기재된 특정 조성물, 방법 및 실험 조건에 국한되지 않는 것으로 이해한다. 또한, 본 발명의 범주는 단지 청구범위에서만 한정되어 지기 때문에, 본원에 사용된 용어는 특정 실시양태를 기술할 목적으로만 주어지는 것이며, 한정의 의도는 없는 것으로 이해하여야 한다.

[0050] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수 형태(영문의 관사 "a", "an" 및 "the"이 사용된 형태에 상응함)는 명확하게 달리 특정되지 않는 한, 복수 형태도 포함한다. 이에 따라, 예를 들어 "핵산"이란 본원에 기재된 형태의 하나 이상의 핵산 및/또는 조성물을 포함하며, 이는 당업자들이 본 개시내용 등을 읽게 되면 자명해질 것이다.

[0051] 본원에 사용되는 "면역 이펙터 세포"에는 T 세포, NK 세포, B 세포, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포(DC)가 포함된다.

[0052] 본원에 사용되는 "종양 표적화 펩티드"는, 종양 세포의 세포 성분, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경 성분에 특이적으로 결합하는, 100개 미만의 아미노산을 갖는 중합체를 포함한다.

[0053] 본원에 사용된 "신생물"은 그것의 문법적인 변형어를 비롯하여, 양성 또는 암성일 수 있는 조직의 새로운 비정상인 증식을 의미한다. 한 관련 측면에서, 신생물은 각종 암들을 포함하나 이들에 국한되지 않는 신생물성 질병 또는 장애를 가리킨다. 예를 들어, 그러한 암에는 전립선암, 췌장암, 담도암, 결장암, 흑색종, 육종암, 간암, 신장암, 폐암, 고환암, 유방암, 난소암, 췌장암, 뇌암, 두경부암, 흑색종암, 백혈병, 림프종암 등이 포함될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 "대상"은 그것의 문법적인 변형어를 비롯하여, 인간, 또는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소,

닭, 원숭이, 래트 및 마우스를 포함한 척추 동물을 의미한다.

[0055] 본원에 사용된 "접합(conjugation)"은 그것의 문법적인 변형어를 비롯하여, 화학적, 정전기적, 비공유적 또는 다른 기법에 의한 외래 DNA의 표적-특이적 항체 및/또는 펩티드 및/또는 종양 표적화 부분과의 직접적 또는 간접적 연결, 커플링, 결합 등을 의미한다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은, 단리된 항체-핵산 접합체 또는 펩티드-핵산 접합체가 본 정의에 속하게 된다.

[0056] "면역자극 핵산 서열"(INAS)은 면역 세포를 활성화할 수 있는 병원체-관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 모티프인 핵산 분자를 지칭하며, 이에는 이중 가닥 DNA(ds DNA), 단일 가닥 DNA(ss DNA), CpG DNA(CpG), 단순 포진 바이러스(HSV) DNA, 이중 가닥 RNA(dsRNA) 및 단일 가닥 RNA(ssRNA)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 관련 측면에서, INAS는 코딩 또는 비코딩 서열일 수 있다. 예시적 예로서, INAS는 DNA(서열 번호 1 또는 서열 번호 2) 또는 RNA(이하 참조)일 수 있다.

[0057] 용어 "치료적 유효량"은 연구원, 수의사, 의사 또는 다른 임상의에 의해 모색되는 조직, 시스템, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 도출하게 될 대상 화합물의 양을 의미한다.

[0058] 본원에 사용되는 용어 "조성물"은 특정 성분을 특정량으로 포함하는 생성물 및 특정 성분을 특정량으로 배합하여 직접적으로 또는 간접적으로 얻게 되는 임의의 산물을 포괄하도록 의도된다. "약학적으로 허용되는"이란 담체, 희석제 또는 부형제가 제제의 다른 성분들과 상용성이고 그것의 수령자에게 해롭지 않아야 하는 것을 의미한다.

[0059] 용어 "화합물의 투여" 및/또는 "화합물을 투여하는 것"은 치료를 필요로 하는 개체에게 본 발명의 화합물을 치료 유효량으로 제공함을 의미하는 것으로 이해하도록 한다. 투여는 종양내 또는 전신(정맥내) 투여일 수 있다. 또한, 병원체 항원 백신(예를 들어, 파상풍 톡소이드)을 이용한 수령자의 백신접종과 함께 투여된다. 추가로, 조절 T 세포(예를 들어, 시클로포스파미드) 또는 골수성 억제자 세포(예를 들어, 젬시타빈)를 결핍 또는 고갈시키는 제제와 함께 투여된다. 한 추가 예에서, 적응 세포성 면역치료를 위해, 종양 반응성 또는 병원체 항원 반응성 면역 세포의 생성을 위한 면역 세포 및 종양 세포의 체외 치료. 투여는 피내 또는 피하일 수 있다. 또한, 조절 T 세포(시클로포스파미드) 또는 골수성 억제자 세포(예를 들어, 젬시타빈)의 결핍 또는 불활성화하는 하나 이상의 부가적 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 본원에서 규명된 본 발명의 약학적 조성물은 본원에 기재된 병/증상(예를 들어, 그 증상과 관련된 암, 병원성 감염 제제) 중 하나 이상을 예방 및/또는 치료하기 위해, 에어로졸 또는 경피에 의한 것과 같이, 비경구, 국소, 경구, 비강(또는 기타 흡입), 직장 또는 국지 투여하는 데 유용하다. 약학적 조성물은 투여 방법에 따라 각종 단위 투약 형태로 투여될 수 있다. 적당한 단위 투약 형태에는 산제, 정제, 환약, 캡슐, 로젠지, 좌약, 패치, 비강 스프레이, 주사제, 이식용 지속방출형 제제, 지질 복합체 등이 포함되나 이들에 국한되지 않는다.

[0060] 달리 언급이 없으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당업계의 숙련자들이 통상 이해하고 있는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본 발명의 취지 및 범주 내에에서 변형 및 변경이 포함되는 것으로 이해하는 바와 같이, 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질도 본 발명을 실시하거나 시험하는 데에 사용될 수 있다.

[0061] 일반적으로, 본 발명의 조성물 및 방법은 표적 세포에 대한 면역 반응을 증진시키는 표적 세포, 및 그 표적화 부분에 대한 면역 반응을 증진시키는 활성 제제를 포함하는 치료 또는 진단 화합물을 수반한다. 본원에 추가 기재된 바와 같이, 표적화 부분은 암 또는 종양, 감염 제제 또는 정상 세포의 분자 또는 성분에 대해 특이적이다. 또한, 활성제는 핵산, 펩티드 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0062] 본 발명의 첫 번째 측면에서, 본 발명의 생성물 및 방법은 표적화 부분, 및 1개, 2개, 3개 또는 그 이상 개수의 활성 제제를 포함한 조성물에 관한 것이다.

[0063] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 활성제에 커플링된 표적화 부분을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 표적화 부분, 및 비코딩 핵산 분자 및 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하는 적어도 2개의 활성제를 포함한다. 한 추가 실시양태에서, 적어도 2개의 활성제는 비코딩 핵산 분자 및 코딩 핵산 분자(예를 들어, 플라스미드 또는 미니서클)를 포함한다. 다른 한 추가 실시양태에서, 적어도 2개의 활성제는 비코딩 또는 코딩 핵산 분자 및 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 간단히 설명하자면, 본 발명의 조성물은 하기 식으로 설명될 수 있다: $T-A_1$ 또는 $T-A_1-A_2$ (식 중, T= 표적화 부분; A_1은 핵산 분자 또는 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 리포펩티드이고; A_2는 핵산 분자 또는 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 리포펩티드임). 또한, 핵산 분자는 본원에 추가 기재

되는 바와 같은 코딩 또는 비코딩 서열일 수 있다. 추가 실시양태들에서, A_1은 핵산 분자, 펩티드, 폴리펩티드 또는 리포펩티드를 포함한 부가적 성분에 (직접적으로 또는 간접적으로) 커플링될 수 있다. 대안적으로, 추가 실시양태들에서, 활성제는 핵산 분자의 팩키징 및/또는 전달을 위한 성분이다.

[0064] 예를 들어, 본 발명의 일부 실시양태에서, T=종양 세포, 정상 세포 또는 감염 제제의 성분을 표적으로 하는 압타머, 펩티드 또는 항체, A_1=면역자극 비코딩 핵산 분자; 및 A_2 =대상(예를 들어, 조성물을 투여하는 동물)에 대해 항원성인 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 T-A_1을 포함한다.

[0065] ***III. 표적화 부분***

[0066] 표적화 부분(예를 들어, 항체)은 접합된 생물학적 활성 제제(예를 들어, 핵산)를 (예를 들어, 표적 세포 수용체에 결합하는 항체의 수용체-매개 세포흡수작용을 통해) 표적 세포에 전달하는 것을 용이하게 한다.

[0067] 예를 들어, 표적화 부분은 생물학적 활성 제제(들)(예를 들어, INAS) 및 항체-결합 종양 표적으로부터의 면역원성 아포프토시스 물질을 (면역 세포 상의) Fc 및 Fc 수용체 간의 상호작용을 통해 면역 세포에 전달하는 것을 용이하게 하고; 이는 엔도좀 패턴 인식 수용체(예를 들어, Toll-유사 수용체)의 세포흡수작용 및 활성화를 통한 핵산의 내재화를 용이하게 한다.

[0068] 예를 들어, 면역자극 DNA-접합 또는 RNA-접합 항체/펩티드의 도입은 표적 세포(예를 들어, 신생물성 세포) 내 사멸 시그널링을 활성화한다(도 3). 이론에 의해 구속되지 않고, 유전독성 화학요법제의 효과와 대조적으로, DNA-접합 또는 RNA-접합 항체/펩티드의 사용은, 표적 분자를 발현하지 않거나 신생물성 세포에 비해 유의적으로 더 낮은 수준의 분자를 발현하는 정상 조직에 상응하는 영향을 미치지 않으면서 표적 세포에서의 사멸 시그널링의 활성화를 가능하게 한다.

[0069] 본 발명의 한 측면에서, 표적화 부분-생물학적 활성 제제 접합체는 생물학적 활성 제제의 서열이 배제된 면역반응을 유도하는 작용을 한다. 각종 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 표적 세포의 사멸을 용이하게 할 수 있고, 한편 이와 동시에 선천성 및 적응성 면역계의 직접적 또는 간접적 활성화를 유도할 수 있다. 예를 들어, INAS-항체 접합체의 세포내 인식은 표적 세포에 의한 사이토카인/공동자극 분자/알라민/손상-관련 분자 패턴(내인성 위험 신호)의 생산을 활성화하고, 표적 세포의 직접적 면역-매개 사멸을 용이하게 하며, 항원 제시 세포에 의한 (핵산 보유의) 아포프토시스 세포의 수용을 촉진하고, 교차-제시 종양 항원에 대한 항종양 반응을 발생시키도록 면역계를 활성화하는 작용을 한다(도 3). 이 항체-핵산 면역 복합체는 대식세포 및 수지상 세포에 의한 아포프토시스 종양 세포의 함입 후에 엔도좀 TLR-매개 또는 TLR-비의존성 면역 반응을 활성화할 수 있다. 이는 항체-결합 아포프토시스 종양 세포로부터 유래된 항원에 지정된 자가면역 반응을 유도할 수 있다.

[0070] 본원에 사용되는 "표적화 부분"(또는 부분들)은 대상에서 정상 세포/조직 및/또는 암 세포/종양에 존재하는 분자를 국지화하여 그것에 결합하는 능력을 가지는 분자(들)를 지칭한다. 즉, 그러한 표적화 부분을 포함하는 본 발명의 조성물은 세포에 존재하는 리간드에 (직접적으로 또는 간접적으로) 결합할 수 있다. 또한, 표적화 부분은 정상 세포/조직 및/또는 암 세포/종양 또는 기타 분자에 존재하는 분자를 국지화하여 그것에 결합하는 능력을 가지는 분자(들)를 지칭한다. 즉, 그러한 표적화 부분을 포함하는 본 발명의 조성물은 (직접적으로 또는 간접적으로) 표적 세포 또는 분자에 결합할 수 있다. 생물학적 활성 제제와 함께 사용하도록 고려되는 본 발명의 표적화 부분에는 표적 세포 또는 분자의 성분에 결합할 수 있는 항체, 폴리펩티드, 펩티드, 압타머, 기타 리간드 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다.

[0071] 한 실시양태에서, 표적화 부분은 대상에 대해 투여한 후, 종양 세포(들)에 결합하거나, 종양 세포(들) 부근(예를 들어, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경)에서 결합할 수 있다. 표적화 부분은 암 세포의 표면 상의 수용체 또는 리간드에 결합하거나, 표적이 분자에 접근가능한 경우, 암 세포의 세포내 표적에 결합할 수 있다. 세포내 암 세포 표적에 대한 접근가능성은 아포프토시스, 괴사 등을 겪고 있는 세포와 같은 손상된 형질 막을 가지는 암 세포에서 일어날 수 있다. 일부 암 표적화 분자는 손상된 형질 막을 가지지 않는 세포의 세포내 부분에 결합할 수 있다.

[0072] 본 발명의 또 다른 측면에서, 비암성 세포 또는 조직에 대해 특이적인 표적화 부분이 선택된다. 예를 들어, 표적화 부분은 특정 세포 또는 조직에 정상적으로 존재하는 분자에 대해 특이적일 수 있다. 또한, 일부 실시양태들에서, 동일한 분자는 정상 및 암 세포에 존재할 수 있다. 각종 세포 성분 및 분자가 공지되어 있다. 예를 들어, 표적화 부분이 EGFR에 대해 특이적인 경우, 생성된 본 발명의 접합체는 EGFR 발현 정상 피부 표피 세포뿐만 아니라 EGFR 발현 암 세포를 표적으로 할 수 있다. 그러므로, 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 본원에

추가 논의되는 바와 같이, 2개의 분리된 기전(암 세포 및 비암 세포 표적화)에 의해 작동할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 감염 제제의 성분 또는 분자에 대해 특이적인 표적화 부분을 포함한다.

[0073] 본원에 개시된 본 발명의 각종 측면들에서, 본 발명의 접합체는 세포 성분, 예컨대 종양 항원, 세균 항원, 바이러스 항원, 마이코플라즘 항원, 진균류 항원, 프리온 항원, 기생충 유래 항원에 결합하고/그것을 표적으로 할 수 있는 표적화 부분을 포함한다. 본원에 사용되는 세포 성분, 항원 또는 분자는 표적화 부분에 대한 목적 표적을 의미하기 위해 각기 사용될 수 있다. 예를 들어, 각종 실시양태들에서, 표적화 부분은 표피 성장 인자 수용체(EGFR, ErbB-1, HER1), ErbB-2(HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, EGFR 리간드 패밀리; 인슐린-유사 성장 인자 수용체(IGFR) 패밀리, IGF-결합 단백질(IGFBP), IGFR 리간드 패밀리; 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR) 패밀리, PDGFR 리간드 패밀리; 섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR) 패밀리, FGFR 리간드 패밀리, 혈관내피 성장 인자 수용체(VEGFR) 패밀리, VEGF 패밀리; HGF 수용체 패밀리; TRK 수용체 패밀리; 에프린(EPH) 수용체 패밀리; AXL 수용체 패밀리; 백혈구 티로신 키나제(LTK) 수용체 패밀리; TIE 수용체 패밀리, 안지오포이에틴 1, 2; 수용체 티로신 키나제-유사 오펀(orphan) 수용체(ROR) 수용체 패밀리; 디스코이딘 도메인 수용체(DDR) 패밀리; RET 수용체 패밀리; KLG 수용체 패밀리; RYK 수용체 패밀리; MuSK 수용체 패밀리; 전환 성장 인자 α(TGF-α) 수용체, TGF-β; 사이토카인 수용체, I형(헤마토포이에틴 패밀리) 및 II형(인터페론/IL-10 패밀리) 수용체, 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 수퍼패밀리(TNFRSF), 사멸 수용체 패밀리; 암-고환(CT) 항원, 계통-특이적 항원, 분화 항원, 알파-액티닌-4, ARTC1, 브레이크포인트 클러스터 영역-아벨슨(Abelson)(Bcr-abl) 융합 산물, B-RAF, 카스파제-5(CASP-5), 카스파제-8(CASP-8), β-카테닌(CTNNB1), 세포 분열 주기 27(CDC27), 사이클린-의존성 키나제 4(CDK4), CDKN2A, COA-1, dek-can 융합 단백질, EFTUD-2, 연장 인자 2(ELF2), Ets 변이 유전자 6/급성 골수양 백혈병 1 유전자 ETS(ETC6-AML1) 융합 단백질, 피브로넥틴(FN), GPNMB, 저밀도 지질 수용체/GDP-L 푸코스: β-D 갈락토스 2-α-L 푸코실트랜스퍼라제(LDLR/FUT) 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A2 유전자내 α2-도메인 내 α-나선의 잔기 170에서 아르기닌이 이소류신으로의 교환(HLA-A*201-R170I), HLA-A11, 돌연변이 열 충격 단백질 70-2(HSP70-2M), KIAA0205, MART2, 돌연변이 편재성(ubiquitous) 흑색종 1, 2, 3(MUM-1, 2, 3), 전립선산 포스파타제(PAP), neo-PAP, 미오신 I형, NFYC, OGT, OS-9, pml-RAR알파 융합 단백질, PRDX5, PTPRK, K-ras(KRAS2), N-ras(NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SYT-SSX1 또는 -SSX2 융합 단백질, 삼탄당인산 이소머라제, BAGE, BAGE-1, BAGE-2,3,4,5, GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8, GnT-V(이상 N-아세틸 글루코스아미닐트랜스퍼라제 V, MGAT5), HERV-K-MEL, KK-LC, KM-HN-1, LAGE, LAGE-1, 흑색종에서의 CTL-인식 항원(CAMEL), MAGE-A1(MAGE-1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, 뮤신 1(MUC1), MART-1/멜란-A(MLANA), gp100, gp100/Pmel17(SILV), 티로시나제(TYR), TRP-1, HAGE, NA-88, NY-ESO-1, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-1,2,3,4, TRP2-INT2, 암배아성 항원(CEA), 칼리크레인(Kallikrein) 4, 맘마글로빈(mammaglobin)-A, OA1, 전립선 특이성 항원(PSA), TRP-1/gp75, TRP-2, 아디포필린, 흑색종 2에 존재하지 않는 인터페론 유도성 단백질(AIM-2), BING-4, CPSF, 사이클린 D1, 상피 세포 부착 분자(Ep-CAM), EphA3, 섬유모세포 성장 인자-5(FGF-5), 당단백질 250(gp250), EGFR(ERBB1), HER-2/neu(ERBB2), 인터류킨 13 수용체 α2 사슬(IL13R알파2), IL-6 수용체, 장 카복실 에스테라제(iCE), 알파-태아 단백질(AFP), M-CSF, mdm-2, MUC1, p53(TP53), PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, 서비빈(BIRC5), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 텔로머라제, 윌름즈(Wilms's) 종양 유전자(WT1), SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIP1, CTAGE-1, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15q14, HCA661, LDHC, MORC, SGY-1, SPO11, TPX1, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE, 면역글로불린 이디오타입(idiotype), 벤스-존스(Bence-Jones) 단백질, 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, 암 항원 72-4(CA 72-4), 암 항원 15-3(CA 15-3), 암 항원 27-29(CA 27-29), 암 항원 125(CA 125), 암 항원 19-9(CA 19-9), β-인간 융모성 성선 자극 호르몬, β-2 마이크로글로불린, 편평세포 암종 항원, 뉴런-특이적 에놀라제, 열 충격 단백질 gp96, GM2, 사르그라모스팀(sargramostim), CTLA-4, 707 알라닌 프롤린(707-AP), T 세포 4에 의해 인식되는 선암종 항원(ART-4), 암배아성 항원 펩티드-1(CAP-1), 칼슘-활성화 클로라이드 채널-2(CLCA2), 사이클로필린 B(Cyp-B), 인간 인환 종양-2(HST-2), 인간 유두종 바이러스(HPV) 단백질(HPV-E6, HPV-E7, 주 또는 부 캡시드 항원 등), 엡스타인-바 바이러스(EBV) 단백질(EBV 잠복성 막 단백질-LMP1, LMP2; 등), B형 또는 C형 간염 바이러스 단백질 및 HIV 단백질을 포함하나 이들에 국한되지 않는 성분에 대해 특이적이거나 그 성분에 결합한다. 접합체는 펩티드/폴리펩티드로서의 상기 것들을 추가로 포함하고/하거나, 그것을 코딩할 수 있다.

[0074] 본원에 나타낸 바와 같이, 각종 실시양태들에서, 본 발명의 화합물은 감염 제제의 성분(예를 들어, 항원)에 결합하는 표적화 부분을 포함하는데, 여기에서 상기 화합물은 생물학적 활성 제제에 커플링하고, 그러한 화합물은 대상에서 (직접적으로 또는 간접적으로) 면역자극 반응을 유도한다. 일반적으로, 그러한 감염 제제는 세균, 효

모, 진균, 바이러스, 진핵생물 기생충 등을 포함하나 이들에 국한되지 않는 임의의 병원체일 수 있다. 각종 실시양태들에서, 본 발명의 화합물은 레트로비리다에(Retroviridae)(예를 들어, 인간 면역 결핍 바이러스, 예컨대 HIV-1(HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV 또는 HIV-1II로도 칭해짐); 및 기타 단리물, 예컨대 HIV-LP); 피코르나비리다에(Picornaviridae)(예를 들어, 폴리오 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 라이노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리다에(Calciviridae)(예를 들어, 위장염 유발 균주); 토가비리다에(Togaviridae)(예를 들어, 말 뇌염 바이러스, 루벨라 바이러스); 플라비리다에(Flaviridae)(예를 들어, 뎅기열 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노비리다에(Coronoviridae)(예를 들어, 코로나 바이러스); 랍도비리다에(Rhabdoviridae)(예를 들어, 소수포성 구내염 바이러스, 공수병 바이러스); 필로비리다에(Filoviridae)(예를 들어, 에볼라 바이러스); 파라마익소비리다에(Paramyxoviridae)(예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르토마익소비리다에(Orthomyxoviridae)(예를 들어, 인플루엔자 바이러스); 벙가비리다에(Bungaviridae)(예를 들어, 한탄 바이러스, 벙가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나 비리다에(Arena viridae)(출혈성 열 바이러스); 레오비리다에(Reoviridae)(예를 들어, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비마비리다에(Bimaviridae); 헤파드나비리다에(Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스); 파르보비리다에(Parvoviridae)(파르보 바이러스); 파포바비리다에(Papovaviridae)(유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리다에(Adenoviridae)(대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리다에(Herpesviridae)(단순 포진 바이러스(HSV) 1 및 2, 수두 대상포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV), 헤르페스 바이러스); 루 육종 바이러스(RSV), 조류 백혈병 바이러스(ALV) 및 조류 골수아구증 바이러스(AMV)) 및 C-형 B군(고양이 백혈병 바이러스(FeLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GALV), 비장 괴사 바이러스(SNV), 망상내피증 바이러스(RV) 및 원숭이과 육종 바이러스(SSV) 포함), 메이슨-화이자(Mason-Pfizer) 원숭이 바이러스(MPMV) 및 원숭이과 레트로바이러스 유형 I(SRV-I)을 포함한 D-형 레트로바이러스, 렌티바이러스, T-세포 백혈병 바이러스 및 포미(foamy) 바이러스의 부분집합을 포함한 복합체 레트로바이러스, HIV-1, HIV-2, SIV, 비스나(Visna) 바이러스, 고양이 면역결핍 바이러스(FIV) 및 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV)를 포함한 렌티바이러스, 원숭이과 T-세포 백혈병 바이러스(STLV) 및 소 백혈병 바이러스(BLV), 인간 포미 바이러스(HFV), 원숭이과 포미 바이러스(SFV) 및 소 포미 바이러스(BFV)를 포함한 포미 바이러스, 폭스비리다에(Poxviridae)(바리올라바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리다에(Iridoviridae)(예를 들어, 아프리카 돼지 콜레라 바이러스); 및 비분류 바이러스(예를 들어, 해면성 뇌증(Spongiform encephalopathies)의 병원체(etiological agents), 델파 간염의 제제(B형 간염 바이러스의 결함 위성인 것으로 사료됨), 비-A형, 비-B형 간염의 제제(1형=내부 전달; 2형=비경구 전달(즉, C형 간염); 노르워크(Norwalk) 및 관련 바이러스 및 아스트로바이러스), 마이코박테리움(Mycobacterium)(마이코박테리움 투버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis), M. 보비스(M. bovis), M. 아비움-인트라셀루아에(M. avium-intracellulare), M. 레프라에(M. leprae)), 뉴모코커스(Pneumococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 스타필로코커스(Staphylcococcus), 디프테리아(Diphtheria), 리스테리아(Listeria), 에리시펠로트릭스(Erysipelothrix), 탄저균(Anthrax), 파상풍균, 클로스트리듐(Clostridium), 혼합 혐기성생물(Mixed Anaerobes), 네이세리아(Neisseria), 살모넬라(Salmonella), 쉬겔라(Shigella), 헤모필러스(Hemophilus), 에쉐리키아 콜라이(Escherichia coli), 클렙시엘라(Klebsiella), 엔테로박터(Enterobacter), 세라티아(Serratia), 슈도모나스(Pseudomonas), 보르다텔라(Bordatella), 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 예르시니아(Yersinia), 비브리오 콜레라에(Vibrio cholerae), 바르토넬라(Bartonella), 레기오넬라(Legionella), 스피로케아테스(Spirochaetes)(트레포네마(Treponema), 렙토스피라(Leptospira), 보렐리아(Borrelia)), 진균, 악티노마이세스(Actinomyces), 리케챠(Rickettsia), 마이코플라즈마(Mycoplasma), 클라마이디아(Clamydia)), 원생동물(엔타모에바(Entamoeba), 플라스모듐(Plasmodium), 레이쉬마니아(Leishmania), 트리파노소마(Trypanosoma), 톡소플라스마(Toxoplasma), 뉴모사이스티스(Pneumocystis), 바바시아(Babasia), 기아르디아(Giardia), 크립토스포리듐(Cryptosporidium), 트리코모나스(Trichomonas) 포함), 헬민쓰(연충)(트리키넬라(Trichinella), 우케라리아(Wucheraria), 온코세르카(Onchocerca), 쉬스토소마(Schistosoma), 네마토데스(Nematodes), 세스토데스(Cestodes), 트레마토데스(Trematodes)를 포함하나 이들에 국한되지 않는 병원체/감염 제제에 존재하는 성분에 지정되는 표적화 부분을 포함한다. 본 발명의 조성물의 표적이 될 수 있는 항원의 추가 예가 공지되어 있는데, 예컨대 미국 특허출원 제2007/0066554호에 개시된 것들이 있다. 본 발명의 한 추가 측면에서, 접합체는 본원에 기재된 바와 같은 항원 또는 세포 성분을, 다만 표적화 부분 및 면역자극 핵산 분자에 추가하여, 포함할 수 있다. 이하 추가 기재된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 표적화 부분, 관심 폴리펩티드 또는 펩티드를 코딩하는 면역자극 핵산 또는 핵산, 및 감염 제제에 결합된 펩티드 또는 폴리펩티드(항원)을 포함할 수 있다. 접합체는 펩티드/폴리펩티드로서 상기의 것을 추가로 포함하고/하거나 그것을 코딩할 수 있다. 또한, DNA 백신접종의 경우, 코딩 서열이 종양 세포 및 DC에서 전달되고 발현되어, 증진된 면역 반응을 제공한다.

[0075] 각각의 상기 목록 및 후속 목록은 예시적인 것으로서, 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0076] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 화합물은 본원에 기재된 바와 같은 감염 제제에 대한 표적화 부분, 및 면역자극 핵산 또는 단백질 분자인 생물학적 활성 제제를 포함한다. 추가 실시양태들에서, 상기 면역자극 생물학적 활성 제제는 서열 번호 56 내지 228에 상응하는 하나 이상의 핵산 또는 단백질 분자를 포함한다. 또한, 이 서열은 면역 반응을 증진시키기 위해 종양 세포 또는 DC에서 폴리펩티드를 발현하도록 접합체 내에 포함될 수 있다. 또 다른 실시양태들에서, 본 발명의 화합물(예를 들어, 접합체)은 동일하거나 상이한 생물학적 활성 제제 중 2개 이상을 포함한다.

[0077] 표적화 부분은 각종 유형의 감염 제제에 대해 특정적인 특정의 항원에 대해 특이적일 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스는 오르토마익소비리다에 과 중 오르토마익소바이러스 속에 속한다. 나선 대칭을 가지는 ssRNA 엔벨로프 바이러스. 엔벨로프 입자의 직경: 80 내지 120 nm. RNA는 핵단백질(NP)과 밀착 결합하여, 나선 구조를 형성한다. 게놈을 8개 RNA 단편이 되도록 절편화한다(인플루엔자 C의 경우에는 7개). 4가지 중요 항원, 즉 헤마글루티닌(H), 뉴라미니다제(N), 핵단백질(NP) 및 매트릭스(M) 단백질이 존재한다. NP는 A, B 및 C의 3가지 형태로 생성하는 유형-특이적 항원으로서, 이는 인간 및 비인간 인플루엔자 바이러스의 분류를 위한 기초를 제공한다. 매트릭스 단백질(M 단백질)은 뉴클레오캡시드(nucleocapsid)를 둘러싸고, 입자 질량의 35 내지 45%를 구성한다. 또한, 2개의 표면 당단백질이 막대-모양의 돌출물로서 표면 상에 보여진다. 헤마글루티닌(H)은 2개의 서브유닛, 즉 H1 및 H2로 구성된다. 헤마글루티닌은 바이러스의 세포성 수용체로의 부착을 매개한다. 뉴라미니다제 분자는 엔벨로프 내에 보다 적은 양으로 존재한다. 인플루엔자 A 바이러스의 뉴라미니다제 항원 및 헤마글루티닌의 항원성 차이는 그것들이 서브타입들로 분류되는 기초를 제공하는데, 예를 들어 A/홍콩/1/68(H3N2)은 서브타입 H3N2 및 특이적 표적화 성분의 것으로서, 1968년에 환자로부터 단리된 인플루엔자 A 바이러스를 나타낸다. 접합체는 펩티드/폴리펩티드로서 상기의 것을 추가로 포함하고/하거나 그것을 코딩할 수 있다. 또한, DNA 백신접종의 경우, 코딩 서열은 종양 세포 및 DC에 전달되고 발현되어, 증진된 면역 반응을 제공한다.

[0078] 이에 따라, 각종 실시양태들에서, 본 발명의 화합물은 감염 제제를 표적으로 하는 면역 반응을 유도하는, 표적화 부분 및 생물학적 활성 제제를 포함한다. 예를 들어, 표적화 부분은 임의의 HxNy(x는 1 내지 9이고, y는 1 내지 16이거나, 이들 중 xy의 임의의 조합임)에 있어 인플루엔자 바이러스 유형 A에 대해 특이적일 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 항원, 또는 항원을 포함한 융합 펩티드, 예를 들어 인플루엔자 A 서브타입 H1N5에 결합하는 표적화 부분을 포함한다.

[0079] 한 실시양태에서, 감염 제제 성분에 대해 특이적인 표적화 부분은 에피토프를 인식한다. 본원에 사용되는 용어 "에피토프"는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간에서의 항원성 또는 면역원성 활성을 가지는 폴리펩티드의 부분을 지칭한다. 본원에 사용되는 "면역원성 에피토프"는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 결정 시, 동물에서 항체 반응을 도출하거나 T-세포 반응을 유도하는 폴리펩티드의 부분으로서 정의된다. (예를 들어, 문헌 [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 4002(1983)]를 참조한다). 본원에 사용되는 용어 "항원성 에피토프"는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 결정 시, 항체가 그것의 항원에 면역특이적으로 결합하는 단백질의 부분으로서 정의된다. 면역특이적 결합은 비특이적 결합을 배제하나, 반드시 기타 항원과의 교차 반응성을 배제하는 것은 아니다. 항원성 에피토프는 반드시 면역원성일 필요는 없다. 항원성 에피토프는 또한 T-세포 에피토프일 수 있고, 이 경우에 그것은 MHC 분자의 영역 내에서 T-세포 수용체에 의해 면역특이적으로 결합될 수 있다. 에피토프는 에피토프에 대해 독특한 공간 형태로 3개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일반적으로, 에피토프는 적어도 약 5개의 상기 아미노산으로 구성되고, 더욱 통상적으로는 적어도 약 8 내지 10개의 상기 아미노산으로 구성된다. 에피토프가 유기 분자인 경우, 그것은 니트로페닐만큼 작을 수 있다.

[0080] 본 발명의 접합체의 표적화 부분은 감염 제제에 결합된 공지된 항원에 대해 특이적일 수 있다. <fda.gov/cber/products/testkits.htm>(HIV, HBV, HTLV를 포함한, 상업적으로 이용가능한 항체/검정이 이용가능한 각종 항원의 목록 참조). 또한, 표적 성분의 추가예가 미국 특허출원 제20070172881호(진균류); 제20070166319호(HPV); 제20060252132호(인플루엔자 변이체); 제20060115497호(마이코박테리움); 미국 특허 제5,378,805호(HTLV); 제20060099219호(HPV); 제20070154883호(루벨라(Rubella)); 제7,060,283호(엡스타인 바 바이러스); 제7,232,566호(HIV); 제7,205,101호(HIV); 및 제6,878,816호(보렐리아(Borrelia))에 개시되어 있다. 접합체는 펩티드/폴리펩티드로서 상기의 것을 추가로 포함하고/하거나 그것을 코딩할 수 있다. 또한, DNA 백신접종의 경우, 코딩 서열은 종양 세포 및 DC에 전달되고 발현되어, 증진된 면역 반응을 제공한다.

[0081] **A. 항체**

[0082] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 생물학적 활성 제제(예를 들어, 면역 반응 유도 핵산 분자, 목적 펩티드

또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자, 펩티드 및 항원)에 결합된(예를 들어, 접합된) 폴리펩티드인 표적화 부분을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 항체는 동일한 유형 또는 상이한 유형의 생물학적 활성 제제 중 2개, 3개 또는 4개와 커플링된다. 예를 들어, 일부 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 비코딩 면역자극 핵산 분자 및 면역자극 펩티드, 폴리펩티드 또는 PNA에 커플링된 표적화 부분을 포함한다.

[0083] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 택(예를 들어, 히스타딘 택)에 결합된 표적화 부분을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 표적화 부분, 핵산 분자 및 택(예를 들어, 비오틴/아비딘)을 포함한다. 추가 실시양태들에서, 항체는 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하는, 융합 단백질 상의 택에 결합할 수 있다.

[0084] 한 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드 분자는 면역글로불린이다. 본원에 사용되는 용어 "면역글로불린"은 다클론, 단클론, 다중특이적, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함) 및 상술된 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이들에 국한되지 않는 천연 또는 인공 단가 항체 또는 다가 항체를 포함한다. 본원에 사용되는 용어 "항체"는 면역글로불린 분자, 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 지칭한다. 본 발명의 면역글로불린 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류의 것일 수 있다.

[0085] 항체 표적화 부분을 통한 본 발명의 접합체는 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 세포 성분에 결합함으로써, 생존 신호(예를 들어, 성장 인자 또는 사이토카인 또는 호르몬 수용체 길항자)의 억제, 사멸 신호의 활성화 및/또는 면역-매개 세포독성으로, 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성을 통해 표적 세포의 아포프토시스를 촉진할 것이다. 그러한 접합체는 수가지 기전을 통해 종양 세포를 방지, 감소 또는 제거하여, 예컨대 접합된 INAS의 종양 표적으로의 전달로서, 예컨대 표적 세포 수용체에 결합하는 항체의 수용체-매개 세포흡수작용을 통한 상기 전달을 용이하게 하고; (면역 세포 상의) 자체의 Fc 및 Fc 수용체 간의 상호작용을 통한 항체-결합 종양 표적으로부터의 면역원성 아포프토시스 물질 및 INAS의 면역 세포로의 전달을 촉진하는 작용을 할 수 있고; 이는 엔도좀 패턴 인식 수용체(예를 들어, Toll-유사 수용체)의 활성화 및 세포흡수작용을 통한 INAS의 내재화를 촉진하거나; 그러한 접합체가 (면역 세포 상의) 자체의 Fc 및 Fc 수용체 간의 상호작용을 통해, 또한 접합된 INAS를 통해, 면역 세포(예를 들어, NK 세포, 단핵구/대식세포, 수지상 세포, T 세포, B 세포)를 동원, 결합 및/또는 활성화할 수 있다. 또한, 일부 예에서, 상기 경로들 중 하나 이상은 본 발명의 하나 이상의 접합체의 투여 시에 작동할 수 있다.

[0086] 본 발명의 항체는 Fab, Fab' 및 $F(ab)_2$, Fd, 단쇄 Fv(scFv), 단쇄 항체, 이황화물-결합된 Fv(sdFv), 및 VL 또는 VH 도메인을 포함한 단편을 포함하나 이들에 국한되지 않는 항체 단편을 포함한다. 단쇄 항체를 포함한 항원-결합 항체 단편은 가변 영역(들)을 단독으로 또는 힌지 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 전부 또는 일부와 조합하여 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에는 가변성 영역(들)과 힌지 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 임의 조합을 포함한 항원-결합 단편더 또한 포함된다. 또한, 본 발명에는 Fc 단편, 항원-Fc 융합 단백질 및 Fc-표적화 부분 접합체 또는 융합 산물(Fc-펩티드, Fc-압타머)도 포함된다. 본 발명의 항체는 조류 및 포유 동물을 포함하여 임의의 동물 기원일 수 있다. 한 측면에서, 항체는 인간, 쥐(예를 들어, 마우스 및 래트), 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니아피그, 낙타, 말 또는 닭으로부터의 것이다. 또한, 그러한 항체는 인간화 형태의 동물 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 단일특이성, 이중특이적, 삼중특이적 또는 보다 고도의 다중특이적일 수 있다.

[0087] 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법으로 생성될 수 있다. 관심 항원에 대한 다클론 항체는 당업계에 공지된 각종 절차로 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 항원에 특이적인 다클론 항체를 함유하는 혈청의 생성을 유도하기 위해 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하나 이들에 국한되지 않는 다양한 숙주 동물에 투여될 수 있다. 숙주 종에 따라 다양한 보조제가 면역 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있으며, 이에는 프로인트(완전 및 불완전), 미네랄 젤, 예컨대 수산화알루미늄, 표면 활성 물질, 예컨대 리소레시틴, 플루로닉(pluronic) 폴리올, 다중음이온, 펩티드, 유성 유화액, 키홀 림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 인간 보조제, 예컨대 BCG(칼메트-게랑 간균(bacille Calmette-Guerin)) 및 코리네박테리움 파르붐(Corynebacterium parvum)이 포함되나 이들에 국한되는 것은 아니다. 그러한 보조제는 또한 당업계에 공지되어 있다. 또한, 항체 및 항체-유사 결합 단백질은 파지 디스플레이에 의해 제조될 수도 있다. 또한, 항체는 당업계에 알려진 바와 같이 식물에서 생산될 수 있다.

[0088] 단클론 항체는 하이브리도마 사용, 재조합 및 파지 디스플레이 기술 또는 이들의 조합을 비롯하여 당업계에 공지된 각종 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 단클론 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문

헌 [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; 문헌 [Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)]에 교시되어 있는 바와 같은 하이브리도마 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "단클론 항체"는 하이브리도마 기술로 생성된 항체에만 국한되지 않는다. 용어 "단클론 항체"는 그것의 생산 방법이 아닌, 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된 항체를 의미한다.

[0089] 단클론 항체는 매우 특이적이어서, 단일 항원성 부위에 대해 지정된다. 또한, 상이한 결정자(에피토프)에 대해 지정되는 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와 대조적으로, 각 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지정된다. 단클론 항체는 그것의 특이성에 부가하여, 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유익하다. 수식어 "단클론"은 항체의 특성이 항체의 실질적으로 균질한 개체군으로부터 수득됨을 가리키고, 이는 임의의 특별한 방법에 의해 항체의 공학처리를 필요로 하는 것으로 간주되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론 항체는 문헌 [Kohler et al(1975) Nature 256:495]에 처음으로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 예를 들어 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. "단클론 항체"는 또한 예를 들어, 문헌 [Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628]; 문헌 [Marks et al(1991) J. Mol. Biol., 222:581-597]에 기재된 기법을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0090] 본원의 단클론 항체는 구체적으로, 목적 생물학적 활성을 나타내는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 한 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동적이고, 사슬(들)의 적어도 하나의 다른 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류, 및 그러한 항체의 단편에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동적인 "키메라" 항체를 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; 문헌 [Morrison et al(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855]). 본원의 관심 키메라 항체는 비인간 영장류(예를 들어, 구세계 원숭이(Old World Monkey))로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0091] 단클론 항체(MAb)를 생산하기 위해 각종 방법들이 이용되어 왔다. 단일 유형의 항체를 생산하는 클로닝된 세포주를 지칭하는 하이브리도마 기술은 마우스(쥐), 햄스터, 래트 및 인간을 포함한 각종 종의 세포를 이용한다. 또 다른 Mab 제조 방법은 재조합 DNA 기법을 포함한 유전 조작을 이용한다. 이들 기법으로 제조된 단클론 항체는, 다른 것들 중에서도 키메라 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 키메라 항체는 하나 초과 유형의 종으로부터의 DNA 코딩 영역을 조합한다. 예를 들어, 키메라 항체는 마우스로부터 가변 영역을 유도하고 인간으로부터 불변 영역을 유도할 수 있다. 인간화 항체는, 비인간 부분을 포함한다해도, 우세하게는 인간으로부터 비롯된다. 키메라 항체와 마찬가지로, 인간화 항체는 완전 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 그러나, 키메라 항체와는 달리, 가변 영역이 부분적으로 인간으로부터 유래될 수 있다. 인간화 항체의 비인간 합성 부분은 종종 쥐 항체 내 CDR로부터 비롯된다. 임의의 경우에서도, 이들 영역은 항체가 특이적 항원을 인식하여 그것에 결합하도록 하기 위해 중요하다. 쥐 항체는 진단 및 단기 치료에 유용하나, 유해한 면역원성 반응의 위험을 증가시키지 않도록 하면서 사람에게 장기 투여될 수 없다. 인간 항-마우스 항체(HAMA)로 불리는 상기 반응은, 인간 면역계가 쥐 항체를 외래로 인식하여 그것을 공격할 때에 일어난다. HAMA 반응은 독성 충격 또는 심지어는 사멸을 유발할 수 있다. 키메라 및 인간화 항체는 투여된 항체의 비인간 부분을 최소함으로써 HAMA 반응 가능성을 감소시킨다. 또한, 키메라 및 인간화 항체는 이차 인간 면역 반응, 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성을 활성화하는 부가적 이이익을 가질 수 있다.

[0092] "항체 단편"은 온전(intact) 항체의 일부, 예를 들어 자체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함하는 온전 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, akcFv 단편; Fc 단편 또는 Fc-융합 산물; 디아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0093] "온전" 항체는 항원-결합 가변 영역뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 본연의(native) 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 본연의 서열 불변 도메인) 또는 그것의 아미노산 서열 변이체, 또는 임의의 다른 변형 Fc(예를 들어, 당화 또는 기타 조작된 Fc)일 수 있다.

[0094] 온전 항체는 항체의 Fc 영역(네이티브 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역 또는 임의의 다른 변형 Fc 영역)에 기여하는 상기 생물학적 활성을 지칭하는 하나 이상의 "이펙터 기능"을 가질 수 있다. 항체 이펙터 기능의 예에는 Clq 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC); 식세포 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이 포함된다.

[0095] 온전 항체는 그것의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 상이한 "부류(class)"에 지정될 수 있다. 온전 항체에는 주요 5가지 부류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있는데, 이들 중 수개는 "하위부류"(이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 Ig A2로 추가 분류될 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각기 α, Δ, ε, γ 및 μ로 불린다. 면역글로불린의 상이한 형의 서브유닛 구조 및 3차원 입체배치가 공지되어 있다.

[0096] 각종 실시양태들에서, 항체/표적화 부분은 Fc(항체 내)와 Fc 수용체(면역 세포 상) 간의 상호작용을 통해, 또한 항체/펩티드/리간드 또는 기타 표적화 부분에 대한 접합된 INAS를 통해, 면역 세포(예를 들어, NK 세포, 단핵구/대식세포, 수지상 세포)를 동원, 결합 및/또는 활성화한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 도입될 수 있는 항체의 예에는 세툭시맙(cetuximab)(표피 성장 인자 수용체 EGFR에 대한 키메라 단클론 항체), 파니투무맙(panitumumab)(항-EGFR), 니모투주맙(nimotuzumab)(항-EGFR), B8, 리툭시맙(Rituximab)(키메라 쥐/인간 항-CD20 MAb); 헤르셉틴(Herceptin), 트라스투주맙(trastuzumab)(항-Her2 hMAb); 파노렉스(Panorex) @(17-1A)(쥐 단클론 항체); 파노렉스 @(17-1A)(키메라 쥐 단클론 항체); IDEC-Y2B8(쥐, 항-CD20 MAb); BEC2(항-이디오타입(anti-idiotypic) MAb, GD 에피토프를 모방함)(BCG를 가짐); 온콜림(Oncolym)(Lym-1 단클론 항체); SMART MI95 Ab, 인간화 13'I LYM-I(온콜림), 오바렉스(Ovarex)(B43.13, 항-이디오타입 마우스 MAb); MDX-210(인간화 항-HER-2 이중특이적 항체); 선암종 상의 EGP40(17-1A) 범암종 항원에 결합하는 3622W94 MAb; 항-VEGF, RhuMAb(아바스틴(Avastin); 혈관신생을 억제함); 제나팍스(Zenapax)(SMART 항-Tac(IL-2 수용체); SMART MI95 Ab, 인간화 Ab, 인간화); MDX-210(인간화 항-HER-2 이중특이적 항체); MDX-447(인간화 항-EGF 수용체 이중특이적 항체); NovoMAb-G2(범암종 특이적 Ab); TNT(히스톤 항원에 대한 키메라 MAb); TNT(히스톤 항원에 대한 키메라 MAb); 글리오맙(키메라 MAb)-H(단클론-인간화 Ab); GNI-250 Mab; EMD-72000(키메라-EGF 길항자); 림포사이드(LymphoCide)(인간화 LL2 항체); 및 MDX-260 이중특이적, 표적 GD-2, ANA Ab, SMART IDIO Ab, SMART ABL 364 Ab 또는 이뮤레이트(ImmuRAIT)-CEA와 같은 항체들이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 상기 목록에서 설명된 바와 같이, 특정 표적 에피토프에 대한 항체를 만드는 것이 편리하다.

[0097] **A. 압타머**

[0098] 본 발명의 한 측면에서, 표적화 부분은 면역자극 서열에 연결된 압타머 분자이다. 예를 들어, 일부 실시양태들에서, 압타머는 하나 이상의 면역자극 핵산에 결합되거나 그것을 추가로 포함하는 표적화 부분으로서 작용하는 핵산으로 이루어진다. 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 종양 세포, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경에서의 분자에 대해 특이적인 압타머를 포함한다. 추가로, 그러한 조성물은 생물학적 활성 제제(예를 들어, 핵산 또는 펩티드)를 포함한다. 그러나, 압타머 그 자체는 표적화 모듈(서열)에 부가하여, 생물학적 활성 서열로 이루어질 수 있음이 명료하게 되어야 하는데, 여기에서 생물학적 활성 서열은 표적 세포에 대해 면역 반응을 유도할 수 있다. 즉, 그러한 압타머 분자는 본 발명의 이중 용도의 조성물이다. 일부 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 항체에 대한 압타머의 접합을 포함하는데, 여기에서 압타머 및 항체는 종양 세포, 종양 혈관계, 종양 미세환경 및/또는 면역 세포에서의 별도의 분자에 결합함에 있어 특이적이다.

[0099] 용어 "압타머"에는 특정 분자에 대한 특이적 결합 성질에 기초하여 선택되는 DNA, RNA 또는 펩티드가 포함된다. 예를 들어, 압타머(들)는 본원에 개시된 바와 같이, 종양 세포, 종양 혈관계, 종양 미세환경 및/또는 면역 세포에서의 특정 유전자 또는 유전자 산물에 결합하도록 선택될 수 있는데, 여기에서 선택은 당업계에 알려져 있고 당업자에게 자명한 방법에 의해 이루어진다. 후속하여, 상기 압타머(들)는 면역 반응을 조절 또는 조절하기 위해 대상에게 투여될 수 있다.

[0100] 특이적 단백질, DNA, 아미노산 및 뉴클레오티드에 대한 친화도를 가지는 일부 압타머가 기재되었다(예를 들어, 문헌 [K. Y. Wang, et al., Biochemistry 32:1899-1904(1993)]; 미국 특허 제5,691,145호(Pitner et al.); 문헌 [Gold, et al., Ann. Rev. Biochem. 64:763-797(1995)]; 미국 특허 제5,631,146호(Szostak et al.)). 고친화도 및 고특이성 결합 압타머가 조합 라이브러리로부터 유도되었다(문헌 [Gold, et al., 이하 상기와 동일함]). 압타머는 높은 친화도를 가질 수 있고, 그것의 평형 해리 상수는 사용 선택에 따라 마이크로몰 내지 서브나노몰 범위이다. 압타머는 또한 높은 선택도를 나타낼 수 있는데, 예를 들어 7-메틸g 및 g 간(문헌 [Haller and Sarnow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8521-8526(1997)]) 또는 D 및 L-트립토판 간(문헌 [Gold et al., 이하 상기와 동일함])에 천배차를 나타낸다.

[0101] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 두경부암, 호흡소화기암, 위장암, 식도암, 정상위/위암, 췌장암, 간-쓸개/간암, 직장결장암, 항문암, 소장암, 비뇨생식기암, 비뇨기과암, 콩팥/신장암, 요관암, 고환암, 요도/음경암, 부인과암, 난소/자궁관암, 복막암, 자궁/자궁내막암, 자궁경부/질/외음부암, 임신성 융모성 질병, 전립선

암, 골암, 육종(연조직/뼈), 폐암, 중피종, 세로칸암, 유방암, 중추 신경계암, 뇌암, 흑색종, 혈액암, 백혈병, 림프종(호지킨 질병 및 비호지킨 림프종), 형질 세포 신생물, 골수종, 골수 형성 이상 증후군, 내분비선 종양, 피부암, 멜라노마, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 췌장 내분비선암, 암양종, 다발성 내분비선 신생물, AIDS-관련 악성 종양, 미지 원발성 부위암 및 각종 소아암을 포함하나 이들에 국한되지 않는, 면역 장애, 염증성 질병, 감염성 질병 및 신생물성 질병/암으로부터 선택되는 질병 또는 증상의 진단, 검출 및/또는 영상화를 위한 제품, 및/또는 상기 질병 또는 증상의 예방 및/또는 치료 의약을 제조하기 위한, 상기 정의된 바와 같은 화합물 또는 압타머의 용도가 제공된다.

[0102] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 본 발명의 화합물, 압타머 또는 조성물을 포함하는, 면역 장애, 염증성 질병, 감염성 질병 및 신생물성 질병/암의 예방, 치료, 진단, 검출 및/또는 영상화를 위한 키트가 제공된다.

[0103] 그러므로, 본 발명의 각종 실시양태들에 있어, 하나 이상의 압타머는 특정 분자 표적(예를 들어, 압타머 표적화 EGFR 또는 기타 암 마커)에 기초하여 선택된다. 시험관내 선택을 위한 표준 절차가 알려져 있는데, 예컨대 문헌 [Science 249(4968) 505-510(1990)] 및 문헌 [Nature(London), 346(6287) 818-822(1990)]에 기재된 셀렉스(selex) 실험이 있으며, 이는 온전히 그대로 수행되거나 당업계에 공지된 변형 및 개량을 가하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 표적 서열의 단편은 제조업자의 사용설명서에 따라 hi 트랩 칼럼(활성화 nhs)(파마시아 바이오테크(Pharmacia biotech)에 의해 제공되는 선택 칼럼)에 결합된다. 칼럼은 1급 아미노기, 예컨대 폴리펩티드의 말단 아미노기를 가지는 화합물과 공유 결합을 형성한다. DNA 주형의 풀(라이브러리)을 크로마토그래피 칼럼에 첨가되어, 실온에서 대략 1시간 동안 표적 펩티드과 상호작용하도록 한다. 칼럼을 세정하여, 임의의 비결합 압타머를 제거하고, 결합 압타머는 용출 완충액(3 M 티오시안화나트륨)으로 용출한다. 이어서, 용출된 샘플을 nap-10 칼럼(파마시아 바이오테크 제공)으로 탈염하고, 마지막으로 에펜도르프관에서 무균수로 용출한다. 이를 후속하여 동결건조하고, 중합효소 연쇄 반응("pcr") 시약을 무수 올리고뉴클레오티드에 첨가하여, pcr을 위한 것으로 준비하며, 이를 56℃의 어닐링 온도에서 99 사이클로 수행한다. pcr 절차 후, 이 증폭으로부터 생성된 DNA를 크로마토그래피 칼럼에 첨가하여, 다음 선택 라운드(round)를 위해 사용한다. 선택 및 증폭의 이 연속 라운드를 10회 행한다. 달성된 최종 산물은 약 100 ㎕의 pcr 산물이었다.

[0104] 선택 및 증폭의 10회 라운드 후, 풀을 클로닝하여, 목적 표적 분자(예를 들어, EGFR)에 대한 친화도를 갖는 DNA 분자에 대해 스크리닝한다(ta 토포 클로닝 키트(ta topo cloning kit), 영국 인비트로겐(Invitrogen)). 개별 클론을 일반 pcr 프로토콜을 이용하여 특징화하고(이 때 어닐링 온도는 48℃이고, m13 프라이머를 이용하여 35회 사이클로 함), 2.5% 아가로스 겔 상에서 가시화한다. 양성 클론을 이후에 암피실린의 존재 하에 lb 배지에서 성장시키고, 표준 플라스미드 DNA 단리 키트(영구 키아젠(Quiagen))를 이용하여 단리한다. 풀을 표준 ird-800 방사능 방법(시퀴텀 엑셀(sequitherm excel) ii, 에피센터 테크놀로지즈(epicentre technologies), 미국 매디슨 소재)을 이용하여 추가로 시퀀싱한다.

[0105] 이에 따라, 표적 분자(예를 들어, 암 마커, 예컨대 EGFR)에 대해 특이적인 상기 압타머가 선택된다. 그러한 표적은 전술된 바와 같이 압타머의 동정에서 지지체에 결합될 수 있다. 예를 들어, 표적 펩티드는 크로마토그래피 칼럼 내 작용화 세파로스 비드 상에 고정화된다. 이에 따라, 결합 압타머는 칼럼 내에 보유되고, 이때 비결합 또는 약결합 압타머는 세정 제거된다. 강결합 압타머는 PCR에 의한 증폭을 위해 제거할 수 있다. 대부분의 강결합 압타머(들)을 구별하기 위해, 칼럼 선택/증폭 단계를 반복할 수 있다. 상이한 집합의 압타머가 각 연속 사이클에 존재하고, 큰 집합은 초기에 존재함을 인지하도록 한다. 전체 공정을, 예를 들어 10회 연속 라운드의 선택 및 증폭 후에 반복하여, 경쟁 결합을 통해 친화도 성숙을 행할 수 있다. 생성된 최종 압타머(들)를 클로닝하고 시퀀싱할 수 있고, 고친화도 및 특이성을 갖는 연속적 압타머(들)를 동정할 수 있다. 다른 회수의 선택/증폭 사이클을 이용할 수 있다.

[0106] 본 발명의 강결합 압타머는 다수의 방식으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 그것은 표적 분자의 발현이 일어나는 질병 또는 증상의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다. 그것은 또한 예를 들어 시험관내 또는 생체내 방법 또는 시험에 의해, 질병 및 증상의 진단 또는 검출에 사용될 수도 있다. 특히, 본 발명의 압타머는 표적 부근에 다른 제제를 지정하도록 하는 데 사용될 수 있다. 이에 따라, 압타머는 세포를 사멸시키거나 손상시키고/시키거나, 시험관내 또는 생체내 표적 농도를 지정하도록 검출가능한 제제에 결합될 수 있다. 각종 실시양태들에서, 종양/암 세포 또는 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 성분 표적화 압타머는 하나 이상의 면역자극 서열에 접합된다. 다른 실시양태들에서, 종양을 표적으로 하는 압타머 그 자체는 하나 이상의 면역자극 핵산 서열(면역자극 압타머)로 이루어질 수 있다. 한 측면에서, 면역자극 압타머는 항체에 접합될 수 있는데, 여기에서 압타머 및/또는 항체는 종양 세포/종양 혈관계/종양 미세환경 또는 면역 세포(예를 들어, 대식세포 또는 수지상 세포 등)의 상이한 성분에 결합할 수 있다. 이는 표적 세포에 대한 면역 반응을 동시에 활성화하면서, 종양 세포의 상이

한 성분의 이중특이적 또는 다중특이적 표적화를 허용할 수 있다.

[0107] 예를 들어, 메티오닌 팔 또는 포르피린 상의 카르복실레이트기가 표적으로 하는 압타머에 대한 부착점으로서 사용될 수 있다. 이 기는 압타머 상의 아미노기를 통해 복합체를 부착시키는 데 펩티드 커플링 방법이 사용되도록 한다. 이에 따라, 종양 요법을 취한 치료 부분을 지니는 상기 압타머(예를 들어, 면역자극 서열 또는 방사성동위원소 등을 지니는 압타머)가 생성될 수 있다. 그러한 커플링 방법은 온화한 조건 하에 진행되고 다중 복합체가 단일 압타머 상에 로딩되도록 하기 때문에 선호된다. 이러한 식으로, 하나 이상의 치료 부분의 보다 높은 국소 농도가 종양 부위에서 달성될 수 있다. 상기 기재된 표지화 프로토콜에 사용되는 포르피린 리간드는 상업적으로 수득되거나, 문헌 [Tetrahedron, 1997, 53, 6755-6790]에 기재된 방법과 같은 확립된 방법을 이용하여 합성된다.

[0108] 그러므로, 각종 실시양태들에서, 압타머는 표지화 부분에 연결될 수 있다. 예를 들어, 사용된 표지에 따라, 압타머 복합체의 표지화는 흡수 분광법, 질량 분광측정, 및 로다민 및 플루오레신과 같은 형광 표지의 경우에는 형광 분광법에 의해, 또한 MRI 활성 표지를 위한 이완지도법(relaxometry)에 의해서와 같이 광위의 물리적 기법을 이용하여 확인될 수 있다.

[0109] 압타머 표지화는 표준 펩티드 커플링 프로토콜을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 0.01 mmol(0.004 g)의 화합물 11 또는 0.01 mmol(0.009 g)의 포르피린을 0.5 cm^3의 물 및 0.5 cm^3의 dmf에 용해시킨다. 0.002 g의 edci를 용액에 첨가하여, 이를 실온에서 15분 동안 교반한다. 1 cm^3의 물 중 1 당량의 압타머를 첨가하고, 반응이 1시간 동안 진행되도록 한다. 샘플을 겔 투과 칼럼(nap-10) 상에 적용하고, 접합체를 12 cm^3의 PBS(인산염 완충액 염수)로 용출한다. 1 cm^3의 분획을 수집하고, 접합체를 함유하는 분획을 조합한다.

[0110] 표적화 목적을 위해 방사선표지된 압타머를 제조할 수 있다. 압타머의 치료 또는 진단제로서의 효능을 평가하기 위해, 리간드가 발생물질에서 나올 때 그것에 방사성 핵종이 로딩될 것이며, 다시 그것이 압타머에 커플링되어 직접 투여된다. 대안적으로, 리간드가 먼저 압타머에 커플링된 후, 투여 전에 방사성핵종이 로딩될 수 있다. 각 투여 후 및 처리 과정 중의 감마 카메라를 이용한 모니터링함으로써, 압타머의 진단 및 치료 시약으로서의 효능이 입증될 것이다.

[0111] 본 발명의 방법론은 DNA 압타머에 국한되지 않음을 인지하도록 한다. 그것은 또한 기타 유형의 올리고뉴클레오티드, 예컨대 RNA, 피라노실 RNA(pRNA), 및 변형 분자, 예컨대 비천연 염기 또는 변형 천연 염기를 포함한 올리고뉴클레오티드에도 적용가능하다. 그러므로, 일부 실시양태들에서, 압타머 분자는 치료 부분과 함께 DNA, RNA, pRNA으로 이루어진다.

[0112] 본 발명의 또 다른 측면에서, 압타머는 하나 이상의 치료 부분 및/또는 하나 이상의 표지화 부분에 연결될 수 있는 다가 작용화 압타머 분자를 제공한다. 작용화 압타머는 한 리간드가 부착되어 있을 수 있으나, 다중 리간드가 압타머에 부착되고/되거나 다중 압타머가 리간드에 부착될 수 있다. 5개 리간드 및 4개 압타머를 포함한 단위가 이하에 개략적으로 도시되어 있다: 3' 말단 및 5' 말단 모두에 변형을 가진 아미노 변형 압타머가 사용된다. 예를 들어, 4개 압타머 인식 단위가 수반될 수 있는데, 그것은 과잉 압타머의 출발 물질을 이용한 표준 펩티드 커플링 반응을 사용하여 도타의 4개 카프복시기에 펩티드 결합을 통해 부착되어(≥4:1 압타머:도타), 모든 이용가능한 커플링 부위들로의 커플링이 일어나도록 한다. 이어서, Mag3(또는 임의의 다른 리간드, 예컨대 리간드 9 또는 기타 상업적 리간드)를 압타머의 기타 말단에 커플링하여, 표적화 및/또는 치료 부분(예를 들어, 면역자극 핵산, 항체, 면역자극 분자, 세포독성제 및/또는 방사성핵종)이 로딩된 5개 리간드를 유효하게 지니는 4-압타머 복합체가 생성된다.

[0113] 다가 접근법은 세포 표적에 전달될 수 있는 치료 효과의 정도 또는 강도를 증가시킨다. 또한, 그러한 접근법은 또한 압타머-치료 부분 분자의 안정성(예를 들어, 뉴클레아제에 대한 내성)을 증가시키고 압타머의 반감기를 증가시킬 수 있어, 신체 내 활성을 유지하도록 한다. 또한, 다가는 압타머 치료제의 크기를 증가시킨다. 예를 들어, 4개의 압타머를 함께 연결함으로써, 분자가 크기가 유효하게 증가하고(각 개체 단위에 대해 10 kda 대신, 총 약 40 kda임), 이에 따라 시스템으로부터의 그것의 클리어런스(clearance)가 제한되고, 순환 시에 부가적 유용 시간이 제공된다. 그러한 변형 압타머의 순환 시간은 관련 방사성핵종의 반감기에 부합하거나 추월하여 수시간일 수 있다.

[0114] 상기 기술 내용으로부터 자명한 바대로, 본 발명의 압타머 또는 그것의 변형태는 각종 용도들, 예컨대 치료 또는 진단을 위해 또 다른 화합물에 연결될 수 있다. 압타머는 리간드, 예컨대 본원에 개시된 리가드에 예를

들어, 이온 결합 또는 공유 결합에 의해, 또는 수소 결합과 같은 기타 방식에 의해 결합될 수 있다. 이에 따라, 압타머는 리간드를 표적으로 인도할 수 있다. 압타머는 바람직하게 리간드에 직접 연결된다. 더욱 구체적으로는, 압타머가 펩티드 테터(tether)를 사용하지 않고 리간드에 결합될 수 있다. 압타머는 아미노기 또는 히드록실기와 같은 펜던트 부분에 의해 리간드 또는 기타 제제에 결합될 수 있다. 수가지 기타 제제는 동일한 압타머에 부착될 수 있고, 수가지 압타머는 동일한 제제에 부착될 수 있다. 압타머는 mag2(머캅토아세틸 디글리세린), mag3(머캅토아세틸 트리글리세린), hynic(히드라지노니코틴산), n_4-킬레이터, 히드라지노-형 킬레이터 및 티올-함유 킬레이터와 같은 리간드에 연결될 수 있다. 특히, 도타 및 관련 사이클렌 유래 리간드가 압터머의 작용화에 적당하다. 또한, 압타머는 형광기 또는 인광기, 및 MRI 제제에 연결될 수 있다. 그 예에는 플루오레신, 로다민, 비오틴, 시아닌, 아크리딘, 디곡시제닌-11-dutp 및 란탄계가 포함된다.

[0115] **C. 펩티드**

[0116] 본 발명의 일부 측면에서, 생물학적 활성 제제의 전달을 위한 표적화 부분은 펩티드이다. 예를 들어, INAS는 암 또는 종양 세포의 성분과 결합할 수 있는 펩티드에 접합될 수 있다. 그러므로, 그러한 본 발명의 접합체는 종양 세포의 세포 성분, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경의 성분에 결합하는 펩티드 표적화 부분을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 표적화 부분 펩티드는 인테그린의 길항자 또는 작용자일 수 있다. 알파 및 베타 서브유닛을 포함하는 인테그린에는 이하를 비롯한 다수의 유형들이 포함된다: $\forall_1\beta_1$, $\forall_2\beta_1$, $\forall_3\beta_1$, $\forall_4\beta_1$, $\forall_5\beta_1$, $\forall_6\beta_1$, $\forall_7\beta_1$, $\forall_8\beta_1$, $\forall_9\beta_1$, $\forall_1\beta_1$, $\forall_6\beta_4$, $\forall_4\beta_7$, $\forall_D\beta_2$, $\forall_D\beta_2$, $\forall_L\beta_2$, $\forall_M\beta_2$, $\forall_v\beta_1$; $\forall_v\beta_3$, $\forall_v\beta_5$, $\forall_v\beta_6$, $\forall_v\beta_8$, $\forall_x\beta_2$, $\forall_{IIb}\beta_3$, $\forall_{IELb}\beta_7$ 등.

[0117] 한 실시양태에서, 표적화 부분은 $\forall_v\beta_3$이다. 인테그린 $\forall_v\beta_3$은 다양한 세포 상에서 발현되고, 파골세포의 골 기질에의 접합, 혈관 평활근 세포의 이동, 및 혈관신생을 비롯한 수가지 생물학적 관련 과정을 매개하는 것으로 나타났다. 인테그린을 위해 적당한 표적화 분자에는 RGD 펩티드 또는 펩티도모방체(예를 들어, 미국 특허 제5,767,071호 및 제5,780,426호 참조)가 포함되고, $\forall_4.\beta_1$(∀LA-4), $\forall_4.\beta_7$와 같은 기타 인테그린을 위해 적당한 표적화 분자에는 비-RGD 펩티드 또는 펩티도모방체(예를 들어, 미국 특허 제6,365,619호; 문헌 [Chang et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:159-163(2002)]; 문헌 [Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:133-136(2002)] 참조) 등이 포함된다.

[0118] 본 발명의 특정 측면에서, 표적화 부분 펩티드는 파지 디스플레이 또는 기타 공급원으로부터 유래될 수 있고, 이에는 αvβ1 인테그린(CRRETAWAC(서열 번호 5)), αvβ3 인테그린(CDCRGDCFC(서열 번호 6)/RGD-4C; RGDWXE(서열 번호 7)), αvβ5인테그린(TRGDTF(서열 번호 8)), αvβ6(RGDLxxL(서열 번호 9) 또는 xxDLxxL(서열 번호 10)), αIIβ3(SRGDM(서열 번호 11)), αvβ5에 대한 아넥신 V 모방체(VVISYSMPD(서열 번호 12)), E-셀렉틴(IELLQAR(서열 번호 13)), 내피 세포 미토콘드리아(CNGRC-GG-(KLAKLAK)2(서열 번호 14)), 에프린-A2 및 에프린-A4(CVSNPRWKC(서열 번호 15), CHVLWSTRC(서열 번호 16)), 피브로넥틴(CWDDGWLC(서열 번호 17)), ICAM-I 또는 폰 빌레브란트 인자(CPCFLLGCC(서열 번호 18)/LLG-4C), 라민-1(DFKLFAVY(서열 번호 19)), P-셀렉틴(EWVDV(서열 번호 20)); MMP-9:인테그린 복합체(D/E)(D/E)(G/L)W(서열 번호 21), MMP-9 및 MMP-2(젤라티나제)(CTTHWGFTLC(서열 번호 22)), 내피상 I형 카드헤린(N-Ac-CHAVC-NH2), VEGF NxxEIExYxxWxxxxxY의 Flt-1 영역(서열 번호 23), VEGF의 KDR 영역(HTMYYHHYQHHL(서열 번호 24), ATWLPPR(서열 번호 25)), VEGF 수용체(WHSDMEWWYLLG(서열 번호 26), RRKRRR(서열 번호 27), 아미노펩티다제 N/CD13(NGR), NG2 프로테오글리칸(TAASGVRSMH(서열 번호 28), LTLRWVGLMS(서열 번호 29)), 부신샘 유래 펩티드(LMLPRAD(서열 번호 30)), 지방 조직 유래 펩티드(CKGGRAKDC(서열 번호 31)), 뇌 유래 펩티드(SR1), 뇌 내피 유래 펩티드(CLSSRLDAC(서열 번호 32)), 신경아교종 세포 유래 펩티드(VGLPEHTQ(서열 번호 33)), 신경모세포종 유래 펩티드(VPWMEPAYQRFL(서열 번호 34)), 골수 유래 펩티드(GGG, GFS, LWS), 유방암(HER2/neu) 유래 펩티드(LTVxPWx(서열 번호 35), LTVxPWY(서열 번호 36), HER2 Ab/트라스투주마브 미모토프-LLGPYELWELSH(서열 번호 37)), 결장 유래 펩티드(RPMC(서열 번호 38)), 장 유래 펩티드(YSGKWGW(서열 번호 39)), 두경부 편평 세포암 유래 펩티드(TSPLNIHNGQKL(서열 번호 40)), 폐 혈관계 유래 펩티드(CGFELETC(서열 번호 41)), 관상 동맥 내피 유래 펩티드(NSVRDL(G/S)(서열 번호 42), NSVSSx(S/A)(서열 번호 43)), 림프관 유래 펩티드(CGNKRTRGC(서열 번호 44)/Lyp-1), 다기관 유래 펩티드(GVL, EGRx(서열 번호 45), xFG(G/V)(서열 번호 46)), 췌장도 유래 펩티드(CVSSNPRWKC(서열 번호 47), CHVLWSTRC(서열 번호 48)), 췌장 유래 펩티드(SWCEPGWCR(서열 번호 49)), 전립선 유래 펩티드(AGG, DPRATPGS(서열 번호 50), SMSIARL(서열 번호 51), CGRRAGGSC(서열 번호 52), GVL), 망막 유래 펩티드(RDV, CSCFRDVCC(서열 번호 53)), 기형 유발 물질 리간드 유래 펩티드(TPKTSVT(서열 번호 54)) 및 자궁 유래 펩티드(GLSGGRS(서열 번호

55))이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0119] 한 측면에서, $\alpha_v\beta_3$ 펩티드는 $\alpha_v\beta_3$-리간드 상호작용에 관여하는 영역에서 $\alpha_v\beta_3$ 또는 $\alpha_v\beta_3$ 자체의 의 천연 리간드의 서열 특성을 가질 수 있다. 한 측면에서, $\alpha_v\beta_3$ 펩티드는 RGD 트리펩티드를 포함하고, RGD-함유 영역 내 천연 리간드에 대한 서열에 상응한다.

[0120] 한 측면에서, RGD-함유 펩티드는 $\alpha_v\beta_3$의 천연 리간드, 예컨대 피브리노겐, 비트로넥틴, 폰 빌레브란트 인자, 라미닌, 트롬보스폰딘 등의 리간드의 RGD-함유 영역의 아미노산 잔기 서열에 상응하는 서열을 가진다. 이들 $\alpha_v\beta_3$ 리간드의 서열은 익히 공지되어 있다. 즉, $\alpha_v\beta_3$ 펩티드는 임의의 천연 리간드로부터 유래될 수 있다.

[0121] 다른 측면에서, $\alpha_v\beta_3$ 펩티드는 다른 인테그린에 비해 그것의 천연 리간드(들)에 대한 $\alpha_v\beta_3$ 결합을 우선적으로 억제한다. $\alpha_v\beta_3$에 대한 선택성을 가지는 $\alpha_{v\beta3}$ 펩티드의 동정은 통상적 결합 억제 검정, 예컨대 ELISA 검정으로 용이하게 확인할 수 있다.

[0122] 본 발명의 펩티드는 통상 약 100개 이하의 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 60개 이하의 잔기, 보다 바람직하게는 약 30개 이하의 잔기를 포함한다. 본 발명의 펩티드는 선형 또는 환형일 수 있다.

[0123] 대상 펩티드가 $\alpha_v\beta_3$ 천연 리간드의 아미노산 잔기 서열과 동일할 필요는 없는 것으로 이해하여야 한다. 예시적인 서열은 CDCRGDCFC(서열 번호 3) 및 GGCDGRCG(서열 번호 4)를 포함한다.

[0124] 본 발명의 펩티드는 그것의 아미노산 잔기 서열이 본원에 예시된 펩티드의 임의의 유사체, 단편 또는 화학 유도체를 포함한다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 다양한 변화, 치환, 삽입 및 결실을 거칠 수 있으며, 이러한 변화는 그것을 사용할 때 특정 이점을 제공한다. 이와 관련하여, 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 펩티드는 하나 이상의 변화가 행해지고 하나 이상의 분석에서 $\alpha_v\beta_3$ 펩티드로서 작용하는 능력을 보유하는 인용 펩티드의 서열과 동일하기보다는 그것에 상응한다.

[0125] 용어 "유사체"는 하나 이상의 잔기가 작용적 유사 잔기에 의해 보존적으로 치환되고 본원에 기술된 바와 같은 $\alpha_{v\beta3}$ 활성을 나타내는, 본원에 구체적으로 나타낸 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 잔기 서열을 가지는 임의의 펩티드를 포함한다. 보존적 치환의 예에는 하나의 비극성(소수성) 잔기, 예컨대 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌으로의 다른 잔기의 치환, 아르기닌과 리신 간, 글루타민과 아스파라긴 간, 글리신과 세린 간과 같이 하나의 극성(친수성) 잔기로의 다른 잔기의 치환, 하나의 염기성 잔기, 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘으로의 다른 잔기의 치환 또는 하나의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산으로의 다른 잔기의 치환이 포함된다.

[0126] 용어 "단편"은 본원에 개시된 바와 같은 아미노산 잔기 서열을 가지는 폴리펩티드의 것보다 아미노산 잔기 서열이 짧은 임의의 대상 폴리펩티드를 지칭한다.

[0127] 본원에 사용되는 "종양 표적화 펩티드"는 100개 미만의 아미노산을 가지는 중합체를 포함하는데, 여기에서 중합체는 종양 세포의 세포 성분, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경의 성분에 특이적으로 결합한다.

[0128] 본 발명의 펩티드는 재조합 DNA 기술을 포함하여, 폴리펩티드 업계의 숙련자들에게 공지된 임의의 기술로 합성할 수 있다. 합성 화학 기술, 예컨대 고상 메리필드-타입(Merrifield-type) 합성이 순도, 항원 특이성, 바람직하지 않은 부산물의 부재, 제조 용이성 등으로 인해 바람직하다. 이용가능한 많은 기술에 대한 훌륭한 개요를 문헌 [Steward et al., "Solid Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969]; 문헌 [Bodanszky, et al., "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976]; 문헌 [J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983]; 문헌 [Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96, 1969]; 문헌 [Fields et al., Int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, 1990]; 및 고상 펩티드 합성에 대한 미국 특허 제4,244,946호, 종래 용액 합성에 대한 문헌 [Schroder et al., "The Peptides", Vol. 1 , Academic Press (New York), 1965]에서 찾아볼 수 있다. 이 합성에서 이용할 수 있는 적절한 보호기는 상기 텍스트 및 문헌 [J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, 1973]에 기술되어 있다.

[0129] ***II. 활성제***

[0130] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 치료제에 커플링된 표적 세포 상에 존재하는 분자에 대해 특이적

인 표적화 부분을 포함한다. 보다 특히, 그러한 치료제는 표적 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 생물학적 활성 제제이다. 그러므로, 일부 실시양태들에서, 본 발명의 조성물을 사용하는 방법은 종양 세포 및/또는 종양 성장의 증식 방지, 그것의 제거 또는 감소 등의, 암의 예방 또는 치료를 포함한다. 추가 실시양태들에서, 본 발명의 조성물을 사용하는 방법은 감염 제제와 관련된 질병의 예방 또는 치료를 포함한다.

[0131] **b. 핵산 분자**

[0132] 본원에 개시된 바와 같이, 핵산 분자는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: 이중 가닥 DNA(ds DNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 다중 가닥 DNA, 이중 가닥 RNA(ds RNA), 단일 가닥 RNA(ssRNA), 다중 가닥 RNA, DNA-RNA 하이브리드(단일 가닥 또는 다중 가닥), 펩티드 핵산(PNA), PNA-DNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), PNA-RNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), 잠금 핵산(LNA), LNA-DNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥), LNA-RNA 하이브리드(단일 또는 다중 가닥). 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 세포를 활성화할 수 있는 하나 이상의 면역자극 핵산 서열(INAS)을 포함한다.

[0133] **1. 면역자극 핵산 분자**

[0134] 일부 실시양태들에서, 치료제는 면역계를 활성화하고 면역 이펙터 세포를 표적 세포에 동원시키며, (예를 들어, 성장 인자-매개 시그널링의 동시 차단에 의해) 종양 세포를 면역학적 세포독성에 감작화하는 것을 동시에 행하는 면역자극 DNA-접합 또는 RNA-접합 항체 또는 기타 표적화 부분이다. 면역 이펙터 세포는 직접적 DNA- 또는 RNA-유도 사멸 시그널링과 협력하여, 종양 세포의 아포프토시스를 유도한다. 또한, 아포프토시스 종양 세포에 의해 방출된 종양 항원은 예를 들어 수지상 세포(DC)에 의해 제시되어, 장기 유지 적응성 항종양 면역 반응을 발생시킨다. 그러므로, 정상 세포에 대한 독성없이 세포내 사멸 시그널링을 선택적으로 활성화하고 종양 세포를 면역학적으로 제거하는 것을 달성할 수 있다.

[0135] 한 측면에서, 치료제는 자체의 면역자극 영향에 비의존성인 기전을 통해 표적 종양 세포의 직접적 사멸을 유도하는 뉴클레오티드-접합 항체 또는 뉴클레오티드-접합 표적화 부분이다. EGFR-발현 암 세포를 DNA-접합 항-EGFR 항체로 처리하거나, HER2/neu-발현 암 세포를 DNA-접합 항-HER2/neu 항체로 처리하게 되면, PBMC 부재 하에서 직접적인 표적 수용체-특이적 사멸이 초래된다. 뉴클레오티드-접합 항체로의 처리에 의한 표적 세포의 탈조절화 세포-세포 융합은 수명이 제한되고 복제능이 손상된 합체(하이브리드 또는 다핵화) 세포를 형성시킨다. 이러한 신규 형태의 표적 세포사(세포 과융합)는 비접합 모 항체(항-EGFR 항체 또는 항-HER2/neu 항체) 또는 유리 DNA로의 처리에 의해서는 관찰되지 않는다. 직접적 세포사를 유도하는 항체-접합 뉴클레오티드 서열의 예(*는 포스포로티오에이트 결합을 나타내고, 나머지는 포스포디에스테르임): 5' G*G*GGACGACGTCGTG-G*G*G*G*G*G 3'(서열 번호 1); 5' G*G*GGGAGCATGCTGG*G*G*G*G*G 3'(서열 번호 2). 세포 과융합은 위상차 현미경관찰, 트립판 블루 배제, 크리스탈 바이올렛 염색, 합체 세포체의 검출 및/또는 다핵 세포체 형성의 검출을 포함하나 이들에 국한되지 않는 세포 생존/증식을 검정하는 방법에 의해 관찰될 수 있다.

[0136] 한 측면에서, DNA-접합 또는 RNA-접합 폴리펩티드/펩티드는 종양 세포의 환경에서 항종양 면역 반응을 활성화함과 동시에 종양 혈관신생을 억제한다. 관련 측면에서, 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경을 표적으로 하는 폴리펩티드/펩티드는 면역자극 DNA/RNA를 종양에 전달하는 것을 돕고, 또한 종양 혈관신생을 억제한다.

[0137] 한 실시양태에서, 표적화 부분은 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)을 포함하는 핵산 서열, 또는 면역 세포의 활성화, 성숙, 증식 및/또는 생존을 직접적으로 또는 간접적으로 유도하는 기타 서열에 연결된다. 그러한 면역 세포에는 수지상 세포, T 림프구, 자연 살해 세포, B 림프구, 단핵구 또는 대식세포가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 또한, 그러한 핵산 서열은 Toll-유사 수용체(TLR) 및 뉴클레오티드-결합 올리고머화 도메인(NOD)-유전자 계열의 구성원을 포함한 엔도좀 발현 수용체의 결찰을 통해, 또한/또는 레티노산-유도성 단백질 I(RIG-I) 및 MDA-5에 의한 검출을 포함한 TLR-비의존성 면역 세포 자극을 통해, 또한/또는 표적 세포 반응, 예컨대 알라민, 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자를 포함한 내인성 면역자극 분자의 발현 또는 방출을 통해, 또한/또는 손상 또는 사멸 중인 표적 세포로부터의 면역 위험 신호를 통해, 선천성 또는 적응성 면역력을 활성화할 수 있다. 각종 실시양태들에서, 표적화 부분에 커플링된 생물학적 활성 제제는 TLR3, TLR7/8 및 TLR9를 포함하나 이들에 국한되지 않는 TLR의 작용자이다.

[0138] 본 발명의 각종 실시양태들에서, 하나 이상의 표적화 부분은 핵산 분자(들)를 포함하는 하나 이상의 생물학적 활성 제제(들)에 커플링된다. 예를 들어, 활성 제제는 하나 이상의 면역자극 핵산 서열(INAS)일 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 서열 중 하나 이상은 병원체-관련 분자 패턴(PAMP), 또는 면역 세포의 직접적으로 Toll-유사

수용체(TLR)-의존성 또는 TLR-비의존성 활성화, 증식 및/또는 생존을 직접적으로 유도 및/또는 촉진하는 기타 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 활성제는 리소좀 분해를 탈피하는 비분해 뉴클레오티드에 대한 세포성 반응을 통해 면역 세포의 활성화/증식/생존을 유도하는 안정성/안정화된 핵산 서열(들)을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 서열은 면역 세포의 활성화, 증식 및/또는 생존을 유도 또는 촉진하는 세포성 반응을 촉발하는 위험 신호 또는 손상-관련 분자 패턴(DAMP)으로서 인식되는 구조 또는 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 표적 세포사를 촉진하고(사멸 시그널링 반응의 활성화 및/또는 생존 유전자 발현의 억제), 스트레스를 받거나 손상되거나 사멸 중인/아포프토시스 표적 세포로부터의 면역자극 분자에 의해 촉발되는 이차 면역 활성화를 촉진하는 코딩 또는 비코딩 서열이다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 그것의 이차 구조로 인해 면역자극 분자로서 작용한다.

[0139] 개시내용 전반에 기초하여 자명한 바와 같이, INAS는 하기의 것들로부터 선택될 수 있다: ssDNA, ds DNA, 안티센스 DNA, 올리고데옥시뉴클레오티드, ds RNA, ss RNA, siRNA, shRNA, miRNA, 올리고리보뉴클레오티드, 리보자임, 플라스미드, DNA/RNA 하이브리드 또는 압타머.

[0140] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)을 포함하는 하나 이상의 핵산 서열 또는 면역 세포의 Toll-유사 수용체(TLR)-의존성 또는 TLR-비의존성 활성화, 증식 및/또는 생존을 유도 및/또는 촉진하는 기타 서열에 커플링된, 본원에 기재된 바와 같은 표적화 부분을 포함한다.

[0141] 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)은 병원체 또는 손상된 숙주 세포로부터의 모티프, 예컨대 Toll-유사 수용체(TLR)- 및 뉴클레오티드-결합 올리고머화 도메인(NOD)-유전자 계열의 구성원을 포함하는 수용체를 통해 면역계에 의해 인식되는 핵산이다. 핵산 서열[이중 가닥(ds) RNA, 단일 가닥(ss) RNA, ds DNA 및 ss DNA]은 대식세포, 단핵구, 수지상 세포 및 기타 항원-제시 세포(APC)에서 발현되는 특이적 TLR에 의해 인식/함입을 통해 선천성 또는 적응성 면역계를 활성화한다. 대식세포 및 수지상 세포에서, 핵산을 인식하는 TLR이 엔도좀에서 발현된다. 이에는 각기 ds RNA, ss RNA 및 DNA를 감지하는 TLR3, TLR7/8 및 TLR9가 포함된다. 핵산 리간드의 (예컨대, 항체-매개 수용체-매개 세포흡수작용을 통한) 세포내 엔도좀으로의 효율적 위치이동은 TLR-활성화 및 면역자극을 유도한다.

[0142] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 TLR 작용자에 커플링된, 본원에 기재된 바와 같은 표적화 부분을 포함한다. TLR은 미생물 공급원으로부터 방출된 천연 발생의 분자; 미생물 산물의 것에 기초한 합성 분자; 천연 발생의 리간드와의 명료한 구조적 관련성이 없는 소분자; 및 숙주 기원의 내인성 리간드에 의해 활성화된다.

[0143] 한 실시양태에서, 표적화 부분(예를 들어, EGFR에 대해 특이적인 항체)에 커플링된 생물학적 활성 제제는 PAMP 또는 TLR 작용자를 포함하는 임의의 서열일 수 있는 INAS이다. INAS는 TLR 활성화(TLR 작용자) 및/또는 면역 반응의 자극을 도출할 수 있는 구조 또는 화학작용을 가지는 임의의 핵산 서열을 포함할 수 있다. TLR은 TLR1 내지 TLR11 포함하나 이들에 국한되지 않는 임의의 TLR을 포함한다. INAS는 표적화 부분으로의 접합을 통해 대식세포, 단핵구 및/또는 수지상 세포에 도입될 때 TLR-활성화 및/또는 면역자극이 가능한 서열 또는 구조를 가지는 임의의 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 핵산의 항체로의 접합은 (항체-매개 Fc 수용체-매개 세포흡수작용을 통해) 면역 세포로의 그것의 엔도좀 전달을 용이하게 하고, 그것의 면역계 활성화 능력을 증가시킨다. 특이적 또는 정준(canonical) 면역자극 모티프에 엄격히 순응하지 않는 DNA 또는 RNA 서열도 또한 항체-접합을 통해 대식세포 또는 수지상 세포 내로 도입될 때 TLR-활성화 및/또는 면역자극이 가능한 것으로 간주됨이 주목된다.

[0144] 일부 실시양태들에서, INAS, PAMP 또는 TLR 작용자를 지니는 약독화 또는 불활성화(생 또는 사멸) 면역자극 병원체(예컨대, 세균 또는 바이러스)는 종양 표적화 부분(예를 들어, 항체, 펩티드, 압타머)에의 접합 또는 발현을 통해 종양에 표적화된다.

[0145] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용되도록 고려되는 INAS는 세균 또는 바이러스 병원체로부터 유래된 게놈 핵산 서열(DNA 또는 RNA)이다. 또 다른 실시양태에서, INAS는 병원체의 게놈 또는 유기체의 게놈의 일부에 상응하는 합성 DNA 또는 RNA "모방체"(예를 들어, 유도체 및 유사체)이다. 예시적 비제한적 서열에는 세균 DNA 또는 RNA(예를 들어, 약독화 마이코박테리아 칼메트-게랑 간균 DNA; 바실러스 안트라시스; 브루셀라(Brucella); 살모넬라(Salmonella); 쉬겔라(Shigella)) 및 바이러스 DNA 또는 RNA(예를 들어, 플라비비리다에, 파라마익소비리다에, 오르토마익소비리다에, 랍도비리다에; 단순 포진 바이러스 1형 또는 2형 DNA; 레오바이러스 ds RNA; 인플루엔자 바이러스 ss RNA; 조류 인플루엔자; 노로바이러스; HIV-1 ss RNA; HIV gag mRNA)이 포함된다.

[0146] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용되도록 고려되는 상기 활성제(INAS 또는 TLR 작용자)에

는 이중-가닥 RNA(ds RNA)의 형태일 수 있는 TLR3, TLR7, TLR8의 작용자; 단일-가닥(ss) RNA; 짧은 간섭 RNA(siRNA); 짧은 헤어핀 RNA(sh RNA)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 그러한 작용자는 TLR3, TLR7 및/또는 TLR8를 활성화하고 수지상 세포(DC) 및/또는 기타 면역 세포를 활성화할 수 있는 상이한 서열 및 길이의 천연 또는 합성 RNA일 수 있다.

[0147] 각종 실시양태들에서, INAS의 면역자극 활성(시험관내 전사된 RNA 또는 화학적으로 합성된 올리고리보뉴클레오티드)은 하기 구체 항목 중 하나 이상에 의해 증가될 수 있다: 메틸화 뉴클레오시드(5-메틸시티딘, N6-메틸아데노신, N7-메틸구아노신 5-메틸우리딘, 2'-O-메틸화 뉴클레오시드 포함)의 부재; U 잔기의 변형(2-티오우리딘 또는 슈도우리딘 포함)의 부재; 3' 폴리(A) 테일의 부재; 5' 말단 캡 구조의 부재; 5'-삼인산염 부분의 존재; 최소 길이 19개 염기의 서열; 또는 뉴클레아제에 대한 내성(예를 들어, 포스포로티에이트 뉴클레오티드간 연결기). 예시적 비제한적 서열에는 예를 들어, 5' pUGGAUCCGGCUUUGAGAUCUU(서열 번호 [[]]); 5' ppGGGAGACAGGGGUGUCCGCCAUUUCCAGGUU(서열 번호); 또는 5' pppGGGAGACAGGCUAUAACUCACAUAAUGUAUU(서열 번호)가 포함된다.

[0148] 추가 실시양태들에서, 상기 활성 제제(INAS 또는 TLR 작용자)는 dsRNA, 폴리이노신-폴리시티딜산(폴리 I:C); 긴 ds RNA(>30개 염기); siRNA 이중체를 포함하나 이들에 국한되지 않는 TLR3 작용자이다.

[0149] 또 다른 실시양태들에서, 상기 활성 제제(INAS 또는 TLR 작용자)는 단일-가닥(ss) RNA; 이중 가닥(ds) RNA; 짧은 간섭 RNA(siRNA); 짧은 헤어핀 RNA(sh RNA); 면역자극 서열/모티프를 갖는 RNA를 포함하나 이들에 국한되지 않는 TLR7 또는 TLR8 작용자이다.

[0150] 각종 다른 실시양태들에서, 표적화 부분에 커플링된 생물학적 활성 제제(들)에는 siRNA 2중체 또는 ds RNA 또는 ss RNA 또는 shRNA의 어느 한 가닥에 위치한 5'-UGUGU-3' 또는 5'-UGU-3' 모티프(들)를 갖는 합성 RNA가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 예시적 서열에는 하기 RNA가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다: 5'-CUACACAAAUCAGCGAUUU(서열번호): 3'-GAUGUGUUUAGUCGCUAAA(서열 번호 [[]]): 5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUA(서열 번호): 3'-AACUACACAAAUCAGCGAU(서열 번호): 5'-GAUUAUGUCCGGUUAUGUA(서열 번호): 3'-CUAAUACAGGCCAAUACAU(서열 번호); 5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG(서열 번호); 3'-UACAUAACCGGACAUAAUC(서열 번호); 5'-GGUCGGAAUCGAAGGUUUA(서열 번호): 3'-CCAGCCUUAGCUUCCAAAU(서열 번호): 5'-GGUCGGAGCUAAAGGUUUA(서열 번호): 3'-CCAGCCUCGAUUUCCAAAU(서열 번호): 5'-CAGCUUUGUGUGAGCGUAU(서열 번호): 3'-GUCGAAACACACUCGCAUA(서열 번호).

[0151] 각종 다른 실시양태들에서, 표적화 부분에 커플링된 생물학적 활성 제제(들)에는 siRNA 이중체 또는 단일 가닥 RNA 또는 짧은 헤어핀(sh) RNA의 어느 한 가닥에 위치한 5'-GUCCUUCAA-3' 모티프(들)를 갖는 합성 RNA가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 일부 실시양태들에서, 상기 제제는 RNA=19개 염기의 최소 길이를 가지고, TLR9-비의존성이다. 그러한 활성제를 위한 예시적 서열에는 5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAAdTdT-3'(서열 번호); 5'-UUGAAGGACAGGUUAAGCUdTdT-3'(서열 번호 [[]]); 5'-ACCUGUCCUUCAAUUACCAdTdT-3'(서열 번호); 5'-UGGUAAUUGAAGGACAGGUdTdT-3'(서열 번호); 5'-AAAAAAAACUGUCCUUCAA(서열 번호); 5'-AAAAAAAAAUGUCCUUCAA(서열 번호); 5'-AAAAAAAAAAGUCCUUCAA(서열 번호); 5'-UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA(서열 번호); 5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAA(서열 번호); 또는 5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAACUACACAAAUUGAAGGACAGGUUAAGCU(서열 번호)가 포함된다.

[0152] 추가 실시양태들에서, 상기 활성제는 GU- 또는 U-풍부 서열이다. 그러한 활성제를 위한 예시적 서열에는 (G+U)-풍부 단일 가닥 RNA(GU 디뉴클레오티드); 폴리(U)-풍부 ssRNA 5'-UUUUUUUUUUUUUUUUU(서열 번호 [[]])가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0153] 추가 실시양태들에서, 상기 활성제는 이미다졸 퀴놀린(예를 들어, 이미퀴모드, 레시퀴모드); 구아노신 뉴클레오티드 및 유사체(예를 들어, 록소리빈; 7-티아-8-옥소-구아노신; 7-데아자구아노신; 7-알릴-8-옥소구아노신)이다.

[0154] 추가 실시양태들에서, 상기 활성제는 반복 요소, 단순 반복체 및 인접 반복을 가지는 RNA 서열, 또는 하나의 염기(아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 우라실, 이노신산 또는 잔틸산)의 "런(runs)", 예를 들어 폴리(A), 폴리(C), 폴리(G), 폴리(U), 폴리(X), 폴리(I)이다.

[0155] 본 발명의 다른 실시양태들에서, 생물학적 활성 제제는 TLR9 작용자, 예컨대 단일 가닥 DNA(ss DNA) 또는 이중 가닥 DNA(ds DNA), 세균 DNA, 바이러스 DNA 또는 플라스미드 DNA이다. 한 예에서, 그러한 작용자는 단순 포진 바이러스 1형 DNA를 포함한다.

[0156] 다른 실시양태들에서, 상기 TLR9 작용자 활성제는 CpG를 갖는 올리고데옥시뉴클레오티드(즉, "CpG DNA", 또는

구아노신에 이어 시토신를 함유하고, 인산염 결합에 의해 연결된 DNA), 예컨대 CpG 모티프를 갖는 올리고데옥시뉴클레오티드[TCGTT 또는 TCGTA 또는 TCGACGX 또는 TCGATCG](메틸화 또는 비메틸화). 그러한 면역자극 핵산 서열의 예에는 CpG A: 포스포로티오에이트(*) 혼합 골격; 단일 CpG 모티프(육량체성 퓨린-피리미딘-CG-퓨린-피리미딘)이 포함되고; CpG 플랭킹 영역은 회문을 형성함(줄기-루프 구조를 형성할 가능성을 가지는 자가-상보성 염기); 3' 말단에 있는 폴리-G 테일(상호작용하여, ODN 클러스터를 형성할 수 있음), (예를 들어, G*G*TGCATCGATGCAG*G*G*G*G*G(서열 번호 [[]])); CpG B: 포스포로티오에이트 골격; 다중 CpG 모티프; TCG(예를 들어, TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT(서열 번호)); CpG C: 포스포로티오에이트 골격; 다중 CpG 모티프; 5' 말단에 있는 TCG 이량체; 중심 회문에 함침된 CpG 모티프(예를 들어, TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG(서열 번호 [[]])); 기타 CpG 화합물: 5'-TCGXCGX 및 5'-TCGXTCG(X=임의의 뉴클레오티드).

[0157] 다른 실시양태들에서, 상기 활성제는 친수성 스페이서가 있거나 없는 포스포로티오에이트 골격(예를 들어, 5'-TCGACGT(분지형, 스페이서가 있음); 또는 5'-TCGATCG(분지형, 스페이서가 있음))을 가지는 유리 5' 말단을 갖는 다중 카피로서 제시된다.

[0158] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 식에 의해 표시되는 CpG 모티프를 포함하는 면역자극 핵산 서열을 제공한다:

[0159] $5'N_1X_1CGX_2N_2 3'$

[0160] (여기에서, 적어도 하나의 뉴클레오티드는 연속 CpG를 분리시키고; X_1은 아데닌, 구아닌 또는 티민이며; X_2는 시토신 또는 티민이고; N은 임의의 뉴클레오티드이고, N_1+N_2은 약 0 내지 26개 염기이며, 다만 N_1 및 N_2가 CCGG 4량체 또는 하나 초과의 CCG 또는 CGG 3량체를 포함하지 않고; 핵산 서열은 길이가 약 8 내지 30개 염기임).

[0161] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 식에 의해 표시되는 CpG 모티프를 포함하는 단리된 면역자극 핵산 서열을 제공한다:

[0162] $5'N_1X_1X_2CGX_3X_4N_2 3'$

[0163] (여기에서, 적어도 하나의 뉴클레오티드는 연속 CpG를 분리시키고; X_1 및 X_2는 GpT, GpG, GpA, ApT 및 ApA를 포함하며; X_3 및 X_4는 TpT 또는 CpT를 포함하고; N은 임의의 뉴클레오티드이고, N_1+N_2은 약 0 내지 26개 염기이며, 다만 N_1 및 N_2가 CCGG 4량체 또는 하나 초과의 CCG 또는 CGG 3량체를 포함하지 않고; 핵산 서열은 길이가 약 8 내지 30개 염기임).

[0164] 한 관련 측면에서, 본 발명의 면역자극 핵산 서열은 GpT, GpG, GpA 및 ApA로부터 선택되는 X_1 및 X_2를 포함하고, X_3 및 X_4는 TpT, CpT 및 GpT로부터 선택된다. 세포로의 수용을 용이하게 하기 위해, CpG 함유 면역자극 핵산 분자는 길이가 8 내지 30 염기 범위 내일 수 있다. 그러나, 임의의 크기(심지어 많은 kb 수)의 핵산은, 충분한 면역자극 모티프가 존재하는 경우 자극성인데, 이는 그러한 보다 큰 핵산이 세포 내에서 올리고뉴클레오티드로 분해되기 때문이다. 또 다른 측면에서, 합성 올리고뉴클레오티드는 5' 및/또는 3' 말단에 또는 그 부근에 CGG 4량체 또는 하나 초과의 CCG 또는 CGG 3량체를 포함하지 않고/않거나, 일치 유사분열 CpG 모티프는 회문이 아니다. 연장된 면역자극은 안정화된 올리고뉴클레오티드를 이용하여 수득될 수 있는데, 여기에서 올리고뉴클레오티드는 인산염 골격 변형을 포함한다. 예를 들어, 변형은 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 변형이다. 더욱 특히, 인산염 골격 변형은 핵산의 5' 말단, 예를 들어 핵산의 5' 말단의 첫 번째 2개 뉴클레오티드에서 일어난다. 또한, 인산염 골격 변형은 핵산의 3' 말단, 예를 들어 핵산의 3' 말단의 마지막 5개 뉴클레오티드에서 일어날 수 있다.

[0165] 한 측면에서, CpG DNA는 그것이 올리고뉴클레오티드일 때, 크기가 8 내지 30개 염기 범위 내이다. 대안적으로, CpG 디뉴클레오티드가 플라스미드 내에 대규모로 생산될 수 있고, 이는 대상에 투여된 후, 올리고뉴클레오티드로 분해된다. 또 다른 측면에서, 핵산 분자는 B 세포, 단핵구 및/또는 자연 살해 세포 반응(예를 들어, 사이토카인, 증식성, 용해성 또는 기타 반응)에 대해 비교적 높은 자극 지수를 가진다.

[0166] 예시적 CpG DNA 서열: 5' G*G*GGACGACGTCGTGG*G*G*G*G*G 3'(서열 번호 1)-포스포로티오에이트(*) 혼합 골격.

[0167] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 비메틸화 CpG 모티프를 갖는 RNA(CpG RNA), 예컨대 포스포로티에이트(PS) 골격, 비메틸화 CpG 모티프 및 3' 폴리 G 테일을 갖는 올리고리보뉴클레오티드(예를 들어, CpG ORN)를 포함한 면역자극 핵산 서열(INAS)을 가진다. 그러한 서열은 직접적으로 단핵구를 활성화하여 IL-12를 생산하고, 간접적으로는 NK 세포를 자극하여 IFN-[]를 생산하는 작용을 할 수 있다. 예시적 CpG ORN 서열에는 5'-

GGUGCAUCGAUGCAGGGGGG(서열 번호 [[]]); 5'-GGUGCUUCGUUGCAGGGGGG(서열 번호); 5'-GGUGCUUCGAUGCAGGGGGG(서열 번호); 또는 5'-GGUGCUACGUUGCAGGGGGG(서열 번호)이 포함된다.

[0168] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 비메틸화 CpG를 포함하지 않는 합성 올리고데옥시뉴클레오티드를 포함한 생물학적 활성 제제를 가진다. 그러한 면역자극 핵산 서열의 예에는 하기의 것들이 포함된다: 정준 CpG 모티프 결핍 ss DNA(GC 역위 또는 메틸화 시토신)는 또한 TLR-9(수용체-매개 세포흡수작용을 통한 엔도좀 위치이동 후); 자가-상보성 폴리뉴클레오티드, 폴리-(dG,dC); 저함량의 비-메틸화 CpG 서열을 갖는 DNA; 및 포스포로티오에이트(PS*) 골격(PS-ODN)을 갖는 비-CpG ODN를 활성화할 수 있다. CpG 모티프 결여 PS-ODN이 단핵구가 높은 수준의 CD83, CD86, CD40 및 HLA-DR 및 낮은 수준의 CD14를 발현하는 DC 표현형으로 분화하고, CpG-비의존성 방식으로 CCL3 및 CCL4 β-케모카인을 분비하도록 유도함이 주목된다. 예를 들어, 일부 실시양태들에서, 상기 TLR9 작용자는 T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*CT*T(서열 번호 [[]]) 또는 T*C*C*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T(서열 번호)이다.

[0169] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 면역자극 모티프를 갖는 올리고데옥시리보뉴클레오티드-PyN(T/A)(T/C/G)(T/C/G)(T/G)GT를 포함하는 생물학적 활성 제제를 가지는데, 여기에서 Py=C/T; N=임의의 데옥시리보뉴클레오티드이고; 괄호 안의 적어도 2개의 위치는 T; 적어도 20개 이상의 뉴클레오티드; 단일 가닥; 플랜킹 서열-5'XX 모티프 XXXX-3이다. 예시적 서열에는 5'-TCATCATTTTGTCATTTTGTCATT(서열 번호 [[]]); 5'-TCATTATTTTGTTATTTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCCTTTTGTCCTTTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCTTTTTGTCTTTTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCAATTTGTCAATTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCATCTTGTCATCTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCATGTTGTCATGTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCATTCTGTCATTCTGTCATT(서열 번호): 5'-TCATCATTGTGTCATTGTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATCATTTGGTCATTTGGTCATT(서열 번호); 5'-TCATTTTTTTGTTTTTTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATTGTTTTGTTGTTTTGTCATT(서열 번호); 5'-TCATTCTTTTGTTCTTTTGTCATT(서열 번호)이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0170] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 레티노산-유도성 단백질 1(RIG-1) 및 MDA-5를 통해 TLR-비의존성 면역 자극을 유도하는 핵산 서열을 포함한다. 병원체-유래 핵산의 검출은 효과적인 항바이러스 방어에 필수적인 2개의 시토졸 헬리카제인 레티노산-유도성 단백질 1(RIG-1) 및 MDA-5를 수반한다. RIG-1은 RNA 바이러스(플라비비리다에, 파라마익소비리다에, 오르토마익소비리다에 및 랍도비리다에)의 특정 세트를 인식하는 반면, MDA-5는 RNA 바이러스(피코르나비리다에)의 또 다른 세트에 대한 방어의 원인이 된다. 바이러스 감염 세포의 세포질 내 자가 풍부 RNA로부터 바이러스 RNA를 분리하기 위한 구조적 기초는 바이러스 중합효소에 의해 생성되는 RNA의 5'-삼인산염 말단의 (RIG-1)-매개 검출을 수반한다. 5'-삼인산염 RNA의 검출은 진핵생물에서의 전사후 RNA 가공 중에 모두 일어나는, 5'-삼인산염 말단의 캡핑 또는 RNA의 뉴클레오시드 변형에 의해 폐지된다. 음성-가닥 RNA 바이러스로부터 제조된 게놈 RNA 및 바이러스-감염 세포로부터 제조된(비감염 세포로부터는 제조되지 않은) RNA는 강한 인터페론-α-반응을 촉발할 수 있다. 또한, RIG-1에 의한 삼인산염 RNA의 인식은 DC, 단핵구, 기타 진핵 세포에서 인터페론 반응을 유도한다. 이에 따라, 반응은 면역 세포에 국한되지 않는다.

[0171] 그러므로, 각종 실시양태들에서, INAS는 RIG-1에 의해 인식되는 분자 지표를 갖는 RNA 서열: 비캡핑된 5'-삼인산염 RNA(이제 3pRNA로 칭해짐); 5' 말단 캡 구조(7-메틸 구아노신 캡)의 부재; 및 우리딘 변형(슈도우리딘 또는 2-티오우리딘 또는 2'-O-메틸화 UTP)의 부재를 포함할 수 있다.

[0172] 다른 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 하기의 것들을 포함하나 이들에 국한되지 않는 바이러스 중합효소(시토졸 내 비캡핑된 5'-삼인산염을 생성함)를 코딩하는 핵산(DNA 또는 RNA) 백신을 포함한다: 플라비비리다에 과의 양성 가닥 RNA 바이러스; 분절화 NSV(VSV, Flu); 파라마익소바이러스 및 랍도바이러스를 포함한 비분절화 NSV.

[0173] 다른 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 19개 염기의 최소 길이를 갖는 RNA(5'-삼인산염)(특이적 서열 모티프가 필요하지 않고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있음), 예컨대 시험관내 전사 RNA의 하기 예의 것을 포함한다: 5'-pppAGCUUAACCUGUCCUUCAA-3'(서열 번호); 5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-SX 서열 번호 [[]]); 5'-pppGGGGAUGAACUUCAGGGUCAGCUU-3'(서열 번호); 5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'; 3'-UUCGACUGGGACUUCAAGUAGGGGppp-5'(서열 번호).

[0174] 또 다른 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 시토졸내 발현 T7 RNA 중합효소을 통한 시험관내 전사된 삼인산염 RNA; 바이러스 게놈 서열의 시험관내-생성 dsRNA 단편(예를 들어, 뉴캐슬병 바이러스); RNA 바이러스(예를 들어, 플라비비리다에, 파라마익소비리다에, 오르토마익소비리다에 및 랍도비리다에)로부터의 게놈 RNA 또는 시

험관내 생성 RNA를 포함한다.

[0175] 또 다른 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 긴 이중-가닥 RNA, 짧은 ds RNA(예컨대, si RNA), 또는 블런트 말단을 갖는 짧은 ds RNA일 수 있는 INAS를 포함한다.

[0176] 또 다른 실시양태들에서, INAS는 MDA-5에 의해 인식되는 분자 지표를 갖는 RNA 서열, 예컨대 긴 이중-가닥 RNA 또는 폴리(I:C)을 포함할 수 있다.

[0177] 각종 실시양태들에서, 생물학적 활성 제제(들)은 리소좀 분해를 탈피하는 비분해된 뉴클레오티드에 대한 세포성 반응을 통해 면역 세포의 활성화/증식/생존을 유도하는 안정화된 핵산 서열(들)이다.

[0178] 대식세포는 프로그래밍된 세포사 중에 생성되는 아포프토시스 사멸 중 세포를 둘러싸서, 리소좀 DNA아제로 DNA를 분해한다. 대식세포 및 수지상 세포 내 리소좀 분해를 탈피하는 내인성 DNA는 Toll-유사 수용체-비의존성 유전자 유도 프로그램을 촉발하여, 선천성 면역계를 활성화하는 I형 인터페론 및 기타 사이토카인/케모카인의 생성을 초래한다. 내인성 DNA-면역글로불린 복합체의 대식세포 또는 수지상 세포 내로의 도입은 면역 세포를 활성화하고, 알려진 TLR 또는 TLR 시그널링 분자(TLR9, TLR3, TLR1-2, TLR5-8; MyD88, TRIP 어댑터)와 무관하게 자가면역을 촉발한다. DNA아제 결핍 또는 아포프토시스 세포의 클리어런스에서의 결함을 갖는 마우스 또는 인간은 자가면역을 발달시킨다. 핵산-거대분자 함유의 아포프토시스 파편과 관련된 자가항원에 대한 교차-반응성은 전신성 자가면역을 유도할 수 있다.

[0179] INAS로의 종양 표적화 항체의 접합은 종양 세포의 아포프토시스를 유도하고, (Fc-FcR 상호작용을 통해) 대식세포/수지상 세포에 의한 결합 아포프토시스체의 수용/내제화를 증진시키며, (손상/사멸 중/아포프토시스 종양 세포로부터의 뉴클레아제 내성 INAS 및/또는 비분해 핵산을 통해) 면역 세포의 활성화를 촉진함으로써 종양 세포에 대한 자가면역 반응을 유도할 수 있다.

[0180] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 아포프토시스 DNA에 의해 면역 세포의 TLR-의존성 또는 TLR-비의존성 활성화를 모방할 수 있는 임의의 안정성/안정화된 핵산 서열(ss DNA, ds DNA, ss RNA)일 수 있는 INAS를 포함한다. 예를 들어, 그러한 생물학적 활성 제제는 아포프토시스체 내 핵산-함유 거대분자(뉴클레오좀)로부터 유래된 면역자극 핵산 서열; 세포 곤란 및 DNA 손상에 의해 생성되는 면역자극 핵산 서열; 항체와의 접합체 또는 면역복합체(예를 들어, DNA-면역글로불린)로서 대식세포 또는 수지상 세포 내로 도입될 때 면역 세포를 활성화할 수 있는 핵산 서열; 면역계를 활성화하는 세포성 반응을 촉발하는 자연 위험 신호로서 인식되는 안정성/안정화된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0181] 일부 실시양태들에서, 아포프토시스체 관련 소형 핵 리보핵단백질 입자(snRNP) 내의 ss RNA 서열이 생물학적 활성 제제로서 이용된다.

[0182] 그러한 활성제를 위한 예시적 서열에는 U snRNA 서열(또는 유도체): 5'- GGACUGCGUUCGCGCUUUCC-3'(서열 번호 [[]]); 5'-GGCUUAUCCAUUGCACUCCGGA-3'(서열 번호); 5'-ACGAAGGUGGUUUUCCCAG-3'(서열 번호); 5'-UUUGUGGUAGUGGGGGACUG-3'(서열 번호); 5'-GUAGUGUUUGUGGGGGACUG-3'(서열 번호); 5'-GUAGUGGGGGACUGUUUGUG-3'(서열 번호); 5'-GGACUGCGUUGUGGCUUUCC-3'(서열 번호); 5' GAUACUUACCUG-3'(서열 번호); 5'-AAUUUGUGG-3'(서열 번호); 5'-AAUUUUUGA-3'(서열 번호); 하기 식에 부합하는 핵산 서열: 5'-RAUxG R-3' R=퓨린 G/A; x=3-6)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 그러한 활성제를 위한 추가의 예시적 서열에는 hY1-5 RNA 서열(또는 유도체)를 포함한, Ro 리보핵단백질(Ro RNP) 내 RNA 서열: 5'-GACUAGCUUGCUGUUU-3'(서열 번호); 5'-GACUAGCCUUU-3'(서열 번호)이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0183] 또 다른 실시양태에서, 핵산 서열은 면역 세포의 활성화, 증식 및/또는 생존을 유도 또는 촉진하는 세포성 반응을 촉발하는 위험 신호 또는 손상-관련 분자 패턴(DAMP)으로서 인식되는 구조 또는 서열을 포함할 수 있다.

[0184] 표적 세포 상의 분자에 결합하는 표적화 부분(항체, 리간드, 펩티드, 기타)에의 INAS의 접합은 표적 세포(수용체-매개 세포흡수작용, 전기천공, 기타 기전을 통해) 표적 세포 내로 INAS가 도입될 수 있도록 한다. INAS는 면역계를 2차적으로 활성화하는 표적 세포성 반응을 촉발하는 위험 신호 또는 DAMP로서 인식되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 세포내 뉴클레오티드(INAS)를 위험 신호 또는 DAMP로서 인식함은, 표적 세포 내 사이토카인/케모카인/공동자극 분자(예를 들어, 인터페론, NKG2D 리간드)의 상향조절 및/또는 방출, 스트레스/손상/사멸 중 표적 세포(예를 들어, 알라민)에 의한 면역자극 세포내 단백질/내인성 분자의 상향조절 및/또는 방출 및/또는 대식세포/수지상 세포에 의한 (비분해성 INAS를 갖는) 사멸 중 또는 사멸된(아포프토시스) 표적 세포로부터의 면역자극 물질의 2차 분해를 통해 면역 세포 활성화를 유도한다.

[0185] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 하기 세포 반응들 중 하나 이상의 활성화를 초래하는 표적화 부분 및 단일-가닥(ss) DNA 및 이중 가닥(ds) DNA 또는 RNA(INAS)를 포함한다: (세포 사이클 체크포인트의 활성화를 통한) 표적 세포 증식의 억제 및/또는 (고유 사멸 시그널링의 활성화를 통한) 표적 세포 아포프토시스의 유도를 포함한, 진핵 세포 내 DNA 손상 또는 스트레스 반응[예컨대, 혈관확장성 운동실조증 돌연변이체(ATM) 키나제, Chk2, p53 및 DNA-포스파티딜이노시톨 3 키나제(PK)의 활성화를 통함]; 전사 인자 및 키나제(예컨대, 레티노산 유도성 유전자 1, IKK, TBK1, IRF, NF-[]B, p53, Chk2)의 활성화를 통한 I형 인터페론, 기타 사이토카인/케모카인/공동자극 분자(예를 들어, NKG2D 리간드)의 TLR-의존성 또는 TLR-비의존성 생산 및/또는 방출; 스트레스/손상/사멸 중 표적 세포에 의한 면역자극 세포내 단백질/내인성 분자(예를 들어, PAMP, DAMP, 알라민)의 상향조절 및/또는 방출.

[0186] 또한, 본 발명의 접합체의 투여는 표적 세포(종양 세포 또는 종양 미세환경 내 세포)에서 스트레스 반응을 유도하여, [예컨대, 면역 세포에 대한 리간드, 사이토카인, 케모카인 및 또는 공동자극 신호 및/또는 내인성 위험 신호의 증가된 발현 및/또는 방출을 통해] 면역 세포의 성숙, 활성화, 증식 및/또는 생존을 초래할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태들에서, 투여는 알라민-데펜신, 카텔리시딘, 고이동성 군 Box 단백질 1(HMGB1), S100 단백질, 간종양 유래 성장 인자(HDGF), 호산구 유래 신경독소(HDN), 열 충격 단백질, IL-1α, 요산, 갈렉틴, 티모신, 뉴클레올린, 아넥신, 임의의 소수성 단백질 부분(Hyppo) 또는 기타 방어 이펙터의 방출을 초래한다.

[0187] 면역계는 감염과 같은 위험 상황과 관련된 것으로 인지되는 항원에 대해 반응한다. 위험 신호는 수지상 세포를 자극함으로써 작용할 수 있고, 이에 따라 그것은 외래 항원을 제시하고 T 림프구를 자극할 수 있다. 예를 들어, 다세포 동물은 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)을 인식하는 수용체 세트를 통해 병원체를 검출한다. 사멸 중 포유동물 세포는 또한 손상된 세포와 관련된 항원에 대한 면역 반응을 촉진하는 위험 신호(위험 관련 분자 패턴)를 방출하는 것으로 나타났다. 조직/세포 손상은 사멸 중/사멸한 세포에 의해 방출된 세포내 단백질/내인성 분자("알라민(들)"로 칭해짐)의 수용체-매개 검출을 통해 인식된다. 알라민은 병원체 챌린징 및/또는 세포사 후에 급속 방출되는 구조적으로 다양한 다중작용적 숙주 단백질의 군을 나타내며, 이는 항원-제시 세포를 동원함과 동시에 활성화할 수 있다. 데펜신, 카텔리시딘, 호산구-유래 신경독소 및 고이동성 군 box 단백질 1을 포함한 이 강한 면역 자극물질은 선천성 및 적응성 면역계를 활성화하는 조기 경고 신호로서 작용한다. 알라민은 면역 반응을 시그널링/활성화하는 세포내 성분을 포함한다.

[0188] 알라민은 TLR, IL-IR, RAGE 또는 기타 수용체를 함입시킨다. 선천성 및 적응성 면역력의 이펙터 세포는 비정통적 경로를 통해 알라민을 분비하고, 그것이 PAMP 또는 기타 알라민에 의해 활성화될 때 종종 그러한 분비를 행한다. 그러므로, 내인성 알라민 및 외인성 PAMP는 유사한 메시지를 전달하여 유사한 반응을 도출하며; 그것은 손상-관련 분자 패턴(DAMP)인 보다 큰 세트의 부분집합인 것으로 간주될 수 있다. PAMP 및 알라민은 면역 세포의 활성화를 상승효과적으로 강화할 수 있다. 이하 추가 개시되는 부가적 알라민이 알려져 있다(퀩티드 이하 상기와 동일함).

[0189] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 면역 세포 활성화를 야기하는 표적 세포성 반응을 촉발하는 위험 신호 또는 DAMP로서 인식되는 하나 이상의 안정성/안정화된 핵산 서열(들)에 커플링된 표적화 부분을 포함한다. 예시적 서열은 ss DNA(CpG 서열 요건이 없음; TLR-비의존성): 5'-AAG AGG TGG TGG AGG AGG TGG TGG AGG AGG TGG AGG-3'(서열 번호); 5'-TTG AAT TCC TAG TTT CCC AGA TAC AGT-3'; 5'-TCG GTA ACG GG-3'(서열 번호); 5'-TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3'(서열 번호); 5'-CGTTA-3'(서열 번호); 5'-GCCACTGC-3'(서열 번호); 5'-GCAGTGGC-3'(서열 번호)을 포함한다.

[0190] 추가 실시양태들에서, 상기 활성제는 인간 텔로머 DNA 서열-(TTAGGG)n 반복체; 폴리-G 모티프; 이중 가닥 B-형 DNA(TLR-비의존성; CpG 서열 요건이 없음); 선형화 플라스미드 DNA; 큰 갭을 갖는 원형 DNA; 단일 가닥 원형 파지미드, ds RNA 또는 ss RNA를 포함한다.

[0191] 세포 손상/스트레스과 관련된 내인성 위험 신호의 상향조절 및/또는 방출은 항-종양 T 세포의 DC 동원, 항원 수용, 성숙 및 항원 제시 및 공동자극/프라이밍을 촉진한다. 그러므로, 본 발명의 각종 실시양태들에서, 하나 이상의 표적화 부분은 INAS 및 DAMP 및/또는 알라민과 같은 부가적 활성제를 포함한 하나 이상의 생물학적 활성제제에 커플링된다.

[0192] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 스트레스, 손상 또는 사멸 중/아포프토시스 표적 세포로부터의 면역자극 분자에 의해 촉발되는 표적 세포사 및 이차 면역 활성화를 촉진하는 코딩 또는 비코딩 핵산 서열(들)과 같은 활성제에 커플링된 표적화 부분을 포함한다.

[0193] 예를 들어, 그러한 활성제는 면역원성 아포프토시스 물질에 의해 촉발되는 아포프토시스 및 이차 면역 활성화를 초래하는 사멸 시그널링 반응을 활성화하는 안정성/안정화된 코딩 또는 비코딩 핵산 서열; 면역원성 아포프토시스 물질에 의해 촉발되는 생존 유전자 발현 및 이차 면역 활성화의 억제를 통해 표적 세포사(아포프토시스)를 촉진하는 안정성/안정화된 코딩 또는 비코딩 핵산 서열을 포함한다.

[0194] 본 발명의 또 다른 측면에서, 핵산은 이차 구조를 형성할 수 있다. 이 이차 구조는 일반적으로 나선(연속 염기쌍) 및 각종 종류의 루프(나선에 의해 둘러싸인 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드)으로 구분된다. 염기-쌍형성 나선이 쌍을 형성하지 않은 짧은 루프에서 말단에 있는 줄기-루프 구조가 극히 통상적이고, 4개의 나선 접속부인 클로버잎 구조와 같은 보다 큰 구조 모티프의 구성단위이다. 내부 루프(쌍을 형성한 보다 긴 나선에서 쌍을 형성하지 않은 염기로 된 짧은 시리즈) 및 벌지(bulge)(나선의 한 가닥이 반대 가닥에서 상응부를 갖지 않는 "별도(extra)" 삽입 염기를 가지는 영역)도 또한 빈번하다.

[0195] 예를 들어, 줄기-루프 분자내 염기 쌍형성은 핵산 분자에서 일어날 수 있는 패턴이다. 그 구조는 또한 동일한 분자의 두 영역이 통상 뉴클레오티드 서열 내 회문인 염기 쌍을 이루어, 쌍을 형성하지 않은 루프에서 말단에 있는 이중 나선을 형성할 때 일어나는 헤어핀 또는 헤어핀 루프로도 알려져 있다.

[0196] 줄기-루프 구조의 형성은 생성되는 나선 및 루프 영역의 안정성에 의존한다. 이에 따라, 첫 번째 전제조건은 쌍을 형성한 이중 나선을 형성하도록 접힐 수 있는 서열이 존재해야 하는 것이다. 이 나선의 안정성은 그것의 길이, 미스매치의 수 또는 그것이 포함하는 벌지(그 수가 적을수록, 특히 긴 나선에서 내인성을 가짐), 및 쌍을 형성한 영역의 염기 조성에 의해 결정된다. 구아닌 및 시토신 간의 쌍형성은 3개의 수소 결합을 가지고, 2개의 수소 결합만을 가지는 아데닌-티민 쌍보다 더 안정적이다. 바람직한 배향으로의 염기의 방향족 환의 파이 오비탈을 배열하는 염기 적층 상호작용은 나선 형성을 촉진할 수 있다.

[0197] 루프의 안정성은 또한 줄기-루프 구조의 형성에도 영향을 준다. 3개 염기 미만의 길이를 갖는 "루프"는 입체적으로 불가능하고, 형성되지도 않는다. 예시적 루프 길이는 약 4 내지 8개 염기 길이일 수 있다.

[0198] 예를 들어, 회문 DNA 서열

[0199] --CCTGCXXXXXXXGCAGG--는 하기 헤어핀 구조를 형성할 수 있다:

---C G---

C G

T A

G C

C G

X X

X X

X X

[0200] X

[0201] 천연 발생의 이차 구조, 예컨대 반복 유전자외 회문(REP) 서열은 면역계를 자극하는 것으로 관찰되었다. 문헌[Magnusson et al. Journal of Immnuology, 2007, 179: 31-35]. 용어 "REP 서열"은 21 및 65개 염기 길이를 갖는 반복 및 회문 서열을 포괄한다. REP 서열이 총 유전자외 공간의 >0.5%를 구성하는 일부 세균 게놈의 유전자외 공간에서 검출되었다. 이 서열은 많은 그램-음성 세균에 존재하여, DNA 생리학 및 게놈 가소성에 중요한 역할을 한다. 모티프, 예컨대 RJEP를 포함하는 강한 면역자극 ODN이 적절한 길이를 가지고 회문이기 때문에, 본 발명에 사용될 수 있다. REP 회문성은 그것이 채택하는 가능한 줄기-루프 이차 구조를 구상할 수 있도록 한다. DNA 이차 또는 삼차 구조는 REP에 보다 큰 안정성 및 DNA아제 내성을 부여할 수 있다. 또한, REP는 세균의 면역 인식의 표적이도록 하는 2가지 부가적 이로운 특성, 즉 풍부 및 보존을 가진다. 그램-음성 인간 병원체, 예컨대 E. 콜라이(E. coli), S. 엔테리카 타이피(S. enterica typhi), N. 메닝기티디스(N. meningitidis) 및 P. 아에루기노사(P. aeruginosa)로부터의 REP를 포함하는 ODN은 TLR9 수용체에 의해 매개되는 선천성 면역계 자극을 생

산한다. 문헌 [Magnusson et al. Journal of Immnology, 2007, 179: 31-35]. TLR9에 의한 검출은 REP가 가능히 채택할 가능성이 있는 안정된 줄기-루프 이차 구조에 의해 용이하게 되는 것으로 사료된다. 심지어 불활성화 조건 하에서도 안정한 DNA 3차 구조는 또한 IFN-n 방출을 자극할 수도 있다.

[0202] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 표적화 부분-생물학적 활성 제제 접합체는 자체의 2차 구조로 인해 면역자극 분자로서 작용하는 핵산 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 천연 포스포디에스테르 골격을 가지는 dsODN를 사용하여, REP에서 보여지는 것들과 같은 이차 구조를 모방할 수 있다. 이에 따라, E. 콜라이, S. 엔테리카 타이피, N. 메닝기티디스 및 P. 아에루기노사와 같은 세균으로부터의 대표적 REP의 서열을 갖는 이중-가닥 포스포디에스테르 올리고뉴클레오티드를 사용하여, IFN-α와 같은 염증전 사이토카인의 생성을 활성화할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 합성 골격을 갖는 dsODNS가 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이차 및 삼차 면역자극 구조를 형성하는 ssODN이 사용될 수 있다. 각종 상기 실시양태들에서, 표적화 부분은 종양 세포 상에 존재하는 성분에 대해 특이적인 항체이다. 기타 각종 상기 실시양태들에서, 표적화 부분은 병원체(예를 들어, 세균 또는 바이러스) 상에 존재하는 성분에 대해 특이적인 항체이다.

[0203] 전반적 개시내용에 기초하여 자명한 바와 같이, 하나 이상의 표적화 부분은 하나 이상의 핵산 분자(들)/서열(들)을 포함하는 하나 이상의 생물학적 활성 제제(들)에 커플링된다. 각종 실시양태들에서, 활성제는 면역 세포(예컨대, 수지상 세포, T 림프구, 자연 살해 세포, B 림프구, 단핵구, 대식세포)(면역 자극 핵산 서열(들)=INAS로 칭해짐)의 활성화, 증식 및/또는 생존을 유도하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. INAS는 하기의 것들 중 임의의 것을 포함할 수 있다: TLR-의존성 또는 TLR-비의존성 면역 세포의 활성화/증식/생존을 직접적으로 유도하는 병원체-관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 서열/구조; 및/또는 리소좀 분해를 탈피하는 비분해 뉴클레오티드에 대한 세포성 반응을 통해 면역 세포의 활성화/증식/생존을 유도하는 안정한 또는 안정화된 핵산 서열/구조; 면역계를 활성화하는 세포성 반응을 촉발하는 천연 위험 신호 또는 손상-관련 분자 패턴(DAMP)으로서 인식되는 핵산 서열/구조; 및/또는 스트레스, 손상 또는 사멸 중/아포프토시스 표적 세포로부터의 면역자극 분자에 의해 촉발되는 표적 세포사 및 이차 면역 활성화를 촉진하는 코딩 또는 비코딩 핵산 서열; 및/또는 자체의 이차 구조로 인해 면역자극 분자로서 작용하는 핵산 분자.

[0204] 또 다른 실시양태에서, INAS는 항체(또는 단편), 리간드, 펩티드, 압타머 또는 기타 종양 표적화 부분에 접합될 수 있다. 접합체의 종양 표적 또는 면역 세포로의 도입은 수용체-매개 세포흡수작용 또는 전기천공을 포함한 임의의 방법에 의해 용이하게 될 수 있다.

[0205] 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 동일하거나 상이한 생물학적 활성 제제 중 하나 이상의 부분뿐만 아니라 동일하거나 상이한 표적 세포 성분에 대한 다중 표적화 부분의 영역에서의 다가 분자이다. 이에 따라, 예를 들어 본 발명의 각종 실시양태들에서, 상이한 조합의 생물학적 활성 제제를 이용함에 의해 상승효과적 치료 효과가 초래된다.

[0206] 각종 실시양태들에서, 항체 또는 표적화 부분에 접합된 INAS는 특이적 유전자 발현을 유도하는 네이키드(naked) 플라스미드 DNA 또는 코딩 면역자극 핵산 서열(DNA, RNA)일 수 있다. 한 실시양태에서, 코딩 핵산은 미니서클이다.

[0207] 그러므로, 한 실시양태에서, 적어도 표적화 부분 및 관심 유전자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 조성물을 투여함으로써, 표적 세포 유형(즉, 이에 표적화 부분이 특정 세포 유형(예를 들어, 종양 세포 또는 기타 세포)에 대해 특이적이게 됨)의 표적화, 관심 유전자의 발현, 표적 세포에 대한 면역 반응(항체-매개 플라스미드 세포흡수작용 및 세포내 순환 비복제 에피솜을 통한 유전자의 표적 발현: 항체-지정 비-바이러스 유전자 면역치료)의 동시 활성화가 가능하다.

[0208] 각종 실시양태들에서, 표적 세포 성분(예를 들어, HER2, EGFR, 기타)에 대한 항체 또는 표적화 부분은 하기의 것들로부터 선택되는 플라스미드 벡터에 접합된다: 네이키드 플라스미드 DNA; 자가-복제 RNA 벡터를 발현하는 플라스미드 레플리콘(레플리카제-기재 핵산-DNA 또는 RNA, 예컨대 알파바이러스 레플리콘 또는 신드비스(Sindbis) 바이러스 레플리콘); 바이러스 RNA 중합효소를 코딩하는 플라스미드; 또는 관심 유전자, 표적/종양 항원(DNA 백신), 면역자극 분자(사이토카인, 공동자극 분자 또는 기타 면역자극 분자, 예를 들어 내인성 위험 신호, 예컨대 알라민, TLR 작용자), 막 결합 Fc 단편 또는 Fc 수용체(FcR)(예를 들어, CD32a) 또는 표적 세포사를 촉진하는 분자(예를 들어, 사멸 수용체-TRAIL-수용체, Fas; 사멸 리간드-TRAIL, FasL)를 코딩하는 플라스미드. 각종 실시양태들에서, 상기 종양-표적 항체 또는 표적화 부분은 본원에 개시된 임의의 표적 세포 성분(예를 들어, HER2, EGFR 등)을 표적으로 하도록 설계될 수 있다.

[0209] 일부 실시양태들에서, 항체 또는 표적화 부분에 접합된 INAS는 특이적 유전자 발현을 억제하는 면역자극 핵산일 수 있다(siRNA 또는 안티센스 또는 shRNA). 이는 표적 세포에 대한 면역 반응을 동시에 활성화하면서 종양 세포의 두 성분의 이중특이적 표적화를 허용할 수 있다. 한 실시양태에서, 표적 세포 성분(예를 들어, HER2)에 대한 항체는 생존 유전자 침묵화 siRNA 또는 그것의 침묵화 리보자임에 접합된다. 추가 실시양태들에서, 상기 종양-표적 항체는 접합된 면역억제 분자(예를 들어, 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO))의 발현을 침묵화하는 siRNA 또는 리보자임에 접합된다.

[0210] 한 측면에서, 항체에 접합된 INAS는 종양 세포/종양 혈관계/종양 미세환경 또는 면역 세포(예를 들어, 대식세포 또는 수지상 세포 또는 기타)의 성분에도 결합할 수 있는 면역자극 압타머(RNA 또는 DNA)일 수 있다. 이는 표적 세포에 대한 면역 반응을 동시에 활성화하면서 종양 세포의 두 성분의 이중특이적 표적화를 허용할 수 있다.

[0211] 그러므로 각종 실시양태들에서, 종양-표적 항체는 또 다른 종양 항원 또는 수용체(예를 들어, 에스트로겐 수용체; EGFR, 본원에 개시된 임의의 성분)를 표적으로 하는 INAS 압타머에 접합되고; 종양-표적 항체는 수지상 세포(DC) 수용체를 표적으로 하는 INAS 압타머에 접합되며; 종양-표적 항체는 사멸 수용체(예를 들어, TRAIL-수용체 또는 CD95/Fas)를 표적으로 하는 INAS 압타머에 접합되며; 또는 사멸 수용체에 대한 종양-표적 항체는 종양 항원 또는 수용체(예를 들어, HER-2)를 표적으로 하는 INAS 압타머에 접합되고; 또 다른 실시양태에서, INAS은 에스트로겐 수용체(ER) 결합 분자(예컨대, 타목시펜)에 접합된다.

[0212] 본원에 개시된 상기 실시양태 및 하기 실시양태 중 임의의 실시양태에서, 종양-표적 항체는 종양 항원 또는 종양 관련 항원(즉, 본원에 개시된 세포 성분, 예컨대 HER2, EGFR 등)을 표적으로 하도록 설계될 수 있다.

[0213] 또 다른 실시양태에서, INAS는 병원체로부터의 하나 이상의 종양 항원(들)/에피토프(들) 또는 항원(들)에 결합하는 항체에 접합된다. 항원(들) 및 항체-INAS를 포함하는 면역 복합체를 사용하여, 특이적 종양 항원 또는 병원체-유래 항원에 대한 면역 반응을 발생시킬 수 있다.

[0214] 또 다른 실시양태에서, INAS는 면역 세포(DC 또는 기타)의 성분에 대해 지정된 항체에 접합된다. 이 INAS-항체 접합체는 병원체로부터의 하나 이상의 종양 항원(들)/에피토프 또는 항원(들)에 이차적으로 접합될 수 있다. 항원-항체-INAS 면역 복합체를 사용하여, 특이적 종양 항원 또는 병원체-유래 항원에 대한 면역 반응을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 활성제는 DC 항원 수용 수용체에 대한 항체에 접합된 INAS 및 항원을 포함할 수 있다.

[0215] 또 다른 실시양태에서, INAS 및 항원은 면역 세포 항원 또는 수용체(예를 들어, CD40, CD28 등)을 표적으로 하는 항체에 접합된다.

[0216] 한 추가 실시양태에서, INAS는 면역 세포 항원 또는 수용체(예를 들어, CD40, T 세포 항원, 예컨대 CD3, CD4 등)에 대한 항체에 접합된다. 그러한 INAS의 예에는 GATA-3, IDO 등과 같은 특이적 분자의 발현을 침묵화하기 위한 siRNA이 포함된다.

[0217] 일부 실시양태들에서, INAS는 Fc 단백질 또는 항원-Fc 융합 단백질에 접합되는데, 여기에서 항원은 종양 항원 또는 병원체-유래 에피토프이다. INAS-Fc 접합체 또는 INAS-항원-Fc 접합체를 사용하여, 특이적 종양 항원 또는 병원체-유래 항원에 대한 면역 반응을 발생시킬 수 있다.

[0218] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 면역자극 핵산(INAS-DNA 또는 RNA)(항-INAS 항체)뿐만 아니라 특이적 종양 항원(항-종양 항체)에 결합한다. 면역 복합체(INAS 및 아포프토시스 세포에 결합됨)를 포함하는 상기 핵산은 대식세포 및 수지상 세포에 의해 둘러싸여진 후에 엔도좀 TLR-매개 또는 TLR-비의존성 면역 반응을 활성화할 수 있다. 이는 항체-결합 아포프토시스 종양 세포로부터 유래된 항원에 대해 지정된 자가면역 반응(환자-특이적 종양 DNA 백신)을 유도할 수 있다.

[0219] 또 다른 실시양태에서, 면역자극 핵산 서열(INAS)은 항체에 의한 함입 시에 사멸 시그널링을 활성화하는 사멸 수용체뿐만 아니라 특이적 종양 항원에 결합하는 이중특이적 항체에 접합된다. 이중특이적 항체는 표적 종양 세포의 아포프토시스를 유도하고, (INAS에 결합된 면역 복합체를 포함하는) 아포프토시스 세포는 대식세포 및 수지상 세포에 의해 둘러싸여진 후에 엔도좀 TLR-매개 또는 TLR-비의존성 면역 반응을 활성화할 수 있다. 이는 항체-결합 아포프토시스 종양 세포로부터 유래된 항원에 대해 지정된 자가면역 반응(환자-특이적 종양 DNA 백신)을 유도할 수 있다.

[0220] 또 다른 실시양태에서, 면역자극 핵산 서열(INAS)은 면역 세포, 예컨대 수지상 세포뿐만 아니라 특이적 종양 항원에 결합하는 이중특이적 항체에 접합된다. 이중특이적 항체는 표적 종양 세포의 아포프토시스를 유도하고, (INAS에 결합된 면역 복합체를 포함하는) 아포프토시스 세포는 대식세포 및 수지상 세포에 의해 둘러싸여진 후

에 엔도좀 TLR-매개 또는 TLR-비의존성 면역 반응을 활성화할 수 있다. 이는 항체-결합 아포프토시스 종양 세포로부터 유래된 항원에 대해 지정된 자가면역 반응(환자-특이적 종양 DNA 백신)을 유도할 수 있다.

[0221] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체(예를 들어, 항체-INAS 또는 표적화 부분-INAS 접합체)는 이중 병원체-관련 분자 패턴, 예를 들어 dsRNA 및 DNA의 조합 검출을 가능하도록 하여, 한정적 바이러스 인식을 모방하여, 종양 백신접종 또는 면역치료에 사용될 수 있는 증진된 선천성 면역 반응을 초래하도록 설계된다. 한 실시양태에서, 접합체는 바이러스 RNA 중합효소 또는 RNA 레플리콘을 코딩하는 플라스미드 CpG DNA를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 접합체는 DNA-RNA 하이브리드 INAS(DNA+RNA)와 접합된 항체를 포함한다.

[0222] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체(예를 들어, 표적화 부분-INAS 또는 항체-INAS 접합체)는 또한 또 다른 INAS(DNA 또는 RNA) 또는 INAS-비의존성 면역자극 분자, 예컨대 또 다른 PAMP, 손상-관련 분자 패턴(DAMP), Toll-유사 수용체 리간드, TLR-비의존성 면역자극 리간드 또는 면역자극 위험 신호, 예를 들어 하기의 것들이 포함하나 이들에 국한되지 않는 것에 이차적으로 접합/연결될 수 있다: TLR 리간드: (천연 발생의, 합성 유사체 또는 완전 합성 소분자); TLR1(예컨대, 트리아실 리포펩티드); TLR2(예컨대, 지질단백질/리포펩티드, 펩티도글리칸, 지질타이코산, 지질아라비노만난, 통상적 지질다당류, 디- 및 트리아실 리포펩티드, HSP70); TLR3(INAS, 예컨대 ds RNA, 폴리이노신산-폴리시티딜산, 기타 작용자); TLR4[예컨대, 지질다당류, 탁솔, HSP60(클라마이디아 뉴모니아에), LPS/지질 A 모방체, 예컨대 모노포스포릴 지질 A, 합성 지질 A, E5564, Ribi529, 히알루론산의 이당류, 히알루로난(HA)); TLR5(예컨대, 세균 플라겔린, 불연속성 13-아미노산 펩티드; TLR6(예컨대, 디아실 리포펩티드); TLR7(INAS, 예컨대 ss RNA, 올리고뉴클레오티드, 록소리빈, 레시퀴모드, 이미퀴모드, 기타 작용자); TLR8(INAS, 예컨대 ssRNA, 기타 작용자); TLR9(INAS, 예컨대 세균 또는 바이러스 DNA, CpG 올리고데옥시뉴클레오티드, 비-CpG DNA, 기타 작용자); 알라민, 예컨대 데펜신, 카텔리시딘, 고이동성군 Box 단백질 1(HMGB1), S100 단백질, 간종양 유래 성장 인자(HDGF), 호산구 유래 신경독소(EDN), 열 충격 단백질(hsp70, hsp90, gp96 eHsp, 예컨대 Hsp72, 기타), IL-I, 요산, 갈렉틴, 티모신, 뉴클레올린, 아넥신 또는 임의의 소수성 단백질 부분(Hyppo)을 포함하나 이들에 국한되지 않는 면역자극 위험 신호.

[0223] 각종 실시양태들에서, INAS는 하기 범주들 중 임의의 것에서 유래된 DNA 또는 RNA 또는 DNA/RNA 하이브리드 서열일 수 있다: 면역자극 병원체/유기체(약독화 또는 생 또는 사멸된 것 포함)를 포함한 병원체-유래 핵산; 병원체/유기체로부터 유래된 게놈 DNA 또는 RNA 서열; 병원체의 게놈 또는 유기체의 게놈에 상응하는 합성 DNA 또는 RNA "모방체"(예를 들어, 유도체 및 유사체).

[0224] (1) **2. 관심 유전자를 코딩하는 핵산**

[0225] 본 발명의 또 다른 측면에서, 하나 이상의 관심 폴리펩티드를 코딩하는 선형 또는 원형 핵산 분자에 커플링된 표적화 부분을 포함하는 조성물은 및 방법이 제공된다. 그러므로, 일부 실시양태들에서, 핵산 분자는 관심 유전자를 발현(즉, 전사 및/또는 번역)한다. 그러한 코딩 핵산 분자의 예에는 바이러스 벡터, 플라스미드, 미니서클, 선형 및 원형 dsDNA가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 관심 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자인 활성제에 커플링된, 본원에 기재된 바와 같은 표적화 부분을 포함한다. 이러한 방식으로 코딩되고 발현된 폴리펩티드는 대상의 면역 반응을 증진 또는 자극하는, 본원에 개시되고 당업계에 알려진 종양 및 감염 제제 항원을 포함한다. 이에 따라, 표적화 부분은 특정 세포 또는 조직을 표적으로 하고, 면역자극성인 목적 산물을 코딩하는 핵산 분자를 효과적으로 전달한다.

[0226] 그러한 기전은 면역 반응을 증진 또는 증가시키기 위한 방법을 제공하는 것뿐만 아니라, 특정 질병 또는 감염 제제에 대한 백신접종을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 발현 벡터는 널리 사용되고 알려져 있고, 본 발명의 조성물 및 방법과 함께 사용하도록 적합화될 수 있다. 그 예가 미국 특허 제7,049,098호, 제6,143,530호, 제7,384,744호, 제7,279,568호, 제7,262,014호, 제6,977,296호 및 제6,692,750호; 및 미국 특허출원 공보 제2008/0145376호; 제2006/0281703호; 제2006/0211117호; 제2004/0214329호 및 제2004/0209836호에 제공되어 있다.

[0227] 플라스미드. 각종 실시양태들에서, 백신접종은 수가지 유형의 DNA 작제물에 의해 매개될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 관심 유전자를 전달하기 위해 전체 원형 플라스미드 DNA를 포함한다. 이 원형 이중 가닥 DNA 작제물은 세균으로부터 유래되고, 포유동물의 특이적 프로모터 및 종결자와 함께 관심 유전자뿐만 아니라, 세균 세포에서의 복제 및 유지에 필요한 요소(복제 기원 및 항생제 내성 카세트 포함)을 함유한다. 그러한 발현 벡터의 예가 알려져 있고, 본 발명의 범주 내에 적용될 수 있다.

[0228] 미니서클. 본원에 논의되는 바와 같이, 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 목적 관심 유전자의 코딩 및 발현

을 위해 사용될 수 있는 DNA 미니서클을 포함한다. 미니서클은 DNA 백신의 전반적 안전성뿐만 아니라 관심 유전자의 발현도 향상시키기 위한 노력으로 출현하였다. 미니서클은 플라스미드 DNA의 재조합으로부터 두 부분, 즉 미니서클 및 미니플라스미드로 형성된다. 재조합 후, 미니서클은 DNA 백신, 즉 포유동물의 특이적 프로모터, 관심 유전자 및 종결자의 필수 요소만을 포함한다. 미니서클은 또한 기타 서열, 예컨대 재조합 부위를 함유할 수 있으나, 가능한 한 적은 DNA를 함유하도록 구성될 수 있다. 미니플라스미드는 DNA 백신에서 통상 불필요하거나 요구되지 않는, 다른 플라스미드 복제, 유지 및 세균 유래 서열 모두를 포함한다. 미니서클 백신의 한 예는 Chen 등의 것이다(세균 DNA가 없는 미니서클 DNA 벡터는 생체내 지속적이고 고수준의 도입유전자 발현을 초래함, 문헌 [Molecule Therapy 8(3), 2003]); 플라스미드 세균 서열이 없고 생체내 지속적 도입유전자 발현이 가능한 미니서클 DNA 벡터의 향상된 생산 및 정제. 문헌 [Human Gene Therapy(16) p 126-131, 2005). 이 미니서클 시스템은 4개의 핵심 성분을 가진다. 첫 번째 두 개는 ΦC31 리콤비나제 및 그것의 인식 서열(작제물 내 2회 반복)에 대한 DNA 코딩 서열로 구성된다. 세균에서의 생산 중 ΦC31의 발현이 유도되고, 이는 모 플라스미드의 미니서클(DNA 백신 부분 포함) 및 미니플라스미드로의 재조합을 초래한다. 두 번째 두 개의 핵심 성분은 서열 특이적 제한 엔도뉴클레아제 I-SceI의 DNA 코딩 서열 및 그것의, 플라스미드 골격 내에 코딩된 인식 서열로 구성된다. 재조합 후, 미니플라스미드를 절단하고, I-SceI에 의해 선형화하며, 내인성 세균 엔도뉴클레아제에 의해 분해한다. 이어서, 미니서클을 표준 플라스미드 정제 공정에 의해 정제한다.

[0229] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 관심 유전자를 코딩하는 선형 DNA 작제물을 포함한다. 이 작제물에서, 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여, DNA 백신 코딩 작제물(즉, 프로모터, 항원, 종결자)을 증폭시킨다. 증폭된 작제물을 통상 세포성 뉴클레아제에 대해 내성을 가지도록 유전자조작하여, 생체내 사용 시에 분해를 막는다. 예를 들어, Johansson 등(한타바이러스 DNA 백신로서 이용된 PCR-생성 선형 DNA 단편, 문헌 [Vaccine 20 p. 3379-3388, 2002])은 백신접종 시에 엑소뉴클레아제 분해를 막기 위해, 포스포로티오에이트-변형 PCR 프라이머를 사용하여 DNA 백신 작제물을 증폭시켰다.

[0230] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 미니말리스틱(minimalistic), 면역학적으로 정의된 유전자 발현(MIDGE)를 포함한다. MIDGE는 2개의 짧은 헤어핀 올리고뉴클레오티드 서열에 의해 플랭킹된 프로모터, 유전자 및 KNA-안정화 서열을 포함한, 발현 카세트를 포함하는 최소-크기 유전자 전달 단위이다. 생성된 벡터는 작은 선형의 공유 폐쇄된 덤벨 모양의 분자이다. 목적 유전자를 코딩하지 않는 DNA가 최소로 감소된다.

[0231] 한 추가 실시양태에서, 접합체는 2개의 상이한 핵산 분자의 하이브리드화를 허용하는 핵산 변형을 포함한다. 예를 들어, dsDNA(원형 플라스미드/미니서클 또는 선형 DNA)를 변형시켜, 부위 특이적 방식으로 올리고뉴클레오티드를 하이브리드화하고 그것에 결합하는 뉴클레오티드 서열을 도입한다. 그러므로, 표적화 부분이 올리고뉴클레오티드에 커플링되면, 올리고뉴클레오티드는 다시 발현 벡터(예를 들어, dsDNA)에 연결될 수 있다. 한 대안적 실시양태에서, 본 발명의 표적화 부분이 발현 벡터에 커플링되면, 발현 벡터는 다시 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 어느 경우에서도, 올리고뉴클레오티드가 PAMP, DAMP, TLR 작용자 또는 알라민으로서의 그것의 성질에 기초하여 사전 선택될 수 이다.

[0232] *a) 발현 조절 서열*

[0233] 추가 실시양태들에서, 목적 관심 유전자의 발현은 개시 및 전사 속도가 조절되는 핵산 서열의 영역인 조절 서열에 해당하는 "프로모터"를 포함하는 핵산 분자에 의해 행해진다. 그것은 RNA 중합효소 및 기타 전사 인자와 같이 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전 요소를 함유할 수 있다. 어구 "작용적으로 위치한", "작용적으로 연결된", "조절 하에" 및 "전사 조절 하에"는, 프로모터가 서열의 개시 및/또는 발현을 조절하는 핵산 서열(즉, ORF)에 대해 올바른 작용적 위치 및/또는 방향에 있음을 의미한다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성과 관련된 시스-작동 조절 서열을 지칭하는 "인핸서"과 함께 사용되거나 사용되지 않을 수 있다.

[0234] 자체신의 자연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 결합되지 않은 프로모터를 지칭하는, 재조합 또는 이종성 프로모터의 조절 하에 코딩 핵산 세그먼트를 위치시킴으로써 특정 이점을 얻을 것이다. 재조합 또는 이종성 인핸서는 또한 그것의 자연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 결합되지 않은 인핸서를 지칭한다. 그러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 진핵생물, 바이러스 또는 진핵 세포로부터 프로모터 또는 인핸서, 및 "천연 발생의" 것이 아닌, 즉 발현을 변경시키는 상이한 전사 조절 영역 및/또는 돌연변이의 상이한 요소를 포함하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성에 의해 생산하는 것에 부가하여, 서열은 본원에 개시된 조성물과 함께, PCR™을 포함한 핵산 증폭 기술 및/또는 재조합 클로닝을 이용하여 생성될 수 있다(각기 본원에 참조 인용되는 미국 특허 제4,683,202호, 미국 특허 제5,928,906호 참조). 또한, 미토콘드리아, 엽록체 등과 같은 비핵 세포기관 내 서열의 전사 및/또는 발현을

지정하는 조절 서열도 또한 이용될 수 있는 것으로 고려된다. 그러나, 특정 실시양태들에서, 프로모터는 코딩 세그먼트 및/또는 엑손의 업스트림에 위치한 5' 비코딩 서열을 단리함으로써 수득될 수 있다. 그러한 프로모터는 "내인성"으로 지칭될 수 있다. 유사하게, 인핸서는 서열의 다운스트림 또는 업스트림에 위치한, 핵산 서열과 자연적으로 결합된 것일 수 있다.

[0235] 본래, 발현을 위해 선택된 세포 기관, 세포, 조직 및 유기체 내 DNA 세그먼트의 발현을 효과적으로 지정하는 프로모터 및/또는 인핸서를 이용하는 것이 중요할 것이다. 분자 생물학 분야의 당업자라면 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형 조합의 용도를 알 것이며, 예를 들어 본원에 참조 인용되는 문헌 [Sambrook et al. (1989)]를 참조한다. 이용되는 프로모터는 도입된 DNA 세그먼트의 높은 수준의 발현을 지정하도록 하기에 적절한 조건 하에서 구성적, 조직-특이적이고/이거나 유도적이고/이거나 유용할 수 있다. 각종 실시양태들에서, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉각 조기 유전자 프로모터, SV40 조기 프로모터, 루 육종 바이러스 긴 말단 반복체, β-악틴, 래트 인슐린 프로모터 및 글리세르알데히드-3-인산염 탈수소효소를 사용하여, 관심 코딩 서열의 높은 수준의 발현을 수득할 수 있다. 관심 코딩 서열의 발현을 위한, 당업계에 공지된 기타 바이러스 또는 포유동물의 세포성 또는 세균 파지 프로모터의 용도도 또한 고려되는데, 단 발현 수준은 소정의 목적에 충분한 것이어야 한다. 공지된 성질을 갖는 프로모터를 이용함으로써, 형질감염 또는 형질전환 후 관심 단백질의 발현 수준 및 패턴이 최적화될 수 있다.

[0236] 특이적 생물학적 또는 합성 신호에 의해 조절되는 프로모터의 선택은 유전자 산물의 유도성 발현을 허용할 수 있다 Tet-Off™ 또는 Tet-On™ 시스템(클론테크(Clontech), 미국 캘리포니아주 팔로알토 소재)에 유용한, 한 공지된 유도성 시스템은 Gossen 및 Bujard에 의해 처음으로 개발되었다(문헌 [Gossen and Bujard, 1992]; 문헌 [Gossen et al., 1995]). 이 시스템은 또한 높은 수준의 유전자 발현이 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체, 예컨대 독시사이클린에 의해 조절되도록 한다. Tet-On™ 시스템에서, 유전자 발현은 옥시사이클린의 존재 하에 가동되는 반면, Tet-Off™ 시스템에서는 유전자 발현이 독시사이클린의 부재 하에 가동된다. 이 시스템은 E. 콜라이의 테트라사이클린 내성 오페론으로부터 유래된 2개의 조절 요소에 기초한다. 테트라사이클린 리프레서가 결합하는 테트라사이클린 오퍼레이터 서열 및 테트라사이클린 리프레서 단백질. 관심 유전자는 내부에 테트라사이클린-반응성 요소를 가지는 프로모터 뒤에 있는 발현 요소 내로 클로닝된다. 두 번째 플라스미드는 테트라사이클린-조절 트랜스활성화제로 불리는 조절 요소를 포함하는데, 그 요소는 Tet-Off™ 시스템에서, 단순 포진 바이러스로부터의 VP 16 도메인 및 야생형 테트라사이클린 리프레서로 구성된다. 이에 따라, 독시사이클린의 부재 하에, 전사가 구성적으로 진행된다. Tet-On™ 시스템에서, 테트라사이클린 리프레서는 야생형이 아니고, 독시사이클린의 존재 하에서는 전사를 활성화한다. 유전자 요법 벡터 생산을 위해, Tet-Off™ 시스템은 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재 하에 생산자 세포가 성장하여, 잠재적으로 독성인 도입유전자의 발현을 막아, 벡터가 환자에 도입될 때, 유전자 발현이 구성적으로 진행되기 때문에, 바람직하다.

[0237] 일부 환경에서, 유전자 요법 벡터 내에 도입유전자의 발현을 조절하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 다양한 활성 강도를 가지는 상이한 바이러스 프로모터가 목적 발현 수준에 따라 이용된다. 포유동물의 세포에서, CMV 즉각 조기 프로모터가 종종 강한 전사 활성화를 제공하도록 사용된다. 도입유전자의 감소된 발현 수준이 요망될 때, 덜 강한 변형 형태의 CMV 프로모터가 또한 사용되었다. 조혈세포 내 도입유전자의 발현이 요망되는 경우, MLV 또는 MMTV로부터의 LTR과 같은 레트로바이러스 프로모터가 종종 사용된다. 목적 효과에 따라 사용되는 기타 바이러스 프로모터에는 SV40, RSV LTR, HIV-1 및 HIV-2 LTR, E1A, E2A 또는 MLP 영역으로부터의 아데노바이러스 프로모터, AAV LTR, HSV-TK 및 조류 육종 바이러스가 포함된다. 유사하게, 비-표적 조직에 잠재적 독성 또는 바람직하지 않은 영향을 감소시키기 위해 특이적 조직 또는 세포에 전사를 행하기 위해, 조직 특이적 프로모터가 사용된다. 예를 들어, PSA 결합 프로모터 또는 전립선-특이적 샘 칼리크레인과 같은 프로모터가 사용된다.

[0238] 특정 상황에서, 유전자 요법 벡터의 투여 후에 특정 시간에 전사를 활성화하는 것이 바람직하다. 이는 호르몬 또는 사이토카인 조절성인 것과 같은 프로모터를 이용하여 행해진다. 사용될 수 있는 사이토카인 및 염증성 단백질 반응성 프로모터에는 K 및 T 키니노겐(문헌 [Kageyama et al., 1987]), c-fos, TNF-알파, C-반응성 단백질(문헌 [Arcone et al., 1988]), 합토글로빈(문헌 [Oliviero et al., 1987]), 혈청 아밀로이드 A2, C/EBP 알파, IL-1, IL-6(문헌 [Poli and Cortese, 1989]), 보체 C3(문헌 [Wilson et al., 1990]), IL-8, 알파-1 산 당단백질(문헌 [Prowse and Baumann, 1988]), 알파-1 안티트립신, 지질단백질 리파제(문헌 [Zechner et al., 1988]), 안지오텐시노젠(문헌 [Ron et al., 1991]), 피브리노겐, c-jun(포르볼 에스테, TNF-알파, UV 조사선, 레티노산 및 과산화수소에 의해 유도가능함), 콜라게나제(포르볼 에스테르 및 레티노산에 의해 유도됨), 메탈로

티오네인(중금속 및 당질코르티코이드 유도성), 스트로멜리신(포르볼 에스테르, 인터류킨-1 및 EGF에 의해 유도 가능함), 알파-2 마크로글로불린 및 알파-1 항-카이모트립신이 포함된다.

[0239] *i. 인핸서*

[0240] 인핸서는 DNA의 동일한 분자 상의 원위 위치에 위치한 프로모터로부터의 전자를 증가시키는 유전 요소이다. 인핸서는 프로모터와 매우 흡사하게 조직화되어 있다. 즉, 그것은 각기 하나 이상의 전사 단백질에 결합한 많은 개체 요소들로 구성된다. 이들 인핸서 및 프로모터 간의 기본적 구분은 작동적이다. 전체적으로서의 인핸서 영역은 원위에서 전사를 자극할 수 있어야 하고; 이는 프로모터 영역 또는 그것의 성분 요소에서도 그러할 필요는 없다. 한편, 프로모터는 특정 부위 및 특정 방향에서 RNA 합성의 개시를 지정하는 하나 이상의 효소를 가져야 하는 반면, 인핸서는 이 특이성이 결여되어 있다. 프로모터 및 인핸서는 종종 중첩되고 인접하며, 이는 종종 매우 유사한 모듈 조직을 가지는 것으로 보인다.

[0241] 임의의 프로모터/인핸서 조합(진핵생물 프로모터 데이터베이스 EPDB에 준함)을 사용하여 유전자의 발현을 구동할 수 있다. 진핵생물 세포는, 적절한 세균 중합효소가 전달 복합체의 부분으로서 또는 부가적 유전 발현 작제물로서 제공될 경우, 특정 세균 프로모터로부터의 세포질 전사를 지지할 수 있다.

[0242] *c). 폴리아데닐화 신호*

[0243] cDNA 삽입물이 이용되는 경우, 유전자 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 수행하기 위한 폴리아데닐화 신호를 포함하는 것이 통상 요망된다. 폴리아데닐화 신호의 성질은 본 발명의 성공적 수행에 있어 중요한 것으로 사료되지 않고, 인간 또는 소 성장 호르몬 및 SV40 폴리아데닐화 신호와 같은 임의의 서열이 이용된다. 또한, 발현 카세트의 요소로서 종결자가 고려된다. 이 요소는 메시지 수준을 증진시키고, 카세트의 다른 서열로의 해독을 최소화하는 작용을 할 수 있다.

[0244] *d) 개시 시그널 및 내부 리보솜 결합 부위*

[0245] 코딩 서열의 효율적 번역을 위해 특이적 개시 신호가 또한 필요할 수 있다. 이 신호는 ATG 개시 코돈 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함한 외인성 번역 조절 신호가 제공될 필요가 있을 수 있다. 당업자라면 필요한 신호를 용이하게 결정하여 제공할 수 있을 것이다. 개시 코돈은 전체 삽입부의 번역을 확실히 하기 위해, 목적 코딩 서열의 해독 프레임과 인-프레임이어야 함이 공지되어 있다. 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연 또는 합성일 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소를 포함시킴으로써 증진될 수 있다.

[0246] 본 발명의 실시양태들에서, 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 요소의 사용에 의해, 다유전자 또는 폴리시스트론 메시지를 생성시킨다. IRES 요소는 5' 메틸화 캡-의존성 번역의 리보솜-스캐닝 모델을 우회하여, 내부 부위에서 번역을 개시할 수 있다(문헌 [Pelletier and Sonenberg, 1988]). 피코르나바이러스 과의 두 구성원(폴리오 및 뇌척수 심근염)으로부터 IRES 요소(문헌 [Pelletier and Sonenberg, 1988]), 및 포유동물의 메시지로부터의 IRES(문헌 [Macejak and Samow, 1991])가 기재되었다. IRES 요소는 이종성 개방 해독 프레임에 연결될 수 있다. 다중 개방 해독 프레임은 함께 전사되어, 각기 IRES에 의해 분리됨으로써, 폴리시스트론성 메시지를 생성시킬 수 있다. IRES 요소에 의해, 각 개방 해독 프레임은 효율적 번역을 위해 리보솜에 접근가능하다. 다중 유전자는 단일 프로모터/인핸서를 이용하여 효율적으로 번역됨으로써, 단일 메시지를 전사할 수 있다(각기 본원에 참조 인용되는 미국 특허 제5,925,565호 및 제5,935,819호 참조).

[0247] 프로모터는 이종성 또는 내인성일 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열은 구성 프로모터(즉, 원숭이과 바이러스 40(SV40) 조기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스 긴 말단 반복체 프로모터, 몰로니(Moloney) 바이러스 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 즉각 조기 프로모터, 루 육종 바이러스 프로모터, 인간 악틴 프로모터, 인간 미오신 프로모터, 인간 헤모글로빈 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1-알파 프로모터 및 인간 근육 크레아틴 프로모터), 유도성 프로모터(즉, 메탈로티오네인 프로모터, 당질코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터(즉, 수지상 세포(즉, CD11c), PSA 관련 프로모터 또는 전립선-특이적 샘 칼리크레인)로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명의 조성물 및 방법에 도입될 수 있는 각종 프로모터 요소의 추가예가 알려져 있는데, 예컨대 각종 조절 서열 데이터베이스에 개시된 것들이 있다: tiprod.cbi.pku.edu.cn:8080/index.html에서 입수가능한 조직 특이적 프로모터 데이터베이스; http://www.epd.isb-sib.ch/에서 입수가능한 진핵생물 프로모터 데이터베이스; http://doop.abc.hu에서 입수가능한 오르토성을 나타내는 프로모터의 데이터베이스.

[0248] 그러한 프로모터는 목적 유전자 산물의 발현을 제공하도록 하기 위해, 본 발명의 조성물이 전달되도록 하는 표

적 세포 또는 조직에 기초하여 선택될 수 있다. 또한, 표적화에 있어 또 다른 수준의 선택도는 목적 세포 또는 조직 유형에 대해 선택적인 표적화 부분을 이용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 그러한 한 실시양태에서, 조성물은 세포 유형에 대해 특이적인 표적화 부분을 포함하고 목적 항원을 코딩하는 핵산 분자를 추가로 포함하며, 여기에서 발현은 세포-형에 대해 특이적인 프로모터의 조절 하에 있다.

[0249] 다른 한 대안적 실시양태에서, 조성물은 2개의 상이한 표적화 부분을 포함하는데, 여기에서 하나는 세포-형 특이적이고, 다른 하나는 질병 특이적이다(예를 들어, 감염 제제와 관련된 종양 항원 또는 항원을 표적으로 함). 그러므로, 그러한 조성물을 위한 일반식이 T1-T2-A1-A2(여기에서, T1=표적화 부분 1 및 T2=표적화 부분 2임) 또는 그것의 변형태로 도시될 수 있다. 또한, 그러한 조성물은 하나 이상의 비코딩 면역자극 핵산 분자, 하나 이상의 항원성 펩티드, 및 항원성 폴리펩티드 또는 공동자극 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함할 수 있다

[0250] ***B. 펩티드-공동자극성***

[0251] 본원에 나타낸 바와 같이, 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 면역자극성인 핵산 분자를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 조성물은 대상의 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함한다.

[0252] 선천성 면역계는 미생물 내에 존재하는 보존적 분자 패턴의 인식을 위한 배선-코딩 수용체의 한 세트를 이용한다. 이 분자 패턴은 하기의 것들을 포함하는 미생물의 특정 구성성분에서 일어난다: 지질다당류, 펩티도글리칸, 지질타이코산, 포스파티딜 콜린, 지질단백질을 포함한 세균-특이적 단백질, 세균 DNA, 바이러스 단일 및 이중-가닥 RNA, 비메틸화 CpG-DNA, 만난 및 각종 기타 세균 및 진균류 세포벽 성분. 그러한 분자 패턴은 또한 식물 알칼로이드와 같은 기타 분자에서 일어난다. 선천성 면역 인식의 상기 표적은 미생물에 의해 생성되나, 감염된 숙주 유기체에 의해서는 생성되지 않으므로, 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)으로 불린다(문헌 [Janeway et al., 1989]; 문헌 [Medzhitov et al., 1997]).

[0253] PAMP를 인식하는 선천성 면역계의 수용체는 패턴 인식 수용체(PRR)로 불린다(문헌 [Janeway et al., 1989]; 문헌 [Medzhitov et al., 1997]). 이 수용체는 구조가 다양하고, 수가지 상이한 단백질 계열에 속한다. 이들 수용체의 일부는 PAMP를 직접적으로 인식하고(예를 들어, CD14, DEC205, 콜렉틴), 한편 기타(예를 들어, 보체 수용체)는 PAMP 인식에 의해 생성된 산물을 인식한다. 이들 수용체 계열의 구성원은 일반적으로 3가지 유형으로 구분될 수 있다: 1) 혈장 내 순환하는 체액성 수용체; 2) 면역-세포 표면 상에 발현된 세포흡수작용 수용체, 및 3) 세포 표면 상에 또는 세포내 발현될 수 있는 시그널링 수용체(문헌 [Medzhitov et al., 1997]; 문헌 [Fearon et al., 1996]).

[0254] 세포성 PRR은 적응성 면역력에서 전문적 항원-제시 세포(APC)로서 작용하는 세포를 포함한, 선천성 면역계의 이펙터 세포 상에서 발현된다. 그러한 이펙터 세포에는 대식세포, 수지상 세포, B 림프구 및 표면 상피가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 이 발현 프로파일은 PRR이 직접적으로 선천성 이펙터 기전을 유도하도록 하고, 또한 이하 논의되는 바와 같이, 내인성 신호 세트, 예컨대 염증성 사이토카인 및 케모카인의 발현을 유도함으로써 감염 제제의 존재 하에 숙주 유기체를 피하도록 한다. 이 후자는 침범 물질에 저항하도록 이펙터의 힘을 효율적으로 이동시키도록 하는 기능을 한다.

[0255] 수지상 세포(DC)의 일차적 기능은 말단 조직에서 항원을 습득하여, 이차 림프양 조직으로 이동하며, 면역계의 이펙터 T 세포에 항원을 제시하는 것이다(문헌 [Banchereau, et al., 2000]; 문헌 [Banchereau, et al., 1998]). DC가 면역 반응에서의 중대한 역할을 수행함에 따라, 그것은 각 환경에 적절한 기능을 수행하도록 하는 성숙 변화를 겪는다(문헌 [Termeer, C. C. et al., 2000]). DC 성숙 중에, 항원 수용 가능성이 소실되고, 주요 조직적합성 복합체(MHC) I형 및 II형 분자의 표면 밀도는 10 내지 100배 증가하고, CD40, 공동자극 및 접합 분자 발현도 또한 크게 증가한다(문헌 [Lanzavecchia, A. et al., 2000]). 추가로, 기타 유전자 변경은 DC가 다시 배수 림프절의 T 세포-풍부 부피질로 귀속되도록 하고, 나이브 및 기억 T 세포를 발현하고, 항원-특이적 나이브 THO 세포를 유인하는 T-세포 케모카인을 프라이밍하도록 한다(문헌 [Adema, G. J. et al., 1997]). 이 단계 동안, 성숙 DC는 CD4+ T 헬퍼 세포에 대해 그것의 MHC II 분자를 통해 항원을 제시하여, T 세포 CD40 리간드(CD40L)의 상향조절을 유도하고, 이는 다시 DC CD40 수용체를 함입시킨다. 이 DC:T 세포 상호작용은 MHC I형 및 II형 분자, 접합 분자, 공동자극 분자(예를 들어, B7.1, B7.2), 사이토카인(예를 들어, IL-12) 및 항-아포프토시스 단백질(예를 들어, Bcl-2)의 추가 상향조절을 포함한 강한 CD8+ 세포독성 T 림프구(CTL) 반응의 개시에 중대한 부가적 DC 분자의 급속 발현을 유도한다(문헌 [Anderson, D. M., et al., 1997]; 문헌 [Caux, C, et al., 1997]; 문헌 [Ohshima, Y., et al., 1997]; 문헌 [Sallusto, F., et al., 1998]). CD8+ T 세포는 림프절에서

나와, 순환에 다시 들어가고, 염증의 원래의 부위로 귀속하여, 병원체 또는 악성 세포를 파괴한다.

[0256] DC의 기능에 영향을 미치는 한 핵심적 파라미터는 DC에 대해 "온 스위치"로서 작용하는 CD40 수용체이다(문헌 [Bennett, S. R. et al., 1998]; 문헌 [Clark, S. R. et al., 2000]; 문헌 [Fernandez, N. C, et al., 1999]; 문헌 [Ridge, J. P. et al., 1998]; 문헌 [Schoenberger, S. P., et al., 1998]). CD40은 TNF 수용체 수퍼패밀리의 48-kDa 막투과 구성원이다(문헌 [Mcwhirter, S. M., et al., 1999]). CD40-CD40L 상호작용은 TNF 수용체 관련 인자(TRAF)를 수반하는 시그널링 캐스케이드를 개시하는 데 필요한 CD40 3량체화를 유도한다(문헌 [Ni, C. Z., et al., 2000]; 문헌 [Pullen, S. S. et al., 1999]). CD40은 NFκB, AP-1, STAT3 및 p38MAPK를 포함한, DC에서의 수가지 전사 인자를 활성화기 위해 상기 시그널링 분자를 사용한다(문헌 [McWhirter, S. M., et al., 1999]).

[0257] 공동자극성 폴리펩티드는 NFKB 경로, Akt 경로 및/또는 p38 경로를 활성화하는 임의의 분자 또는 폴리펩티드를 포함한다. DC 활성화 시스템은 공동자극성 폴리펩티드가 리간드로 활성화되고/되거나 조절되어, 올리고머화가 초래되게 되는, 리간드-결합 도메인(즉, 소분자 결합 도메인)에 융합된 재조합 시그널링 분자(즉, 지질-투과성, 유기, 이량체화 약물)를 이용하는 것에 기초한다. 공동자극성 폴리펩티드의 교차결합 또는 올리고머화를 위해 사용될 수 있는 다른 시스템에는 항체, 천연 리간드 및/또는 인공 교차-반응 또는 합성 리간드가 포함된다. 또한, 고려되는 다른 이량체화 시스템에는 쿠머마이신/DNA 기라제 B 시스템이 포함된다.

[0258] 본 발명에 사용될 수 있는 공동자극성 폴리펩티드에는 NFKB 및 기타 가변 시그널링 캐스케이드, 예를 들어 p38 경로 및/또는 Akt 경로를 활성화하는 것들이 포함된다. 그러한 공동자극 폴리펩티드에는 패턴 인식 수용체, C-반응성 단백질 수용체(즉, Nod1, Nod2, PtX3-R), TNF 수용체(즉, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, 4-1BB) 및 HSP 수용체(Lox-1 및 CD-91)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0259] 본원에 기재된 바와 같이, PRR에는 세포흡수작용 패턴-인식 수용체(즉, 만노스 수용체, 스캐빈저 수용체(즉, Mac-1, LRP, 펩티도글리칸, 테코산, 독소, CD11c/CR4)); 외부 신호 패턴-인식 수용체(Toll-유사 수용체(TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11), 펩티도글리칸 인식 단백질, (PGRP는 세균 펩티도글리칸 및 CD14에 결합함); 및 내부 신호 패턴-인식 수용체(즉, NOD-수용체 1 & 2)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0260] 다른 한 추가 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 표적화 부분, 및 하나 이상의 공동자극성 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 공동자극성 폴리펩티드(들)는 항원성 폴리펩티드에 부가하여 또는 그 대신에 발현될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 면역접합체는 표적화 부분, 면역자극 핵산(예를 들어, PAMP), 및 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 3개)의 공동자극성 폴리펩티드를 코딩하는 발현가능한 핵산을 포함한다. 한 부가적 실시양태에서, 면역접합체는 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 부가적 핵산 분자를 포함한다.

[0261] 공동자극성 폴리펩티드에는 패턴 인식 수용체, C-반응성 단백질 수용체(즉, Nod1, Nod2, PtX3-R), TNF 수용체(즉, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, 4-1BB) 및 HSP 수용체(Lox-1 및 CD-91)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 더욱 구체적으로는, 공동자극성 폴리펩티드는 CD40 세포질 도메인이다.

[0262] 그러므로, 본 발명의 각종 실시양태들에서, 조성물은 표적화 부분, 하나 이상의 공동자극성 폴리펩티드, 또는 공동자극성 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 그러한 공동자극성 폴리펩티드 분자는 항원 제시 분자의 수지상 세포 발현의 상향조절에 의해 T-세포 매개 반응을 증폭시킬 수 있다. 본 발명에서 고려되는 공동자극성 단백질에는, 예를 들어 종양 괴사 인자(TNF) 계열의 구성원(즉, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, 4-1B), Toll-유사 수용체, C-반응성 단백질 수용체, 패턴 인식 수용체 및 HSP 수용체가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 이 공동자극성 폴리펩티드로부터의 세포질 도메인을 발현하는 핵산 분자를 포함한다. 돌연변이체를 포함한 각종 공동자극성 폴리펩티드 중 하나로부터의 세포질 도메인에서, 세포질 도메인과 관련된 전사를 개시하는 것에 수반되는 인식 서열은 알려져 있거나 그러한 서열에 대해 반응성인 유전자가 알려져 있다. 본원에서의 본 발명의 범주 내에 사용될 수 있는 공동자극성 폴리펩티드의 추가예가 당업계에 알려져 있고, 예컨대 미국 특허 제7,404,950호; 제6,891,030호; 제6,803,192호; 및 제7,074,590호 및 미국 특허출원 제2007/0172947호; 제20060269566호 및 제2005/0084913호에 개시되어 있다.

[0263] ***C. 항미생물 펩티드(알라민)***

[0264] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 하나 이상의 항미생물 펩티드를 코딩하는 서열에 연결되거나 그 서열을 포함한다. 본 발명에 따른 항미생물 펩티드는 미생물 유기체를 사멸시키거나 그것의 성장을 억제할 수 있

는 펩티드이다. 본 발명의 항미생물 펩티드의 항미생물 활성에는 항세균, 항바이러스 또는 항진균 활성이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 항미생물 펩티드에는 각종 계열의 펩티드, 예를 들어 식물 및 동물로부터 원래 단리된 펩티드가 포함된다. 동물에서, 항미생물 펩티드는 통상 호중구 및 상피 세포를 포함한 각종 세포들에 의해 발현된다. 인간을 포함한 포유동물에서, 항미생물 펩티드는 통상 혀, 기관(trachea) 및 상위의 표면에서 발견된다. 천연 발생의 항미생물 펩티드는 일반적으로 100개 미만의 아미노산을 포함하는 양친매성 분자이다. 이들 펩티드 중 상당수가 일반적으로 네트 양성 전하를 가지고(즉, 양이온성), 대부분 나선 구조를 형성한다.

[0265] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항미생물 펩티드는 약 2 내지 약 100개 아미노산, 약 5 내지 약 50개, 또는 약 7 내지 약 20개 아미노산을 포함한다. 한 바람직한 실시양태에서, 표적화 펩티드는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산의 길이를 가진다.

[0266] 또 다른 실시양태에서, 항미생물 펩티드는 최소 억제 농도(MIC)가 약 40 μM 이하, 약 30 μM 이하, 20 μM 이하, 또는 10 μM 이하인 항미생물 활성을 가진다.

[0267] 또 다른 실시양태에서, 항미생물 펩티드는 알렉소마이신 안드로펜, 아피다에신, 박테리오신, 베타-병풍형 시트 박테리오신, 박테네신, 부포린, 카텔리시딘, α-나선 클라바닌, 세크로펜, 도데캅펩티드, 데펜신, β-데펜신, α-데펜신, 가에구린, 히스타틴, 인돌리시딘, 마가이닌, 멜리틴, 니신, 노비스피린 G10, 프로테그린, 라날렉신, 타키플레신 및 이들의 유도체를 포함하나 이들에 국한되지 않는 하나 이상의 항미생물 펩티드를 포함한다.

[0268] 알려진 상기 항미생물 펩티드 중, 타키플레신은 항진균 및 항세균 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 안드로펜, 아피다에신, 박테네신, 클라바닌, 도데캅펩티드, 데펜신 및 인돌리시딘은 항세균 활성을 갖는 항미생물 펩티드이다. 부포린, 니신 및 세크로펜 펩티드는 에쉐리키아 콜라이, 쉬겔라 디센테리아에, 살모넬라 타이피무림(Samonella typhimurium), 스트렙토코커스 뉴모니아에, 스타필로코커스 아우레우스 및 슈도모나서 아에로기노사에 대해 항미생물 효과를 가지는 것으로 입증되었다. 마가이닌 및 라날렉신 펩티드는 동일한 유기체에 대해 항미생물 효과를 가지고, 추가로 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 칸디다 크루세이(Candida krusei) 및 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori)에 대해 상기 영향을 가지는 것으로 입증되었다. 마가이닌은 또한 단순 포진 바이러스에 대해서도 항미생물 효과를 가지는 것으로 입증되었다. 알렉소마이신 펩티드는 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 모락셀라 카타할리스(Moraxella catarrhalis) 및 헤모필러스 인플루엔자에(Haemophilus influenzae)에 대해 항미생물 효과를 가지는 것으로 입증된 반면, 데펜신 및 β-병풍형 시트 데펜신 펩티드는 스트렙토코커스 뉴모니아에 대해 항미생물 효과를 가지는 것으로 나타났다. 히스타틴 펩티드 및 그것의 유도체는 스트렙토코커스 뮤탄스(Streptococcus mutans)를 포함한 각종 유기체에 대해 항진균 및 항세균 활성을 가지는 또 다른 계열의 항미생물 펩티드이다(문헌 [MacKay, B. J. et al., Infect. Immun, 44:695-701(1984)]; 문헌 [Xu, et al., J. Dent. Res. 69:239(1990)]).

[0269] 한 실시양태에서, 본 발명의 항미생물 펩티드는 히스타딘 펩티드의 계열로부터의 하나 이상의 항미생물 펩티드 및 그것의 유도체를 포함한다. 추가예가 미국 특허출원 공보 제US 2008 0170991호 제공되어 있다.

[0270] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항미생물 펩티드는 프로테그린의 계열로부터의 하나 이상의 항미생물 펩티드 및 그것의 유도체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 항미생물 펩티드는 프로테그린 PG-1을 포함한다.

[0271] 프로테그린 펩티드가 각기 본원에 참조 인용되는, 미국 특허 제5,693,486호, 제5,708,145호, 제5,804,558호, 제5,994,306호 및 제6,159,936호에 기재되어 있다.

[0272] 본 발명에 따른 항미생물 펩티드는 당업자에게 알려진 임의의 적당한 방법 그 자체에 의해, 또는 그것을 표적화 펩티드 및 링커 펩티드와 조합하여 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 항미생물 펩티드는 합성장치에 의해 화학적으로 합성되거나, 발현 시스템, 예를 들어 세균성, 효모 또는 진핵 세포 발현 시스템을 이용하여 재조합될 수 있다. 화학 합성에서, 항미생물 펩티드는 L-아미노산 거울이성질체 또는 D-아미노산 거울이성질체에 의해 제조될 수 있다.

[0273] 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 항미생물 펩티드 LL-37-카텔리시딘-유래 항미생물 펩티드인 알라민을 포함한다.

[0274] 항미생물 펩티드는 미생물 침범 물질에 대한 다세포 유기체의 선천성 숙주 방어에 있어 중요한 역할을 한다. 항미생물 펩티드들 간의 공통된 특성은 소수성 및 양이온성 아미노산의 클러스터가 구분된 분자 구획에서 공간적으로 조직화되는 양친매성 형태를 채택하는 능력이다. 데펜신 및 카텔리시딘은 포유동물에서의 2가지 주요 계열의 항미생물 펩티드이다. 카텔리시딘은 매우 보존된 N-말단 카텔린 도메인 및 더욱 다양한 항미생물 C 말단으로

구성된다. LL-37, 즉 2개의 N-말단 류신을 갖는 37-아미노산 펩티드는 알려진 유일한 인간 카텔린-관련 항미생물 펩티드이다. LL-37의 전구체인 hCAP-18 및 그것의 마우스 동종체인 CRAMP는 주로 골수 세포에서 발현되나, 다수의 기관들의 부고환, 정자 세포 및 상피 세포를 포함한 비골수성 조직에서도 광범위하게 발현된다. 중요하게도, LL-37의 발현은 각질형성세포 및 상피 세포 모두의 다른 부위에서 감염성 또는 염증성 자극 시에 유도된다. LL-37은 세균 세포 용해를 유도하고, 세균 엔도톡신을 중화하며, 백혈구에 대해 화학유인 효과를 가진다. LL-37은 수지상 세포를 활성화할 수 있는 TLR 작용자 및 알라민을 나타낸다. LL-37은 플라스미드 DNA를 혈청 뉴클레아제 분해로부터 보호하고, 포유동물의 세포의 핵 구획에 DNA를 효과적으로 표적화한다. LL-37/DNA 복합체는 세포 표면 프로테오글리칸뿐만 아니라 비표면소포 지질 래프트 도메인을 수반하는 내포작용을 통해 포유동물의 세포에 들어간다.

[0275] 항체-DNA 접합체 및 LL37의 복합체 제조: LL-37 펩티드(LLGDFFRXSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES-C-아미드)를 합성하고, 펩티드 서열을 역상 고압 액체 크로마토그래피 및 질량 분광분석에 의해 확인한다. LL-37-DNA 복합체를 형성하기 위해, DNA(10 ㎍/ml) 및 LL-37(5 내지 100 ㎍/ml)를 역위에 의해 혼합하고, 실온에서 30분 동안 항온배양한다. 대안적으로, LL-37는 항체에 공유 커플링하여, 융합 단백질로서의 항체/표적화 리간드 내에 도입될 수 있다.

[0276] 일부 실시양태들에서, 접합체는 히스티딘-풍부 양친매성 항미생물 펩티드를 포함한다. 다양한 수의 히스티딘 잔기를 포함하는 합성 양이온성의 양친매성 펩티드는 또한 본 발명의 항체-DNA 접합체와 합체된다. 형질감염 효율은 막투과 전달로의 인-플레인이 일어나게 되는 pH뿐만 아니라 펩티드 내 히스티딘 잔기의 수 및 위치에 의존한다. 엔도좀 산성화도 또한 필요하다. 이 펩티드는 DNA와 합체될 때에도 높은 수준의 항세균 활성을 유지한다. 그 예에는 각종 수의 리신 및 히스티딘 잔기와 함께 알라닌 및 류신 잔기가 풍부한 양친매성 펩티드가 포함된다. 펩티드의 양 말단에 있는 리신이 DNA 축합을 돕는 반면, 히스티딘 잔기는 DNA(11)의 엔도좀 탈피를 돕는다. 펩티드 서열의 예에는 하기의 것들이 포함된다: KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA; KKALLALALHHLAHLAHHLALALKKA; 또는 KKALLALALHHLALLAHHLALALKKA-NH_2.

[0277] 펩티드-DNA 복합체를 형성하는 한 예시적 방법으로서, 펩티드(4-6 ug/1 ug DNA) 및 DNA(각기 100 ㎕의 150 mM NaCl 중에 희석됨)를 혼합하고, 실온에서 20분 동안 항온배양한다. 대안적으로, 펩티드를 항체에 공유 커플링하여, 융합 단백질로서 항체/표적화 리간드 내에 도입할 수 있다.

[0278] 본 발명의 범주 내에서 사용하기 위한 다른 펩티드에는 다가염기 항미생물 펩티드, 예컨대 DNA에 결합하여 막을 탈안정화하는 다중작용적 펩티드가 포함된다. 추가로, 그러한 펩티드에는 다가염기 "막투과 펩티드": HIV-1 트랜스활성화제(Tat)-YGRKKRRQRRRPPQC; 드로소필라(Drosophila)의 안테나페디아(Antennapedia) 단백질-RQIKIWFQNRRMKWKK; 단순 포진 VP22; 또는 폴리리신이 포함된다. 이 펩티드는 PG-의존성 및 비클라트린-매개 세포흡수작용을 통해 DNA 내재화를 매개한다.

[0279] 추가 실시양태에서, 펩티드는 KALA, ppTG20 및 Vpr52-96과 같은 항미생물 펩티드를 포함한다. KALA 및 ppTG20은 유전자융합 펩티드 GALA 및 JTS-I으로부터 유래하는 DNA 결합 및 양친매성 막-탈안정화 도메인에 필요한 양전하 리신 또는 아르기닌 스트레치를 조합한다. 이 형질감염 펩티드는 나선의 한 면 상에 리신 또는 아르기닌을 위치하는 α-나선 형태로의 강한 경향을 가진다.

[0280] 다른 한 추가 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 프로타민 황산염에 연결된다. 예를 들어, 항체-DNA 접합체는 정자 DNA를 핵화하는 프로타민(아미노산 8-29)의 핵산 결합 단백질 또는 단편에 연결된다. 대안적으로, 펩티드는 항체에 공유 커플링되거나 융합 단백질로서 항체/표적화 리간드에 도입될 수 있다. 또한, 기타 다가양이온(예를 들어, 폴리에틸렌이민(PEI)) 또는 양이온성 리포좀(예를 들어, DOTAP)이 당업계에 알려져 있고, 본 발명의 접합체의 범주 내에 사용될 수 있다.

[0281] 또 다른 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 상기 기재된 바와 같은 펩티드 및 PAMP(예컨대, 명세서에 열거된 TLR 작용자) 또는 DAMP(예컨대, 명세서에 열거된 알라민)(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체-DNA 접합체에 연결됨)을 포함한다.

[0282] **D. 투과 펩티드**

[0283] 일부 실시양태들에서, 조성물(접합체)은 하나 이상의 투과 펩티드를 포함한다. 그러한 펩티드는 통상적 커플링 방법 및 본원에 개시된 방법을 이용하여 본 발명의 접합체에 커플링될 수 있다. 세포막을 통과한 단백질 또는 핵산의 효율적 전달은 세포 생물학에서의 주요 과제 중 하나이다. 선택된 단백질의 작용적 도메인을 온전한 세포의 외부에서 내부로 전달하기 위해, 담체가 필요하다. 단백질 전달 도메인(PTD)으로도 알려진 세포 투과성 펩

티드는 세포막을 자유롭게 통과할 수 있는 작은 펩티드 도메인을 갖는 담체이다. 수가지 PTD가 단백질 전달로서 알려진 공정에서 융합된 단백질 융합된 단백질 세포막을 효율적으로 통과하도록 하는 것으로 확인되었다. 연구에 의해, HIV TAT 단백질 유래의 TAT 펩티드가 펩티드 또는 단백질을 각종 세포로 전달할 수 있는 것으로 입증되었다. PTD는 항암법에서 이용되어 왔는데, 예를 들어 세포 투과성 Bcl-2 결합 펩티드, cpm1285는 마우스에서 인간 골수성 백혈병 성장을 늦추는 데 활성을 나타낸다. 특이적 SH2 도메인-함유 단백질에 대한 수용체 결합 부위를 모방하는 세포-투과성 포스포펩티드, 예컨대 FGFR730Py가 암 연구 및 세포 시그널링 기전 연구를 위한 잠재적 도구이다.

[0284] 본 발명의 조성물 및 방법에 도입될 수 있는 펩티드의 예에는 (Arg)9, TAMRA-표지, (Arg)9 FAM-표지, [Cys58]105Y, 세포 투과 펩티드, 1-안티트립신(358-374)105Y, 알파 1-안티트립신(359-374), 아미노펩티다제 N 리간드(CD 13), NGR 펩티드, 아미노펩티다제 N 리간드(CD 13), NGR 펩티드, 안테나페디아 리더 펩티드(CT), 안테나페디아 펩티드, 산, 안테나페디아 펩티드, 아미드, 항-베타감마(MPS-포스듀신(Phosducin)-유사 단백질 C 말단), 항-베타감마(MPS-포스듀신-유사 단백질 C 말단), 비오틴-TAT(47-57), 부포린, 키메라 광견병 바이러스 당단백질 단편(RVG-9R), Cys(Npys) 안테나페디아 펩티드, 아미드, Cys(Npys)-(Arg)9, Cys(Npys)-(D-Arg)9, Cys(Npys)-TAT(47-57), Cys(Npys)-TAT(47-57), FAM-표지, Cys-TAT(47-57), FITC-LC-안테나페디아 펩티드, FITC-LC-MTS, FITC-LC-TAT(47-57), 지질 막 전좌 펩티드, 지질 막 전좌 펩티드, D-이성질체, 마스토파란, 마스토파란 X, MEK1 유래 펩티드 억제제 1, MEK1 유래 펩티드 억제제 1, 막-투과성 서열, MPS, MPG, HIV 관련, MPS-Gαi2, MPS-Gαi3, 미리스톨, NGR 펩티드 1,2,3,4, 핵 위치 신호 펩티드, Pep-1: 샤리오트(Chariot)(펩티드 및 단백질의 비-공유 전달), 광견병 바이러스 기질 단백질 단편(RV-MAT), 스테아릴-MEK-1 유래 펩티드 억제제 1, 아미드, SynB1, TAT(47-57), TAT(47-57) GGG-Cys(Npys), TAT(47-57), FAM-표지, TAT(47-57), TAMRA-표지, TAT(47-57)-Lys(TAMRA), Tat(48-57), Tat-C(48-57), Tat-NR2Bct, TAT-NSF222 융합 펩티드, TAT-NSF222scr 융합 폴리펩티드, 스크램블, TAT-NSF700 융합 펩티드, TAT-NSF700scr, TAT-NSF81 scr 융합 폴리펩티드, 스크램블, 경피 펩티드 또는 트랜스포르탄(Transportan)이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 또한, 이들 펩티드는 핵산 결합을 위해 사용될 수 있다.

[0285] ***III. 조성물***

[0286] ***A. 종양 표적 조성물***

[0287] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 질병 증상의 예방 또는 치료를 허용하는 조성물 및 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 동물의 백신접종을 위한 수단을 제공한다.

[0288] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 암 또는 종양의 표적 분자 또는 성분에 결합하는 하나 이상의 표적화 부분(T)(***종양-표적화 부분***)을 포함한다. 표적 분자는 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 성분일 수 있다.

[0289] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩하고, 면역 반응을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다.

[0290] 한 관련 실시양태에서, 종양-표적 접합체의 핵산 분자는 T 세포 및/또는 B 세포에 의한 인식을 위해 가공되고 제시될 수 있는 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자를 코딩한다. 코딩된 항원성 결정자는 각각의 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: $CD4^+$ T 세포 에피토프, $CD8^+$ T 세포 에피토프, B 세포 에피토프. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자를 코딩한다. 예를 들어, 핵산은 파상풍 독소로부터 유래된 서열을 코딩하여, $CD4^+$ T-세포 헬프[예를 들어 파상풍 유래 T_H 활성화 서열: 단편 C(FrC), FrC 도메인 DOM1 또는 원시 MHC II형-결합 펩티드 p30]를 제공한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산은 미생물 백신 또는 기타 비자가 공급원(예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사 외독소, 녹색 형광 단백질, 식물 바이러스 외피 단백질)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자를 코딩한다.

[0291] 한 관련 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP),

및/또는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분 및 하나 이상의 PAMP(들)를 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)를 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 하나 이상의 PAMP(들), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다.

[0292] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민(들), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 및 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다. 또 다른 관련 실시양태에서, 접합체는 종양 표적화 부분, 하나 이상의 DAMP/알라민(들), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자(들)를 포함한다.

[0293] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프), (ii) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (iii) 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP)/알라민(들), (iv) 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, DC 수용 수용체를 위한 리간드/항체, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 포함하는 하나 이상의 면역자극 분자. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 부가적으로 하나 이상의 종양 항원/항원성 결정자 또는 종양 항원-함유 융합 단백질을 코딩한다. 한 측면에서, 종양 항원의 융합 파트너는 DC에 의한 항원 수용, 면역 인식 및/또는 면역 활성화를 용이하게 한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너에는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 분자가 포함된다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자이다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0294] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 하나 이상의 표적 세포 유전자의 발현을 간섭할 수 있는 하나 이상의 RNA 분자[예를 들어, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)]를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 접합체의 핵산 분자는 하나 이상의 면역자극 RNA 분자를 코딩한다.

[0295] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 및 표적 세포의 사멸을 유도하는 분자를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다.

[0296] 본원에 기재된 각각의 표적화 부분-핵산 접합체에서, 핵산 분자는 목적 세포 내에서 기능적으로 활성인 전자 프로모터의 조절 하에 하나 이상의 관심 유전자를 코딩한다. 한 실시양태에서, 조직 또는 종양 세포 선택적 프로모터는 목적 세포 유형에서 표적 발현을 위해 사용된다.

[0297] 한 실시양태에서, 각각의 종양 표적화 부분-핵산 본원에 기재된 접합체는 핵산 분자 또는 접합체의 팩키징 및/또는 전달을 위한 하나 이상의 성분에 연결된다. 예를 들어, 이들 분자에는 양이온성 펩티드, 세포 투과 펩티드, DC 표적화 펩티드, 핵산 결합 분자, 핵 국소화 펩티드, 양이온성 리포좀, 친지성 부분, 나노입자가 포함된다.

[0298] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체, 하나 이상의 핵산 분자(들) 및 하나 이상의 펩티드/폴리펩티드/리포펩티드(들)의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같이 (주: 0017), 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고/하거나, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 각종 관련 실시양태들에서, 펩티드/폴리펩티드/리포펩티드(들)는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래

된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, $CD4^+$ T 세포 에피토프), (ii) 알라민, (iii) DC 결합 분자(예를 들어, DC 수용 수용체의 리간드). 한 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 펩티드/폴리펩티드는 상호 간에 및/또는 핵산 결합 펩티드 또는 세포 투과 펩티드[예를 들어 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37)에 융합/연결될 수 있다.

[0299] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-표적화 부분, 예컨대 항체 또는 압타머, 및 하기의 것들 중 하나 이상의 접합체를 포함한다: (a) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (b) 펩티드/폴리펩티드/리포펩티드(들) 중 하나 이상: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, $CD4^+$ T 세포 에피토프), (ii) 알라민, (iii) DC 결합 분자(예를 들어, DC 수용 수용체의 리간드). 한 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 펩티드/폴리펩티드는 상호 간에 및/또는 핵산 결합 펩티드[예를 들어 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37)에 융합/연결될 수 있다. 한 측면에서, 접합체는 면역자극 핵산을 포함한다.

[0300] 한 실시양태에서, 본 발명은 표적화 부분, 예컨대 항체 및 압타머인 핵산 분자의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 및 핵산 압타머는 동일한 세포 유형 또는 상이한 세포 유형 상의 상이한 표적에 결합한다. 한 실시양태에서, 접합체는 종양 세포 표면 수용체(EGFR)를 표적으로 하는 항체 및 전립선 특이적 막 항원(PSMA)을 표적으로 하는 압타머를 포함함으로써, 전립선 암 세포 내 양 단백질을 표적으로 한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같이(주: 0017), 압타머 및 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: (i) PAMP 또는 기타 면역자극 핵산, (ii) 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩하는 DNA.

[0301] 어느 하나의 작용 기전에도 국한되고자 의도하지 않으며, 본 발명의 접합체가 작동할 수 있도록 하는 한 기전은 이하와 같다. (1) 항체-DNA 접합체는 표적 분자, 예컨대 종양 세포 상의 세포 표면 항원 또는 수용체에 결합한다. (2) 접합체가 종양 세포에 결합함으로써 수용체-매개 세포흡수작용이 초래되고, 핵산 분자의 세포 도입이 용이하게 된다. (3) 세포 도입은 핵산 분자에 의해 코딩된 관심 유전자의 프로모터-구동 발현을 가능하게 한다. (4) 표적 종양 세포 내 특정화된 관심 유전자의 발현은 하기 효과를 촉발한다: (a) 하나 이상의 코딩된 병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)의 발현; (b) T 세포(CD4+ 또는 CD8+) 또는 B 세포에 의한 인식을 위한 주조직적합성 복합체(MHC) 분자 영역에 있어서의 종양 세포(및 DC) 내 병원체 항원-유래 에피토프의 제시; (c) 병원체 항원-유래 B 세포 에피토프를 인식하는 항체는 상기 에피토프를 제시하는 종양 세포에 결합하여, (Fc-Fc 수용체 상호작용을 통해) 상기 종양 세포의 항체-의존성 세포성 세포독성을 촉진하고; 상기 항체는 병원체 항원 백신에의 사전 노출을 통해 수령자 내에 미리 존재하여도 되거나, 접합체 투여 후에 생성되며; (d) 병원체 항원-유래 T 세포 에피토프를 인식하는 T 세포는 이 에피토프를 제시하는 종양 세포의 (DC 및 CD8+ T 세포에) CD4+ T 세포 헬프 및 CD8+ T-세포 매개 세포독성을 제공하고; 이 T 세포는 병원체 항원 백신에의 사전 노출을 통해 미리 존재하여도 되거나, 접합체 투여 후에 생성되거나 체외 활성화/노출 항원-반응성 T 세포의 적응성 전달을 통해 전달된다.

[0302] 또한, 수지상 세포(DC)에 의한 항체 코팅 종양 세포(옵소닌화 세포)의 식세포 작용은 (Fc-Fc 수용체 상호작용을 통한) MHC 분자 영역에서의 병원체-유래 및 종양 관련 항원의 교차-제시를 용이하게 한다. 추가로, 항원 제시 세포(DC)는, (a) (접합체의 핵산 분자 내) 병원체 관련 분자 패턴; (b) 손상 관련 분자 패턴(사멸 중 종양 세포에 의해 생성된 내인성 알라민); (c) 병원체-유래 CD4+ T 세포 에피토프를 인식하는 CD4+ T 헬퍼 세포에 의해 활성화된다. 그러므로, 교차-제시된 병원체 항원- 또는 종양 항원-유래 에피토프를 인식하는 CD4+ T 헬퍼(T_H) 세포 및 CD8+ T 세포의 활성화는 항원 전착을 초래한다. 추가로, 활성화된 T 세포는 병원체-유래 T 세포 에피토프를 발현하는 종양 세포 및 내인성 종양 항원 에피토프를 발현하는 종양 세포의 세포독성을 유도한다.

[0303] 추가로, 하기 계열의 코딩된 면역자극 분자의 발현은 종양 세포 상의 병원체 항원 에피토프 또는 종양 항원 에피토프를 인식하는 DC 및/또는 T 세포의 동원, 증식, 생존 및/또는 활성화를 증진시킬 수 있다: (1) 면역자극 사이토카인(예를 들어, 인터페론, IL-12, IL-15, GM-CSF); (2) T 세포 공동자극성 분자; (3) DC 동원 또는 활성화 분자(PAMP, DAMP, 알라민).

[0304] 또한, 면역자극 DAMP를 생산하면서 표적 종양 세포의 사멸을 유도하는 하기 부류의 코딩된 분자의 발현이 종양 세포 상의 병원체 항원- 또는 종양 항원 에피토프를 인식하는 DC 및/또는 T 세포의 동원, 증식, 생존 및/또는 활성화를 증진시킬 수 있다: (1) 생존 관심 유전자를 침묵화하는 si RNA; (2) 직접적 세포살해 또는 사멸 시그널링 단백질; 및 (3) 자살 유전자에 의해 코딩된 단백질.

[0305] 한 실시양태에서, 접합체는 종양-표적 항체, 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 플라스미드/미니서클

을 포함한다. 예를 들어, 항체가 종양 세포 상의 인간 표피 성장 인자 수용체 세포 표면 수용체를 표적으로 하거나(항-EGFR); 항체는 종양 세포 상의 인간 HER2/neu 수용체 세포 표면 수용체를 표적으로 한다(항-HER2/neu).

[0306] 또 다른 실시양태에서, 접합체는 종양-표적 압타머, 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 플라스미드/미니서클을 포함한다. 예를 들어, 압타머는 종양 세포 상의 세포 표면 분자(전립선 특이적 막 항원(PSMA))를 표적으로 한다(PSMA RNA 압타머).

[0307] 또 다른 실시양태들에서, 접합체는 종양-표적 펩티드, 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 미니서클을 포함한다. 그러한 종양 표적 펩티드의 예가 알려져 있고 본원에 개시되어 있다(예를 들어, RGD 펩티드).

[0308] DNA 백신 설계 및 근거: CD4+ T 헬퍼(T_H) 세포는 면역 반응의 유도 및 유지를 위해 중요하다. T_H 세포는 CD8+ T 세포의 프라이밍 및 이차 확장, 및 항체 생산을 위한 B 세포의 헬프 제공이 요구된다. 자가 종양 항원은 유의적 T_H 반응을 유도할 수 없기 때문에, 본 발명의 종양 표적 DNA 접합체 백신은 코딩된 병원체-유래 서열, 예컨대 파상풍 독소 또는 슈도모나스 아에루기노사 외독소로부터의 상기 서열을 포함하여, 기존 항-미생물 레퍼토리로부터의 T_H 세포는 면역접합체-표적 종양 세포로부터 유래된 종양 항원 및/또는 동일한 플라스미드 또는 미니서클 내 공동코딩/융합된 항원에 대해 CD8+ T 세포 및/또는 B 세포 반응을 개시할 수 있다. DNA 백신은 또한 녹색 형광 단백질, 식물 바이러스 외피 단백질 또는 면역 표적화 분자(단독 또는 융합 파트너로서 종양 항원과의 공동발현)와 같은 다른 비자가 항원을 도입함으로써 T-세포 헬프를 제공할 수 있다.

[0309] 병원체-유래 서열을 포함한 DNA 백신을 종양 표적 부분에 접합함으로써, 표적 종양 세포 내 상기 항원성 결정자의 발현 및 항원성 물질(병원체-유래 및 내인성 종양 세포/항원)의 표적 종양 세포를 탐식한 APC로의 간접적 전달(교차-제시)이 초래된다. 항체-DNA 백신의 일부는 또한 (APC FcR 상의 Fc 수용체와의 항체 Fc 상호작용을 통해) APC에 의해 제시되거나, 직접적으로 수용될 수 있다. 병원체- 및 종양-유래 항원의 그러한 교차-제시 및 직접적 제시는 효과적인 T-세포 헬프를 제공하고 하기 면역 반응을 초래할 수 있다: (1) 병원체 항원- 및 종양 항원-특이적 항체의 유도: 본 발명의 항체-DNA 접합체는 표적 종양 세포 내 병원체 항원(예를 들어, 파상풍 독소 유래 단편 C-FrC)의 발현 및 (백신 내 아포프토시스 종양 세포 및/또는 공동코딩/융합된 종양 항원으로부터의) DC에 의한 FrC 및 종양 항원의 교차-제시를 가능하게 한다. DC에 의해 자극된 (FrC)-특이적 T_H 세포는 (CD40-CD40 리간드 상호작용 및 사이토카인 생성을 통해) FrC 펩티드 또는 종양 세포 항원에 대한 항체를 생성시키도록 B 세포를 프라이밍하고 증강시킬 수 있다. 종양 세포 내 FrC 항원성 결정자의 발현은 또한 그것을 항-FrC 항체 또는 항-종양 항체에 의해 ADCC에 감수성을 가지도록 하며, 이로써 옵소닌화 또는 아포프토시스 종양 세포를 탐식한 DC에 의한 상기 항원의 교차-제시; (2) 종양-반응성 세포독성 T 세포의 유도를 보강한다: 미생물 항원 또는 기타 비자가 항원을 코딩하는 항체-DNA 백신을 사용하여, 광위의 다른 식의 약종양 항원에 대한 CD8+ T 림프구(CTL) 면역 반응을 개시하고 증폭시킬 수 있다. (FrC)-특이적 T_H 세포는 DC가 양 FrC 및 종양 항원을 교차-제시하도록 하여, 약종양 항원에 대한 CD8+ T 세포 반응을 프라이밍하고 증강시키도록 한다. 면역독점적 병원체-유래 펩티드가 반응을 하위독점적 종양-유래 에피토프로 제한할 수 있어, DNA 백신에 의해 코딩된 병원체-유래 항원은, CD4+ T 세포 헬프(예컨대, FrC-DOM1 또는 원시 MHC II형 결합 펩티드, 예컨대 파상풍 독소 p30의 단일 도메인)를 제공하는 데 필요한 에피토프를 함유하도록 최소화될 수 있다.

[0310] 이 면역 반응은 본 발명의 면역접합체가 하기의 것들 중 하나 이상을 통해 DC를 동시에 활성화하는 능력에 의해 용이하게 되고 보강된다: (1) 접합체(예컨대, 면역자극 핵산) 내에 도입된 PAMP; (2) 접합체 내에 포함된 손상 관련 분자 패턴(DAMP)(예를 들어, 알라민, 예컨대 LL-37 카텔리시딘); (3) 코딩된 유전자의 발현을 통해 또는 세포성 스트레스 및 손상에 의해 생성되는 내인성 PAMP 또는 DAMP; (4) 코딩된 유전자의 발현을 통해 또는 종양 세포 환경 내 면역 환경을 활성화하는 방관자 효과로서 생성되는 기타 내인성 면역자극 분자.

[0311] 또한, 면역자극 DAMP를 생산하면서 표적 종양 세포의 사멸을 유도하는 하기 부류들의 코딩된 분자의 발현은 종양 세포 상의 병원체 항원- 또는 종양 항원 에피토프를 인식하는 DC 및/또는 T 세포의 동원, 증식, 생존 및/또는 활성화를 증진시킬 수 있다: (1) 생존 관심 유전자를 침묵화하는 si RNA; (2) 직접적 세포살해 또는 사멸 시그널링 단백질; 및 (3) 자살 유전자에 의해 코딩된 단백질.

[0312] 한 실시양태에서, 접합체는 종양-표적 항체, 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 플라스미드/미니서클을 포함한다. 예를 들어, 항체가 종양 세포(항-EGFR) 상의 인간 표피 성장 인자 수용체 세포 표면 수용체를 표적으로 하거나; 항체가 종양 세포(항-HER2/neu) 상의 인간 HER2/neu 수용체 세포 표면 수용체를 표적으로 한다.

[0313] 또 다른 실시양태에서, 접합체는 종양-표적 압타머 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 플라스미드/미

니서클을 포함한다. 예를 들어, 압타머가 종양 세포 상의 세포 표면 분자(전립선 특이적 막 항원(PSMA)을 표적으로 한다(PSMA RNA 압타머).

[0314] 또 다른 실시양태들에서, 접합체는 종양-표적 펩티드 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 미니서클을 포함한다. 그러한 종양 표적 펩티드의 예는 알려져 있고 본원에 개시되어 있다(예를 들어, RGD 펩티드).

[0315] 하기의 것들은 종양 표적화 부분-DNA 백신 접합체를 생성하기 위한 예시적 방법을 제공한다: (1) 병원체-유래 유전자를 코딩하는 DNA 미니서클 백신: (a) 바실러스 안트라시스 보호 항원(PA)을 코딩하는 DNA 미니서클; (b) B. 안트라시스(B. anthracis) 보호 항원(PA)에 대한 DNA 서열을 포유동물의 세포(DNA 2.0) 내 효율적 발현을 위해 코돈 최적화하였고; (c) 클로스트리듐 테타니(Clostridium Tetani)(파상풍) 독소 유래 유전자 단편(예를 들어, 파상풍 독소 단편 C-FrC 또는 DOM1)을 위한 DNA 미니서클. 예를 들어, 클로스트리듐 테타니(파상풍) 독소 유래 유전자 단편(파상풍 단편 C 또는 DOM1)을 위한 DNA 서열을 포유동물의 세포(DNA 2.0) 내 효율적 발현을 위해 코돈 최적화하였다.

[0316] DNA 백신 설계 및 근거: CD4+ T 헬퍼(T_H) 세포는 면역 반응의 유도 및 유지를 위해 중요하다. T_H 세포는 CD8+ T 세포의 프라이밍 및 이차 확장, 및 항체 생산을 위한 B 세포의 헬프 제공이 요구된다. 자가 종양 항원은 유의적 T_H 반응을 유도할 수 없기 때문에, 본 발명의 종양 표적 DNA 접합체 백신은 코딩된 병원체-유래 서열, 예컨대 파상풍 독소 또는 슈도모나스 아에루기노사 외독소로부터의 상기 서열을 포함하여, 기존 항-미생물 레퍼토리로부터의 T_H 세포는 면역접합체-표적 종양 세포로부터 유래된 종양 항원 및/또는 동일한 플라스미드 또는 미니서클 내 공동코딩/융합된 항원에 대해 CD8+ T 세포 및/또는 B 세포 반응을 개시할 수 있다. DNA 백신은 또한 녹색 형광 단백질, 식물 바이러스 외피 단백질 또는 면역 표적화 분자(단독 또는 융합 파트너로서 종양 항원과의 공동발현)와 같은 다른 비자가 항원을 도입함으로써 T-세포 헬프를 제공할 수 있다.

[0317] 병원체-유래 서열을 포함한 DNA 백신을 종양 표적 부분에 접합함으로써, 표적 종양 세포 내 상기 항원성 결정자의 발현 및 항원성 물질(병원체-유래 및 내인성 종양 세포/항원)의 표적 종양 세포를 탐식한 APC로의 간접적 전달(교차-제시)이 초래된다. 항체-DNA 백신의 일부는 또한 (APC FcR 상의 Fc 수용체와의 항체 Fc 상호작용을 통해) APC에 의해 제시되거나, 직접적으로 수용될 수 있다. 병원체- 및 종양-유래 항원의 그러한 교차-제시 및 직접적 제시는 효과적인 T-세포 헬프를 제공하고 하기 면역 반응을 초래할 수 있다: (1) 병원체 항원- 및 종양 항원-특이적 항체의 유도: 본 발명의 항체-DNA 접합체는 표적 종양 세포 내 병원체 항원(예를 들어, 파상풍 독소 유래 단편 C-FrC)의 발현 및 (백신 내 아포프토시스 종양 세포 및/또는 공동코딩/융합된 종양 항원으로부터의) DC에 의한 FrC 및 종양 항원의 교차-제시를 가능하게 한다. DC에 의해 자극된 (FrC)-특이적 T_H 세포는 (CD40-CD40 리간드 상호작용 및 사이토카인 생성을 통해) FrC 펩티드 또는 종양 세포 항원에 대한 항체를 생성시키도록 B 세포를 프라이밍하고 증강시킬 수 있다. 종양 세포 내 FrC 항원성 결정자의 발현은 또한 그것을 항-FrC 항체 또는 항-종양 항체에 의해 ADCC에 감수성을 가지도록 하며, 이로써 옵소닌화 또는 아포프토시스 종양 세포를 탐식한 DC에 의한 상기 항원의 교차-제시; (2) 종양-반응성 세포독성 T 세포의 유도를 보강한다: 미생물 항원 또는 기타 비자가 항원을 코딩하는 항체-DNA 백신을 사용하여, 광위의 다른 식의 약종양 항원에 대한 CD8+ T 림프구(CTL) 면역 반응을 개시하고 증폭시킬 수 있다. (FrC)-특이적 T_H 세포는 DC가 양 FrC 및 종양 항원을 교차-제시하도록 하여, 약종양 항원에 대한 CD8+ T 세포 반응을 프라이밍하고 증강시키도록 한다. 면역독점적 병원체-유래 펩티드가 반응을 하위독점적 종양-유래 에피토프로 제한할 수 있어, DNA 백신에 의해 코딩된 병원체-유래 항원은, CD4+ T 세포 헬프(예컨대, FrC-DOM1 또는 원시 MHC II형 결합 펩티드, 예컨대 파상풍 독소 p30의 단일 도메인)를 제공하는 데 필요한 에피토프를 함유하도록 최소화될 수 있다.

[0318] 이 면역 반응은 본 발명의 면역접합체가 하기의 것들 중 하나 이상을 통해 DC를 동시에 활성화하는 능력에 의해 용이하게 되고 보강된다: (1) 접합체(예컨대, 면역자극 핵산) 내에 도입된 PAMP; (2) 접합체 내에 포함된 손상 관련 분자 패턴(DAMP)(예를 들어, 알라민, 예컨대 LL-37 카텔리시딘); (3) 코딩된 유전자의 발현을 통해 또는 세포성 스트레스 및 손상에 의해 생성되는 내인성 PAMP 또는 DAMP; (4) 코딩된 유전자의 발현을 통해 또는 종양 세포 환경 내 면역 환경을 활성화하는 방관자 효과로서 생성되는 기타 내인성 면역자극 분자.

[0319] 한 실시양태에서, DNA 플라스미드/미니서클 백신의 제제가 본 발명의 접합체에 이용된다. 진그립(GeneGrip) 플라스미드 계열에서 발견되는 특이적 코돈 최적화 병원체-유래 DNA 서열(PA 또는 파상풍 단편 C/DOM1) 및 반복 결합 부위 1 및 2에서의 DNA 서열을 CMVie 프로모터 및 SV40 종결자 벡터를 포함하는 중간체 포유동물의 발현 벡터에 클로닝한다. 서열 확인 후, 전체 발현 카세트(CMV 프로모터, 항원, SV40, 올리고뉴클레오티드 결합 모티프)를 SpeI(5' 말단) 또는 ApaI(3' 말단) 제한 엔도뉴클레아제 부위 특이적 테일을 포함한 PCR 프라이머로 PCR

증폭시킨다. 이어서, PCR 산물을 SpeI 및 ApaI로 분해하여, p2ΦC31 미니서클 벡터의 SpeI 및 ApaI 부위 내에 결찰한다. 이어서, 작제물 p2ΦC31-PA를 E. 콜라이 NM522 세포로 형질전환하여, 재조합 용량에 대해 시험한다. 플라스미드를 함유한 E. 콜라이를 성장시킨 후, 아라비노스(0.25% 최종 농도)를 첨가하여 재조합을 유도한다. 분취량의 배양액을 유도 전(시간 0) 및 유도 후(60분 및 120분)에 취하여, 미니프렙 플라스미드 단리를 행한다. 생성된 플라스미드 프렙을 전기영동하여, 모 플라스미드가 미니플라스미드 및 미니서클로 재조합되었는지의 여부를 결정한다. 재조합은 겔 상에 미니서클 밴드의 존재로 결정할 때 성공적이다. 골격 플라스미드 밴드(미니플라스미드)도 또한 존재하나, 그것의 강도는 경시적으로 감소한다(이는 I-SceI 효소가 플라스미드 골격을 절단하고 세포성 엔도뉴클레아제에 의해 분해되고 있음을 가리킨다).

[0320] DNA 미니서클 백신의 종양 표적화 부분과의 접합. 특이적 DNA 백신의 본 발명에 기재된 종양-표적화 부분에의 접합은 항종양 효능의 다수 인자에서의 향상을 제공한다: (1) DNA 백신의 종양 세포로의 표적 전달, 체류 및 수용체-매개 내재화를 제공한다. 종양 세포 내 코딩된 병원체-유래 항원의 항원은 병원체 항원-반응성 항체가 종양 세포를 탐식하도록 함으로써, ADCC를 증가시키고, DC에 의한 병원체- 및 내인성 종양 항원의 Fc-매개 교차-제시를 가능하게 하고; (2) 항체-DNA 접합체 코딩 종양 세포는 접합체-유래 외인성 및 세포-유래 내인성 면역자극 PAMP 및 DAMP를 통해 종양 세포를 탐식한 DC의 활성화를 증진시킴으로써, 종양 세포에 대한 CD4+ T 헬퍼 세포 및 CD8+ 세포독성 T 세포의 활성화를 용이하게 한다. DC-NK 세포 교차-토크는 또한 항체-접합체 코딩 종양 세포의 보체-매개 용해 및 ADCC를 더욱 폭시키며; (3) 항체/수용체-매개 세포흡수작용을 통한 접합체의 면역자극 분자(면역자극 핵산, PAMP)의 종양 세포 내로의 세포 전달은 B 및 T 세포에 의한 종양 세포의 인식을 위해 종양-유래 항원의 MHC 분자 및 제시의 상향조절을 야기하는 세포 반응을 초래하고; (4) 종양 성장 인자 수용체를 표적으로 하는 항체-접합체는 수용체-매개 종양 세포 생존 및 성장 신호를 차단함으로써, CTL-매개 세포독성에 대한 감수성을 향상시키며; (5) 항체-DNA 백신은 DC에 대한 접합체-결합 아포프토시스 종양 세포의 교차-제시를 가능하게 함으로써, 광위 내인성 종양-유래 항원에 대한 기억 T 세포의 방관자 자극(항원 전착)을 유도한다. 이는 선택된 항원을 발현하지 않는 변이체 종양 세포의 탈피에 의해 제한될 수 있는 효능을 갖는 특이적 선택 종양 펩티드를 전달하거나 발현하는 DNA 백신에 바람직하다.

[0321] 상기 내용은 예시적인 것으로서, 종양 표적화 항체 및 미니서클 DNA 백신의 접합체를 형성하기 위한 제한적 과정이 아니고, 상기 두 부분 모두는 각 항체에 부착되는 플라스미드/미니서클 DNA 카피수가 조절되도록 kg여 서열, 부위 및 방향 특이적 방식으로 직접적으로 커플링됨으로써, 항체의 핵심 작용적 성질 및 DNA 백신의 종양 표적 발현이 유지되도록 한다. 특이적 종양 표적화 항체의 선택 및 DNA 미니서클 내 코딩된 병원체 항원 유전자의 조성은 항종양 요법을 위한 접합체의 상승효과적 기능 성분을 최적화하도록 설계된다. 본 발명에 의해 가능하게 되는 또 다른 핵심 기능은 표적 종양 세포 및 종양 환경 내 코딩된 병원체 항원성 결정자의 발현이고, 특이적 면역 반응은 그러한 가능성으로 인해 촉발된다. 이 특성은 본 발명의 특이적 종양 항체-DNA 백신 접합체를 다른 DNA 백신 및 전달 플랫폼, 예컨대 입자-매개 전달, 유전자 건, 바이러스 또는 세균 벡터 또는 전기천공과 구별되도록 한다.

[0322] 항체-플라스미드/미니서클 DNA 접합체를 합성하기 위한 한 방법으로, 선형 ss 올리고뉴클레오티드[이중 가닥 플라스미드 또는 미니서클 DNA 내 상응하는 ds DNA 서열에 대해 상보적인 (CT)n 또는 (GA)n 반복 모티프를 포함하는 LNA/DNA ODN]가 수퍼코일링된 이중-가닥 미니서클 DNA에 결합된다.

LNA ODN(5'-NH_2-GAGG-CTCTCTCTCTCTC-3'
면역자극 CpG DNA 포스포로티오에이트 골격을 갖는 하이브리드 LNA-DNA:
5' tccatgacgttcctgacgttt CTCTCTCTCTCTC-GGAG-NH_2-3'
5' cggcggataaccgcgagcggttattcgccctacgg CTCTCTCTCTCTC-GGAG-NH_2-3'
(반복 유전자외 회문 - REP 서열; P. 아에루기노사)
:
5' gggggacgatcgtcggggg CTCTCTCTCTCTC-GGAG-NH_2-3'
(A 부류 CpG ODN)

[0323]

[0324] 예를 들어, 플라스미드 내 ODN-결합 부위 대비 최대 4- 내지 40-몰배 과량의 ODN로 하여, 37℃에서 16시간 동안 10 mM 인산염 완충액, 1 mM EDTA(pH 5.8) 중에서 미니서클 DNA를 LNA ODN, 또는 CpG DNA 포스포로티오에이트 골격을 갖는 하이브리드 LNA-DNA ODN과 함께 항온배양하였다. 기재된 바대로(문헌 [Bioconjugate techniques, Hermanson, G. T., Academic Press, 1996, 페이지 456-527] 참조), 한 말단에 아민 반응성 NHS 에스테르를 가지고 다른 한 말단에 술프히드릴 반응성 말레이미드기를 가지는 이종 이중작용적 시약을 사용하여, 항체-DNA 접

합체를 생성시킨다.

[0325] 항체-플라스미드/미니서클 접합체는 뉴클레아제로부터 DNA를 보호하는 것을 촉진하고/하거나, 세포 도입을 용이하게 하고/하거나, DC 활성화를 증진시킬 수 있는 기재된 양이온성 펩티드, 예컨대 알라민 LL-37을 포함할 수 있다.

[0326] 표적화 부분-DNA 백신 접합체의 효과의 분석을 이하와 같이 수행할 수 있다: (1) 표적 종양 세포 내 수용체-매개 세포흡수작용(예를 들어, EGFR+ 또는 HER2+ 세포); (2) 표적 종양 세포 내 관심 유전자-MHC 분자에 의해 제시된 병원체 항원-유래 에피토프(B 또는 T 세포 항원 결정자)의 발현; (3) APC/DC에 의한 옵소닌화 종양 세포의 식세포 작용: TLR 작용자, PAMP에 의한 DC의 활성화; 병원체 항원 CD4+T 세포 및 B 세포 에피토프의 제시; 및 종양 관련 항원의 교차-제시; (4) 병원체 항원-반응성 CD4+ T 헬퍼 세포의 활성화; 교차-제시 종양 항원을 위한 DC에의 헬프; 병원체 항원-반응성 항체의 생성을 위한 B 세포에 대한 헬프; 및 병원체 항원- 또는 종양-반응성 CD8+ T 세포의 활성화 및 생존을 위한 헬프; (5) 종양 세포의 세포 용해: ADCC(병원체 항원-반응성 항체); CD8+ T-세포 매개 세포독성(병원체 항원-반응성 T 세포); 및 CD8+ T 세포 매개 세포독성(종양 항원 반응성 CD8+ T 세포 - 항원 전착을 통함).

[0327] ***B. 피부 표적 조성물***

[0328] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 표적 분자 또는 정상 세포 또는 조직의 성분, 예컨대 피부 내 각질형성세포에 결합하는 하나 이상의 표적화 부분(T)(**조직-표적화 부분**)을 포함한다. 한 실시양태에서, 표적화 부분은 세포 표면 분자 또는 각질형성세포 상의 수용체, 예컨대 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합한다.

[0329] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩하고, 면역 반응을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다.

[0330] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 포함하고, 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩한다.

[0331] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다.

[0332] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다.

[0333] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 HGFR에 대한 항체, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자)(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하고 하기의 것들 중 0개 또는 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (ii) 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP)/알라민(들), (iii) 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, DC 수용 수용체를 위한 리간드/항체, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 포함하는 하나 이상의 면역자극 분자. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 항원/항원성 결정자를 융합 단백질로서 코딩한다. 한 측면에서, 항원의 융합 파트너는 DC에 의한 항원 수용, 면역 인식 및/또는 면역 활성화를 용이하게 한다. 또 다른 측면에서, 융합 파트너는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 분자를 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0334] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 종양 항원/항원성 결정자를 코딩하고 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다: (i) 하

나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, CD4+ T 세포 에피토프), (ii) 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), (ii) 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP)/알라민(들), (iii) 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, DC 수용 수용체를 위한 리간드/항체, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 포함하는 하나 이상의 면역자극 분자. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 종양 항원-함유 융합 단백질을 코딩한다. 한 측면에서, 종양 항원의 융합 파트너는 DC에 의한 항원 수용, 면역 인식 및/또는 면역 활성화를 용이하게 한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 분자를 포함한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(CD4+ T 세포 에피토프)이다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0335] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및/또는 알라민, 및 하기의 것들 중 하나 이상을 포함하는 항원성 펩티드/폴리펩티드의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자, (ii) 하나 이상의 종양 항원 또는 항원성 결정자. 접합체의 한 측면에서, 종양 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자는 알라민에 연결 또는 융합된다(예를 들어, LL37).

[0336] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 피부 세포 표면 수용체(예를 들어, EGFR)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및 하나 이상의 병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 유전자를 포함하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 접합체는 표적화 부분+임의의 PAMP+플라스미드/병원체 항원을 코딩하는 미니서클 DNA를 포함한다.

[0337] 또 다른 실시양태에서, 접합체는 피부 세포 표면 수용체(예를 들어, EGFR)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민 및 하나 이상의 병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 유전자를 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 예를 들어, 접합체는 표적화 부분+임의의 DAMP/알라민+플라스미드/병원체 항원을 코딩하는 미니서클 DNA를 포함한다.

[0338] 또 다른 실시양태에서, 접합체는 피부 세포 표면 수용체(예를 들어, EGFR)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분 및 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 유전자를 포함하는 핵산 분자를 포함한다: 병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프), 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 손상 관련 분자 패턴(DAMP), 알라민. 예를 들어, 접합체는 표적화 부분+병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자를 코딩하는 DNA를 포함하거나; 접합체가 표적화 부분+병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자를 코딩하는 DNA 및 하나 이상의 PAMP, DAMP, 알라민을 포함한다.

[0339] 또 다른 실시양태에서, 접합체는 피부 세포 표면 수용체(예를 들어, EGFR)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분, 하나 이상의 종양 항원 및 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 유전자를 포함하는 핵산 분자를 포함한다: 병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프), 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 손상 관련 분자 패턴(DAMP), 알라민. 예를 들어, 접합체는 표적화 부분+종양 항원을 코딩하는 DNA+병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자, DAMP, 알라민를 포함한다.

[0340] 한 실시양태에서, 본 발명은 피부 세포 표면 수용체(예를 들어, EGFR)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분 및 핵산 분자를 포함한 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및 하나 이상의 병원체 또는 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 유전자를 포함한다.

[0341] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 피부 세포 표면 수용체(예를 들어, EGFR)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)/알라민, 및 하나 이상의 병원체 또는 병원체-유래 또는 종양 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 유전자를 포함하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다. 예를 들어, 접합체는 표적화 부분+임의의 PAMP/알라민+플라스미드/종양 항원을 코딩하는 미니서클 DNA을 포함하거나; 접합체가 표적화 부분+임의의 PAMP/알라민+플라스미드/종양 항원 및 병원체 항원을 코딩하는 미니서클 DNA를 포함한다.

[0342] 어느 하나의 작용 기전에도 국한되고자 의도하지 않으면서, 이하는 본 발명의 접합체에 관한 한 작용 방식이다:

(a) 미니서클/플라스미드 DNA의 표적 피부 세포(각질형성세포)로의 EGFR 수용체-매개 결합, 및 피부 내 DNA의 체류/고정화; (b) 각질형성세포에서의 수용체-매개 세포흡수작용 및 표적 내 미니서클 코딩된 관심 유전자 - 예를 들어, MHC 분자에 의해 제시된 플라스모듐 에피토프(CSP-1 항원 유래 B 또는 T 세포 항원 결정자)의 발현; (c) 피부(랑게르한스 세포)에서의 APC/DC에 의한 접합체-옵소닌화 각질형성세포의 작용: (i) DNA 코딩된 병원체 항원 또는 종양 항원 에피토프(T 세포 및 B 세포 에피토프)의 항체 Fc-DC Fc 수용체 상호작용-매개 제시 - 간접적 항원 교차-제시; (ii) 미니서클의 수용 - APC 내 관심 유전자의 발현(T 세포 및 B 세포 에피토프) - 직접적 제시; (iii) TLR 작용자, PAMP, DAMP, 알라민(접합체-유래 및 내인성)에 의한 DC의 활성화; (iv) 병원체 항원- 또는 종양 항원 유래 에피토프(예를 들어, 다중 CSP-1 에피토프)를 인식하는 항원-반응성 T 세포 및 B 세포의 활성화.

[0343] 한 실시양태에서, 접합체는 EGFR-표적 부분 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 플라스미드/미니서클을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 접합체는 각질형성세포 상의 인간 표피 성장 인자 수용체를 표적으로 하는 항체(항-EGFR Ab: 예를 들어 세툭시맙, 니모투주맙, 파니투무맙) 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 미니서클을 포함한다. 다른 한 추가 실시양태에서, 접합체는 각질형성세포 상의 인간 표피 성장 인자 수용체를 표적으로 하는 압타머(항-EGFR DNA 또는 RNA 압타머) 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 미니서클을 포함한다. 추가로, 표적화 부분은 EGFR-표적 펩티드 및 병원체 항원-유래 유전자를 코딩하는 DNA 미니서클일 수 있다.

[0344] DNA 플라스미드 및 미니서클 코딩된 병원체 항원-유래 유전자의 예가 본원에 제공되어 있다. 한 실시양태에서, 코딩된 항원은 플라스모듐(말라리아 항원)으로부터의 포자소체주위 단백질(CSP-1)이다. 한 추가 실시양태에서, 그러한 접합체를 투여하여, DNA 백신접종에 말라리아 CSP-p28 작제물을 제공할 수 있다. 말라리아 포자소체주위 단백질(CSP)은 포자소체의 주요 표면 단백질이고, 말라리아의 보호 마우스 모델을 제공하는 것으로 나타났다. Bergmann-Leitner 등(포자소체주위 단백질에 접합된 C3d-한정 보체 수용체-결합 펩티드 p28은 플라스모듐 베르게이(Plasmodium berghei)에 대한 보호를 제공한다. 문헌 [Vaccine 25(45), 2007])은, 3개 카피의 C3d 보체 수용체 결합 펩티드 p28과 함께 CSP를 코딩하는 DNA 백신이 P. 베르게이 감염의 마우스 모델에서의 챌린지에 대한 보호를 유도함을 입증하였다. 이 백신은 EGFR 항체에 직접적으로 접합되어, 본원에 포함되는 접합체를 형성한다. 이에 따라, 이 유형 표적 각질형성세포 및 코딩된 항원-p28 융합 단백질의 접합체는 DC 수용 수용체를 표적으로 할 수 있다.

[0345] 추가 실시양태들에서, 코딩된 항원은 플라스모듐으로부터의 분열소체(Merozoite) 항원; 바실러스 안트라시스 보호 항원(PA); 마이코박테리움 결핵 항원; 쉬겔라 IpaB 및 IpaC; 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이들의 조합이다. 병원성 항원의 확장 목록이 당업계에 알려져 있고, 그러한 항원은 본 발명의 범주 내에 용이하게 사용될 수 있다.

[0346] 본 발명의 또 다른 측면에서, EGFR-표적 부분, 및 하나 이상의 종양 항원 또는 종양 관련 항원을 코딩하는 DNA 플라스미드/미니서클의 접합체가 포함된다.

[0347] 한 실시양태에서, 접합체는 각질형성세포 상의 인간 표피 성장 인자 수용체를 표적으로 하는 항체(항-EGFR Ab: 예를 들어 세툭시맙, 니모투주맙, 파니투무맙), 및 종양 항원 또는 종양 관련 항원을 코딩하는 DNA 미니서클을 포함한다. 추가 실시양태들에서, 표적화 부분은 본원에 개시된 임의의 변형체(예를 들어, 압타머, 펩티드)일 수 있다.

[0348] 종양 항원 또는 종양 관련 항원의 확장 목록이 당업계에 알려져 있고, 그러한 항원은 본 발명의 범주 내에 사용될 수 있다. 그러한 항원의 일부 비제한적 예에는 암-고환 항원, 예컨대 MAGE-1, BAGE, GAGE-1, NY-ESO-1; 계통 특이적 항원: 예를 들어 멜라닌세포 항원(티로시나제, MART-1, gp100); 종양-특이적 변경된 유전자 산물(증폭, 이상 발현, 과발현 또는 돌연변이화 유전자, 스플라이스 변이체, 유전자 융합 산물): 예를 들어, HER2/neu, p53, Ras 유전자-KRAS2, HRAS, NRAS, 뮤신-1, 베타 카테닌, MUM1, CDK4, 생존하는 BCR-ABL 융합 산물, TERT, CEA, AFP, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V; B-세포 악성종양에서의 면역글로불린 이디오타입; 바이러스 암 항원; 예를 들어 인간 유두종 바이러스로부터의 HPV E6 및 E7 항원, 단지 몇가지 예로서는 EBV LMP1 및 LMP2가 포함된다. 한 추가 실시양태에서, 하나 이상의 종양 항원은 병원체-유래 항원성 결정자(예컨대, 파상풍 FrC 또는 DOM1)의 융합 파트너로서 또는 다운스트림으로 DNA 미니서클에서 코딩되어, (상기 종양 표적화 접합체에 대해 언급한 바와 같이) CD4+ T 세포 헬프를 제공할 수 있다.

[0349] 상기 접합체를 제조하는 한 예시적 방법은 이하와 같다: 통상적 미니서클 단리 기법을 이용하여 바실러스 안트라시스 보호 항원(PA)을 코딩하는 DNA 플라스미드/미니서클을 단리하고; 코돈 최적화를 이용하여 포유동물의 세

포(DNA 2.0) 내 효율적 발현을 위해 B. 안트라시스 보호 항원(PA)에 대한 DNA 서열을 최적화한다. 또 다른 실시양태에서, DNA 플라스미드/미니서클은 포자소체주위 단백질(CSP-1)을 코딩하고, 또한 포유동물의 세포 내 발현을 위해 코돈 최적화된다. 또한, 당업계에 알려지고 본원에 개시된 조직/세포-특이적 프로모터를 이용하여, 발현을 조절할 수 있다.

[0350] DNA 백신 설계 및 근거: 병원체- 또는 종양 항원-유래 서열을 포함한 DNA 백신을 EGFR 표적 부분에 접합함으로써, 표적 각질형성세포 내 상기 항원성 결정자의 발현, 및 항원성 물질(병원체-유래 및 종양 항원-유래 항원)의 표적 각질형성세포를 탐식한 APC로의 간접적 전달(교차-제시; APC FcR 상에서의 Fc 수용체와의 항체 Fc 상호작용을 통해 용이하게 됨)이 초래된다. 항체-DNA 백신의 일부는 직접적으로 수용되어, APC에 의해 발현된다. 그러한 교차-제시 및 병원체- 또는 종양-유래 항원의 직접적 제시는 효과적인 T-세포 헬프를 제공하고, 하기 면역반응을 초래할 수 있다:

[0351] 병원체 항원- 및 종양 항원-특이적 항체의 유도: 본 발명의 항체-DNA 접합체는 DC(탐식된 옵소닌화 각질형성세포 및/또는 백신 내 공동코딩/융합된 항원으로부터의 DC)에 의한 병원체 또는 종양 항원의 교차-제시 및 표적 각질형성세포 내 병원체 항원의 발현을 가능하게 한다. 항체-DNA 접합체는 접합체-유래 외인성 및 세포-유래 내인성 면역자극 PAMP 및 DAMP를 통해 상기 항원을 제시하는 DC의 활성을 증진시킴으로써, 항원 반응성 CD4+ T 헬퍼 세포 및 CD8+ 세포독성 T 세포의 활성화를 용이하게 한다. DC에 의해 자극된 병원체 항원-특이적 T_H 세포는, (CD40-CD40 리간드 상호작용 및 사이토카인 생산을 통해) 교차-제시된 항원에 대한 항체를 생산하기 위해 B 세포를 프라이밍하고 증강시킬 수 있다.

[0352] 병원체 항원- 또는 종양-반응성 세포독성 T 세포의 유도: 미생물 항원 또는 기타 비자가 항원을 코딩하는 항체-DNA 백신을 사용하여, 광위의 다른 식의 약종양 항원에 대한 CD8+ T 림프구(CTL) 면역 반응을 개시하고 증폭시킬 수 있다. 예를 들어, 파상풍 FrC-특이적 T_H 세포는 DC가 양 FrC 및 종양 항원을 교차-제시하도록 하여, 약종양 항원에 대한 CD8+ T 세포 반응을 프라이밍하고 증강시키도록 한다. 면역독점적 병원체-유래 펩티드가 반응을 하위독점적 종양-유래 에피토프로 제한할 수 있어, 항종양 DNA 백신에 의해 공동코딩된 병원체-유래 항원은, CD4+ T 세포 헬프(예컨대, FrC-DOM1 또는 원시 MHC II형 결합 펩티드, 예컨대 파상풍 독소 p30의 단일 도메인)를 제공하는 데 필요한 에피토프를 함유하도록 최소화될 수 있다.

[0353] DNA 플라스미드/미니서클 백신의 제형: 진그립 플라스미드 계열에서 발견되는 3개 카피의 C3d 보체 수용체 영역 p28을 가지거나 가지지 않는 특이적 코돈 최적화 병원체-유래 DNA 서열(PA 또는 CSP를 코딩하는 DNA 미니서클) 및 반복 결합 부위 1 및 2에서의 DNA 서열을 CMVie 프로모터 및 SV40 종결자 벡터를 포함하는 중간체 포유동물의 발현 벡터에 클로닝한다. 서열 확인 후, 전체 발현 카세트(CMV 프로모터, 항원, SV40, 올리고뉴클레오티드 결합 모티프)를 SpeI(5' 말단) 또는 ApaI(3' 말단) 제한 엔도뉴클레아제 부위 특이적 테일을 포함한 PCR 프라이머로 PCR 증폭시킨다. 이어서, PCR 산물을 SpeI 및 ApaI로 분해하여, p2ΦC31 미니서클 벡터의 SpeI 및 ApaI 부위 내에 결찰한다. 이어서, 작제물 p2ΦC31-PA를 E. 콜라이 NM522 세포로 형질전환하여, 재조합 용량에 대해 시험한다. 플라스미드를 함유한 E. *콜라이*를 성장시킨 후, 아라비노스(0.25% 최종 농도)를 첨가하여 재조합을 유도한다. 분취량의 배양액을 유도 전(시간 0) 및 유도 후(60분 및 120분)에 취하여, 미니프렙 플라스미드 단리를 행한다. 생성된 플라스미드 프렙을 전기영동하여, 모 플라스미드가 미니플라스미드 및 미니서클로 재조합되었는지의 여부를 결정한다. 재조합은 겔 상에 미니서클 밴드의 존재로 결정할 때 성공적이다. 골격 플라스미드 밴드(미니플라스미드)도 또한 존재하나, 그것의 강도는 경시적으로 감소한다(이는 I-SceI 효소가 플라스미드 골격을 절단하고, 세포성 엔도뉴클레아제에 의해 분해되고 있음을 가리킨다).

[0354] DNA 플라스미드/미니서클 백신의 EGFR 표적화 부분과의 접합. 본 발명에 기재된 DNA 백신/EGFR-표적화 부분의 접합체는 면역학적 효능의 다수 인자에서의 향상을 제공한다: (1) DNA 백신의 각질형성세포로의 표적 전달, 체류 및 수용체-매개 내재화, 및 각질형성세포 내 코딩된 병원체- 또는 종양-유래 항원의 발현을 가능하게 하고; (2) 접합체 옵소닌화 각질형성세포의 식세포 작용은 DC에 의한 병원체- 및 종양 항원의 Fc-매개 교차-제시 및 DC 내 접합체 코딩 유전자의 직접적 발현 및 제시를 용이하게 하며; (3) 항체-DNA 접합체 코팅 종양 세포는 접합체-유래 외인성 및 세포-유래 내인성 면역자극 PAMP 및 DAMP를 통해 종양 세포를 탐식한 DC의 활성화를 증진시킴으로써, 제시된 항원에 대한 CD4+ T 헬퍼 세포 및 B 세포 및 CD8+ 세포독성 T 세포의 활성화를 용이하게 한다.

[0355] 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 접합체를 미니서클에 커플링하는 데 사용되는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 그러한 올리고뉴클레오티드에는 [이중 가닥 플라스미드 또는 미니서클 DNA 내 상응하는 ds DNA 서열에 대해 상보적인 (CT)n 또는 (GA)n 반복 모티프를 포함하는 LNA/DNA ODN]를 수퍼코일링된 이중-가닥 미니서클 DNA에

결합한 선형 ss 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 그러한 올리고뉴클레오티드의 예에는 LNA ODN(5'-NH_2-GAGG-CTCTCTCTCTCTC-3'); CpG DNA 포스포로티오에이트 골격을 갖는 하이브리드 LNA-DNA ODN: 5'-tccatgacgttcctgacgttt CTCTCTCTCTCTC-GGAG-NH_2-3'; 5' cggcggataaccgcgagcggttattcgccctacgg CTCTCTCTCTCTC-GGAG-NH_2-3'(반복 유전자외 회문-REP 서열; P. 아에루기노사); 또는 5' gggggacgatcgtcgggggg CTCTCTCTCTCTC-GGAG-NH_2-3'(A 부류 CpG ODN)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0356] 예를 들어, 플라스미드 내 ODN-결합 부위 대비 최대 4- 내지 40-몰배 과량의 ODN로 하여, 37℃에서 16시간 동안 10 mM 인산염 완충액, 1 mM EDTA(pH 5.8) 중에서 미니서클 DNA를 LNA ODN, 또는 CpG DNA 포스포로티오에이트 골격을 갖는 하이브리드 LNA-DNA ODN과 함께 항온배양하였다. 기재된 바대로(문헌 [Bioconjugate techniques, Hermanson, G. T., Academic Press, 1996, 페이지 456-527] 참조), 한 말단에 아민 반응성 NHS 에스테르를 가지고 다른 한 말단에 술프히드릴 반응성 말레이미드기를 가지는 이종 이중작용적 시약을 사용하여, 항체-DNA 접합체를 생성시킨다.

[0357] 한 추가 실시양태에서, 항체-플라스미드/미니서클 접합체는, 뉴클레아제로부터 DNA를 보호하는 것을 촉진하고/하거나, 세포 도입을 용이하게 하고/하거나, DC 활성화를 증진시킬 수 있는 기재된 양이온성 펩티드, 예컨대 알라민 LL-37을 포함할 수 있다.

[0358] 표적화 부분-DNA 백신 접합체의 효과를 이하와 같이 분석할 수 있다: (a) 표적 세포 내 EGFR 매개 세포흡수작용(예를 들어, 각질형성세포); (b) 각질형성세포 내 관심 유전자 - MHC 분자에 의해 제시된 병원체 항원-유래 에피토프(B 또는 T 세포 항원 결정자)의 발현; (c) APC/DC에 의한 옵소닌화 각질형성세포의 식세포 작용: (i) 접합체-유래 PAMP, DAMP에 의한 DC의 활성화; (ii) 병원체 항원 CD4+T 세포 및 B 세포 에피토프의 제시; 및 (iii) 종양 관련 항원의 교차-제시; (d) 병원체 항원-반응성 CD4+ T 헬퍼 세포의 활성화: (i) 교차-제시 종양 항원을 위해 DC에 헬프를 제공하고; (ii) 병원체 항원-반응성 항체를 생산하기 위해 B 세포에 헬프를 제공하며; (iii) 병원체 항원- 또는 종양-반응성 CD8+ T 세포의 활성화 및 생존을 위한 헬프를 제공함.

[0359] ***C. APC/DC 표적화 조성물***

[0360] 한 실시양태에서, 본 발명은 조직-표적화 부분, 예컨대 EGFR에 대한 항체, 하나 이상의 핵산 분자(들), 및 하나 이상의 펩티드/폴리펩티드의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같이(주: 0030, 0031), 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고/하거나, 항원-특이적 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 접합체의 각종 실시양태들에서, 펩티드/폴리펩티드는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체 및/또는 종양 항원 또는 항원성 결정자, (ii) 알라민, (iii) DC 결합 분자(예를 들어, DC 수용 수용체의 리간드). 한 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 펩티드/폴리펩티드는 상호 간에 및/또는 핵산 결합 펩티드(예를 들어 양이온성 펩티드, 프로타민, HIV-tat, 아르기닌- 또는 히스티딘-풍부 서열, LL-37, 핵 국지화 펩티드)에 융합/연결될 수 있다.

[0361] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 정상 면역 세포 또는 조직, 예컨대 항원 제시성 세포 또는 수지상 세포의 표적 분자 또는 성분에 결합하는 하나 이상의 표적화 부분(T)(***APC/DC-표적화 부분***)을 포함한다. 한 실시양태에서, 표적화 부분은 수지상 세포 수용 수용체, 예컨대 DEC-205에 결합한다.

[0362] 한 실시양태에서, 본 발명은 항원 제시 세포(APC)/수지상 세포(DC)를 표적으로 하는 항체 또는 기타 부분, 예컨대 관심 유전자를 코딩하는 DC 수용 수용체 및 핵산 분자를 포함한 접합체를 포함한다.

[0363] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분 및 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 산물(예를 들어, 핵산, 예컨대 RNA, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 펩티드)을 코딩하고, 면역 반응을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 면역자극 모티프를 포함하고, 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 산물을 코딩한다.

[0364] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 예컨대 DEC-205에 대한 항체 및 하나 이상의 핵산 분자의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 포함하고, 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0365] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및 하나 이상의 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다.

[0366] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 손상 관련 분자 패턴(DAMP) 또는 알라민 및 하나 이상의 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하는 핵산 분자의 접합체를 포함한다.

[0367] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 및 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 코딩하고 하나 이상의 면역자극 분자, 예컨대 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자(들)의 접합체를 포함한다. 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 항원/항원성 결정자를 융합 단백질로서 코딩한다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 접합체는 하나 이상의 병원체-유래 항원 또는 항원성 결정자를 포함한 하나 이상의 펩티드를 추가로 포함한다.

[0368] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 및 하나 이상의 종양 항원을 코딩하고 하기의 것들 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자의 접합체를 포함한다: (i) 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 하나 이상의 항원 또는 항원성 결정자(예를 들어, CD4+ T 세포 에피토프), (ii) 하나 이상의 면역자극 분자, 예컨대 항원 제시 세포 또는 수지상 세포 또는 기타 면역 세포(예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포)를 동원, 결합, 활성화, 성숙화 및/또는 증식시키는 분자 및 면역 억제를 중화하는 분자(예를 들어, 면역자극 사이토카인, 케모카인, 공동자극 분자, 성장 인자). 한 관련 실시양태에서, 핵산 분자는 하나 이상의 종양 항원을 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(CD4+ T 세포 에피토프)와의 융합 단백질로서 코딩한다. 또 다른 예에서, 융합 파트너는 알라민이다. 한 관련 실시양태에서, 본원에 기재된 표적화 부분-핵산 접합체(들)는 추가로 하나 이상의 PAMP 및/또는 하나 이상의 DAMP/알라민(들)을 포함한다. 한 측면에서, 접합체는 하나 이상의 병원체-유래 또는 종양 항원 또는 항원성 결정자를 포함한 하나 이상의 펩티드를 추가로 포함한다.

[0369] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 및/또는 하나 이상의 알라민, 및 하나 이상의 종양 항원 및/또는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 포함한 하나 이상의 항원성 펩티드의 접합체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항원성 펩티드는 표적화 부분에 융합되거나 그 안에 도입된다. 또 다른 측면에서, 항원성 펩티드는 알라민에 융합된다(예를 들어, LL-37).

[0370] 한 실시양태에서, 본 발명은 APC/DC-표적화 부분, 하나 이상의 핵산 분자 및 하나 이상의 항원성 펩티드의 접합체를 포함하는데, 여기에서 핵산 분자는 하나 이상의 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 포함하고, 항원성 펩티드는 종양 항원 및/또는 하나 이상의 병원체(들), 미생물(들) 또는 바이러스(들)로부터 유래된 항원 또는 항원성 결정자(T 또는 B 세포 에피토프)를 포함한다. 한 실시양태에서, 항원성 펩티드는 표적화 부분에 융합되거나 그 안에 도입된다. 접합체의 한 관련 실시양태에서, 항원성 펩티드는 핵산 결합 펩티드(예를 들어, 양이온성 펩티드, NLS, Tat, 프로타민, His6, Arg9, LL-37)에 융합된다. 또 다른 측면에서, 항원성 펩티드는 DC 수용 수용체를 표적으로 하는 펩티드 모티프에 융합된다. 한 측면에서, 항원성 펩티드는 표적화 부분에 융합되거나 그 안에 도입된다. 또 다른 측면에서, 항원성 펩티드는 알라민에 융합된다.

[0371] DC와 관련된 작용 기전의 한 비제한적 예는 이하와 같다. 수지상 세포는 흡수성 세포흡수작용에 의한 항원의 효율적이고 특이적인 포획을 위한 광위의 수용 수용체를 가진다. DC는 포획된 항원을 가공하고, 그것을 일차적으로 펩티드-주조직적합성 복합체(MHC) 분자 복합체로서 제시하여 T 세포의 특이적 활성화를 수행한다. 이 과정은 환경 자극, 예컨대 패턴 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 내인성 자극, 예컨대 알라민의 인식에 의한 환경 자극에 의한 DCD의 활성화 및 성숙을 요한다. 본 발명의 접합체는 (항원 제시를 위한) 항원 유전자 발현과 (커플링된 또는 코딩된 PAMP/DAMP에 의한) DC 활성화/성숙 모두가 동시에 일어날 수 있도록 함으로써, 생체내 또는 체외 항원 특이적 면역 세포를 활성화하는 능력을 증진시킬 수 있다.

[0372] 그러므로, 접합체는 하기 작용 기전을 가지는 다중작용적 분자이다: (a) 수지상 세포 내 DC 수용체-매개 수용/

세포흡수작용; (b) DC 내 관심유전자 - MHC 분자에 의해 제시된 종양 또는 병원체 에피토프 또는 융합 산물(항원 유래 B 또는 T 세포 항원 결정자)의 발현; (c) T 또는 B 세포 에피토프의 제시, 및 APC/DC의 동시 활성화: (i) 코딩되거나 연결된 PAMP, DAMP/알라민에 의한 TLR의 활성화; (ii) T 세포 및 B 세포 에피토프의 제시; 및 (iii) 항원 에피토프를 인식하는 항원-반응성 T 세포 및 B 세포의 활성화.

[0373] 각종 실시양태들에서, DC 표적화 부분은 DC 수용 수용체, 예컨대 하기의 것들을 표적으로 하는 항체, 압타머, 펩티드 또는 리간드를 포함할 수 있다: C-형 렉틴 유사 수용체: DC-SIGN(수지상 세포-특이적 ICAM-3을 잡는 비인테그린), MMR(MRC1)(대식세포 만노스 수용체), DEC-205(LY75)(항-DEC-205 항체에 의해 결찰됨), BDCA-2(혈액 수지상 세포 항원)(C형 렉틴 수퍼패밀리 CLECSF11), 란제린 또는 덱틴-1; Fc 수용체: (면역 복합체 및 옵소닌화 세포에 의해 결찰됨), FcgRI(CD32), FcgRII(CD64); 인테그린: (아포프토시스 세포 및 옵소닌화 항원에 의해 결찰됨), aVb5, aMb2(CD11b/CD18, 보체 수용체 3-CR3) 또는 aXb2(CD11c/CD18, 보체 수용체 4-CR4); 스캐빈저 수용체: (아포프토시스 세포 및 열 충격 단백질(hsp)-펩티드 복합체에 의해 결찰됨), CD36, LOX-1 저밀도 지질단백질, 산화된, 수용체-1(OLR1); 또는 CD91, 아쿠아포린. 예를 들어, DEC-205, Fcg 수용체, aVb5 인테그린, CD36, LOX-1 및 CD91을 통한 항원 수용은 모두 교차-제시와 관련되었다.

[0374] DC 표적화 부분이 알려져 있고, 본 발명의 범주 내에 이용될 수 있다. 한 실시양태에서, DC 표적화 부분은 DC에서 고수준으로 발현되는 세포흡수작용 수용체인항-DEC205:DEC-205(NLDC-145)이다.

[0375] 항체는 통상적 기법을 이용하여 제조될 수 있다. DC 표적화 펩티드(예를 들어, p28). CSd-한정 보체 수용체-결합 펩티드 p28을 사용하여, 본 발명의 DNA-항체 접합체를 제조한다.

[0376] 접합체의 합성에 사용되는 DNA 백신은 선형 또는 원형 플라스미드, 미니서클 DNA 또는 MIDGE를 포함할 수 있다. DNA 백신에 의해 코딩되는 특이적 유전자는 하기의 것들로부터 선택된다: DNA 플라스미드 또는 미니서클에 의해 코딩되는 병원체 항원-유래 유전자; 플라스모듐(Plasmodium)(말라리아 항원): 기생충; 바실러스 안트라시스 보호 항원(PA): 그램 양성 세균; 마이코박테리움 결핵 항원: 마이코박테리움; 쉬겔라 IpaB 및 IpaC: 그램 음성 세균; 인플루엔자 바이러스 항원: 바이러스로부터의 포자소체주위 단백질(CSP-1) 또는 분열소체 단백질.

[0377] DNA 플라스미드 또는 미니서클에 의해 코딩되는 종양 항원 및 종양 관련 항원(명세서 내 전체 목록)에는, 암-고환 항원; 예를 들어 MAGE-1, BAGE, GAGE-1, NY-ESO-1; 계통 특이적 항원; 예를 들어 멜라닌세포 항원(티로시나제, MART-1, gp100); 종양-특이적 변경 유전자 산물(증폭, 이상 발현, 과발현 또는 돌연변이화 유전자, 스플라이스 변이체, 유전자 융합 산물), 예를 들어 HER2/neu, p53, Ras 유전자-KRAS2, HRAS, NRAS, 뮤신-1, 베타 카테닌, MUM1, CDK4, BCR-ABL 융합 산물, 생존, TERT, CEA, AFP, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V; B-세포 악성종양에서의 면역글로불린 이디오타입; 바이러스 암항원; 예를 들어 인간 유두종 바이러스로부터의 HPV E6 및 E7 항원, 단지 몇가지 예로서는 EBV LMP1 및 LMP2가 포함된다. 한 추가 실시양태에서, 종양 항원은 병원체-유래 항원성 결정자(예컨대, 파상풍 FrC 또는 DOM1)의 융합 파트너로서 또는 다운스트림으로 DNA 미니서클에서 코딩되어, (상기 종양 표적화 접합체에 대해 언급한 바와 같이) CD4+ T 세포 헬프를 제공할 수 있다.

[0378] 또 다른 실시양태에서, 시험관내 하나 이상의 세포를 종양 세포의 세포 성분, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경의 성분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩티드 또는 표적화 부분을 포함하는 시험 핵산 접합체와 접촉시키는 단계(여기에서, 항체 또는 펩티드 또는 표적화 부분은 하나 이상의 면역자극 핵산 서열(INAS)을 포함한 핵산에 접합되고, 핵산 서열 중 하나 이상은 면역 세포를 활성화할 수 있는 병원체-관련 분자 패턴(PAMP) 또는 기타 모티프를 포함함); 및 면역 세포의 존재 또는 부재 하에 하나 이상의 세포의 표현형 변화 또는 마커의 유도를 결정하는 단계(여기에서, 시험 항체/펩티드-핵산 접합체의 존재 하에서의 결정된 유도 또는 변화는 면역 세포 활성화/성숙, 표적 세포 시그널링의 조절 및 표적 세포사를 가리킴)를 포함하는, 면역 세포 활성화/성숙 및 표적 세포사를 유도하는 핵산 접합체의 동정 방법이 개시된다.

[0379] 또 다른 측면에서, 항체-핵산 접합체는 바이러스, 세균, 마이코박테리움, 스피로헤타균, 진균, 리케챠균, 마이코플라즈마, 클라미디아균, 원생동물군 및 후생동물 기생충 또는 연충을 포함한 감염성 미생물 또는 병원성 미생물로부터의 유래된 항원과 추가로 접합된다.

[0380] **IV. 방법**

[0381] 본 발명의 각종 측면들에서, 본 발명의 조성물은 질병 증상의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여된다. 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 그것의 표적화 부분 및 활성제에 기초하여 선택된다. 상기 본원에 기재된 바와 같이, 치료 또는 예방하고자 하는 특정 질병에 기초하여 식 $T\text{-}A_1\text{-}A_2$ 또는 그것의 변형체가

사용된다.

[0382] 예를 들어, 질병 증상은 췌장암이고, 종양 항원 및/또는 췌장 세포 성분, 하나 이상의 면역자극 핵산 분자(예를 들어, PAMP, DAMP, 알라민 및 대안적으로 항원성 폴리펩티드)에 대해 선택적인 표적화 부분을 포함한다. 또 다른 예에서, 면역접합체는 항원성 폴리펩티드, 공동자극성 폴리펩티드 또는 양자 모두를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 표적화 부분에 커플링된 미니서클)를 추가로 포함할 수 있다.

[0383] 각종 실시양태들에서, 접합체를 포함하는 핵산 서열은 (뉴클레아제 또는 리소좀 분해에 저항하도록) 안정하거나/안정화되어, 면역계에 의한 그것의 전달 및 인식을 용이하게 할 수 있다.

[0384] "안정한" 또는 "안정화된 핵산 분자"는 (예를 들어, 엑소- 또는 엔도-뉴클레아제를 통한) 생체내 분해에 대해 비교적 내성인 핵산 분자를 의미한다. 안정화는 길이 또는 이차 구조의 함수일 수 있다. 보다 짧은 면역자극 핵산 분자의 경우, 이차 구조는 안정화하거나 그 효과를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자의 3' 말단이 업스트림 영역에 대해 자가-상보성을 가져 접혀서 일종의 줄기 루프 구조를 형성할 수 있는 경우, 핵산 분자는 안정화되게 되며, 이로써 더욱 활성을 가지게 된다.

[0385] 한 측면에서, 본 발명의 안정화된 핵산 분자는 변형 골격을 가진다. 면역 자극에 사용하는 경우, 안정화된 핵산 분자는 포스포로티오에이트(즉, 핵산 분자의 적어도 하나의 인산염 산소는 황으로 치환됨) 또는 포스포로디티오에이트 변형 핵산 분자를 포함할 수 있다. 더욱 특히, 인산염 골격 변형은 핵산의 5' 말단, 예를 들어 핵산의 5' 말단의 첫 번째 두 뉴클레오티드에서 일어난다. 또한, 인산염 골격 변형은 핵산의 3' 말단, 예를 들어 핵산의 3' 말단의 마지막 5개의 뉴클레오티드에서 일어날 수 있다. 본원에 추가로 보고되는 바와 같이, 핵산 분자를 안정화하는 것에 부가하여, 포스포로티오에이트-변형 핵산 분자(포스포로디티오에이트-변형 포함)는 핵산 분자의 면역 자극 정도를 증가시킬 수 있다.

[0386] 다른 안정화된 핵산 분자에는 비이온성 DNA 유사체, 예컨대 알킬- 및 아릴-포스폰산염(하전된 포스포산염 산소가 알킬기 또는 아릴기로 치환되어 있음), 및 하전된 산소 부분이 알킬화된 포스포디에스테르 및 알킬포스포트리에스테르가 포함된다. 한 말단 또는 양 말단에 디올, 예컨대 테트라에틸렌글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜을 함유하는 핵산 분자는 또한 뉴클레아제 분해에 대해 실질적으로 내성을 가지는 것으로 나타났다. 한 측면에서, 핵산 분자는 펩티드 결합(즉, 펩티드 핵산:PNA)을 가진다.

[0387] 본 발명의 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 생체내 핵산의 안정화를 위한 다른 방법이 알려져 있고, 예컨대 미국 특허 제7,223,741호; 제7,220,549호; 제6,239,116호; 제6,379,930호; 제6,406,705호; 제6,218,371호; 제6,429,199호; 제6,55,206호; 제6,271,206호; 미국 특허출원 공보 제20070161590호; 제20070135372호; 제20070078104호; 제20070065467호; 제20070037767호; 제20060240093호; 제20060211639호; 제20060172966호; 제20060008910호; 및 제20050191342호에 개시되어 있다.

[0388] **커플링**

[0389] 본 발명의 각종 실시양태들에서, 본 발명의 조성물에 포함된 하나 이상의 성분은 공유 또는 비-공유 연결기를 통해 함께 커플링될 수 있다. 핵산 분자를 다른 핵산 분자에, 핵산 분자를 펩티드 또는 폴리펩티드에, 또한 펩티드/폴리펩티드를 다른 펩티드/폴리펩티드에 커플링하는 각종 통상적 방법이 당업계에 알려져 있다. 비-공유 커플링은 수소 결합, 이온적 상호작용, 반데르발스 상호작용 및 소수성 결합을 통한 것일 수 있다.

[0390] 또한, 활성 제제의 공유 커플링을 위한 각종 화학작용을 이용하는 각종 방법들이 알려져 있다. 그러한 활성 제제는 항체, 폴리펩티드 및 핵산과 같은 표적화 부분, 및 활성 제제를 선택된 표적 세포에 지정하기 위한 기타 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 활성 제제는 각종 입상 담체에 접합되어, 혈청 분해로부터 보호되는 리포좀, 미셀 및 나노입자로 캡슐화되었다.

[0391] 예를 들어, 플라스미드/미니서클 결합-올리고뉴클레오티드(3' 또는 5' 말단)의 접합이 표적화 부분, 예컨대 항체에 대해 수행될 수 있다. 한 말단 상에 아민 반응성 NHS 에스테르를 가지고 다른 말단에 술프히드릴 반응성 말레이미드기를 가지는 이종 이중작용적 시약을 사용하여, 항체-DNA 접합체를 생성시킨다. 상기 작용기를 가공하는 교차-연결 시약을 사용하여 접합체(예를 들어, SMCC 또는 술포-SMCC)를 합성할 수 있다. 이는 아민 반응성 NHS 에스테르 말단을 통해 DNA 또는 항체가 활성화되도록 하고, 이는 말레이미드-활성화된 중간체를 생성시킨다. 중간체 종은 접합하고자 하는 두 번째 분자와 혼합하기 전에 과잉 교차-링커 및 반응 부산물로부터 정제 분리한다. 이 공정의 다단계 성질은 접합된 단백질의 중합을 제한하고, 교차-연결의 정도 및 부위에 대한 조절을 제공한다. SMCC에 의한 DNA 활성화 및 항체 분자와의 후속 접합을 수반하는 프로토콜에서, 하기 선택을 통해 술프히드릴기의 도입에 의해 DNA에 말레이미드기를 커플링하기 위한 항체가 제조된다: (a) 2-머캅토에틸아

민 또는 디티오트레이톨(DTT)로 IgG 구조의 힌지 영역 내 이황화물 잔기가 환원되어 유리 술프히드릴기가 환원될 수 있고; (b) 티올화 시약을 사용하여, 온전 항체가 술프히드릴기를 함유하도록 변형시킬 수 있다(예를 들어, SATA 및 트라우트 시약; 2-이미노티올란)(문헌 [Bioconjugate techniques, Hermanson, G. T., Academic Press, 1996, 페이지 456-527] 참조).

[0392] NHS 에스테르-말레이미드 교차-링커를 이용한 DNA의 활성화: 말단 아민을 지니는 올리고뉴클레오티드 DNA를 가지는 3중 나선을 술포-SMCC로 처리하여, 말레이미드-DNA를 생성시킨 후, 이를 칼럼 크로마토그래피에 의해 과잉 교차-링커로부터 정제 분리한다. 말레이미드 활성화 DNA를 즉각 사용하여, 항체를 접합하거나 추후 사용을 위해 동결건조시킬 수 있다.

[0393] 또 다른 예에서, 말레이미드-활성화 DNA의 환원 또는 티올화 항체로의 접합이 제공된다: EDTA의 존재 하에 MEA 또는 DTT로써 항체를 환원시켜, 금속 촉매분해에 의해 술프히드릴의 산화환원를 방지한다. 환원된 IgG를 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제한다. 항체의 티올화를 위해, 항체를 37℃에서 30분 동안 또는 실온에서 1시간 동안 티올화제(예를 들어, 2-이미노티올란 또는 SATA)(항체 대배 10 내지 50배 몰 과량)와 반응시킨다. 티올화 항체를 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제한다. 환원 또는 티올화 항체 분획을 목적 DNA-대-항체 비(예를 들어, 4:1 내지 15:1 몰비)에서 말레이미드-활성화 DNA와 혼합하고, 37℃에서 30 내지 60분 동안 또는 실온에서 2시간 동안, 또는 4℃에서 하룻밤 동안 항온배양한다. 접합체를 기재된 바와 같이 친화도 크로마토그래피에 의해 비접합 DNA로부터 정제 분리한다. 접합체를 냉동, 동결건조 또는 무균 여과시키고, 4℃에서 유지시킨다. 다른 방법이 당업계에 제공된다: (문헌 [Bioconjugate techniques, Hermanson, G. T., Academic Press, 1996, 페이지 456-527]를 참조한다).

[0394] 추가적 실시양태들에서, 본 발명의 접합체의 제제는 DNA를 뉴클레아제 분해로부터 보호하고, 세포 도입을 용이하게 하는 보조 분자의 부착을 이용하여 생성된다.

[0395] 일부 실시양태들에서, 표적화 부분, 예를 들어 온전 항체, 항체 단편(예를 들어, Fab 등), 단쇄 항체가 면역자극 분자(예를 들어, 핵산 및/또는 펩티드/폴리펩티드)에 직접적으로 또는 링커를 통해 화학적으로 접합된다. 링커는 짧은 연장 길이(예를 들어, 3 내지 15, 25개 이하 아미노산 또는 핵산 염기)일 수 있다. 본 발명의 범주 내에 사용될 수 있는 링커의 예가 미국 특허출원 공보 제2007/0003514호에 개시되어 있다.

[0396] 한 실시양태에서, 본 발명의 표적화 부분은 하나 이상의 성분에 교차-연결된다. 예를 들어, 항체는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화할 수 있다(예를 들어, 제US 4,676,980호 참조). 적당한 펩티드 교차-링커 및 기법이 당업계에 공지되어 있고, 그러한 연결제 및 기법의 예가 예를 들어 제US 4,676,980호에 개시되어 있다.

[0397] 또한, 분자를 화학적으로 접합하는 수단이 당업자에 공지되어 있다. 면역자극 분자를 항체에 부착시키기 위한 절차가 제제의 화학 구조에 따라 다양할 것이다. 폴리펩티드는 통상 각종 작용기들을 함유하고; 예를 들어, 이펙터를 작용기에 결합시키는 이펙터 분자 상의 적당한 작용기와의 반응에 이용가능한 카르복실산(COOH) 또는 유리 아민($-NH_2$) 기를 함유한다.

[0398] 추가로, 표적화 부분은 예를 들어 자체의 순환 반감기를 증가시키기 위해 중합체에 공유 접합시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 펩티드에 부착시키도록 하기 위한 예시적 중합체 및 방법이 예를 들어 제US 4,766,106호, 제US 4,179,337호, 제US 4,495,285호 및 제US 4,609,546호에 예시되어 있다. 추가예시적 중합체는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)(예를 들어, 분자량이 약 1,000 내지 약 40,000, 예컨대 약 2000 내지 약 20,000, 예를 들어 약 3,000 내지 12,000인 PEG)을 포함한다. 표적화 부분은 또한 임의의 적당한 유형의 화학기, 예컨대 메틸기 또는 에틸기 또는 탄수화물기와 접합될 수 있다. 상기 기 및 기타 적당한 접합된 기를 사용하여, 표적화 부분, 예컨대 항체 또는 그것의 작용적 단편의 생물학적 특성을 향상시킬 수 있는데, 예를 들어 혈청 반감기, 용해도 및/또는 조직 결합을 증가시킬 수 있다.

[0399] 항체 유도체는 (a) 항체 또는 그것의 서브유닛(예를 들어, 항-CD38 항체 H 사슬, L 사슬, 또는 그것의 항-CD38 특이적/선택적 단편)의 N-말단측 또는 C-말단측, 적절한 치환기 또는 측쇄, 또는 (b) 항체 내 당 사슬(예를 들어, 문헌 [Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan(1994)] 참조)에 단백질 또는 기타 제제/부분/화합물을 화학적으로 접합함으로써 생성될 수 있다. 유도체는 또한 적절한 경우, 내부 잔기 또는 당에서 접합에 의해 생성될 수 있다.

[0400] 항체는 또한 검출제, 예를 들어 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌

술포닐 클로라이드, 란탄계 인 등으로 유도체화될 수 있다. 적당한 형광 표지의 추가예에는 ^{125}Eu 표지, 이소티오시아네이트 표지, 파이코에리트린 표지, 파이코시아닌 표지, 알로파이코시아닌 표지, o-프탈알데히드 표지, 플루오레사민 표지 등이 포함된다. 화학발광 표지의 예에는 루미날 표지, 이소루미날 표지, 방향족 아크리디늄 에스테르 표지, 이미다졸 표지, 아크리디늄 염 표지, 옥살산염 에스테르 표지, 루시페린 표지, 루시퍼라제 표지, 아에쿠린 표지 등이 포함된다.

[0401] 한 실시양태에서, 항체 유도체는 접합된 핵산 또는 핵산-관련 분자를 포함한다. 본원에 제공되는 핵산 분자는 코딩 핵산, 비코딩 핵산, 또는 코딩 및 비코딩 핵산 서열의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 비코딩 서열은 그 자체로 면역자극성이다.

[0402] 대안적으로, 항체 및/또는 면역자극 성분(들)은 부가적 반응성 작용기를 노출하거나 부착시키도록 유도체화될 수 있다. 유도체화는 피어스 케미칼 컴퍼니(Pierce Chemical Company, 록포드 III 소재)로부터 입수가능한 것들과 같은 임의의 수의 링커 분자를 부착시키는 것을 수반할 수 있다. 또한, 본 발명의 범주 내에 사용하기 위한 적당한 교차-링커에는 적절한 스페이서에 의해 분리된 2개의 구분된 반응성 기를 가지는 이종 이중작용적 교차-링커(예를 들어, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르) 또는 동종 이중작용적 교차 링커(예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트)가 포함된다. 그러한 링커도 또한 피어스 케미칼 컴퍼니로부터 입수가능하다.

[0403] 본원에 사용되는 "링커"는 핵산 분자 및/또는 폴리펩티드 또는 펩티드를 포함한 면역자극 성분(들)에 항체를 결합시키는 데 사용되는 분자이다. 링커는 통상 항체 및 면역자극 활성제 모두에 대한 공유 결합을 형성할 수 있다. 적당한 링커는 당업자에게 공지되어 있고, 이에는 직쇄 또는 분지쇄 탄소 링커, 복소환 탄소 링커 또는 펩티드 링커가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 항체 및 면역자극 분자가 폴리펩티드인 경우, 링커가 측기를 통해(예를 들어, 시스테인으로의 이황화물 연결기를 통해) 구성성분인 아미노산에 결합될 수 있다. 그러나, 한 실시양태에서, 링커는 말단 아미노산의 알파 탄소 아미노기 및 카르복실기에 결합될 수 있다.

[0404] 일부 실시양태들에서, 링커는 하나 이상의 절단 부위를 제공할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 접합체는 절단성 또는 비절단성 링커를 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, 생체절단가능한 연결기는 본원에 기재된, 핵산, 인터칼레이터, 활성 제제, 표적화 부분, 양친매성 분자 및 중합체와 같은 성분을 공유 커플링 또는 교차-연결하기 위해 조성물 내에 사용될 수 있는 특이적 화학 부분 또는 기의 유형으로 정의된다. 일부 적당한 예가 문헌 [V. R. Sinha, et al., Europ. JL Pharmaceutical Sci. 18, 3-18(2003)] 및 그 안의 참조문헌들에 의해 경구 전달에 사용하기 위한 것으로 개시되어 있다. 생체절단가능한 연결기 또는 결합은 그 구조 및 기능에 의해 구분가능하다.

[0405] 절단성 펩티드 연결기. 생체절단가능한 연결기의 또 다른 바람직한 카테고리는 2 내지 100 잔기의 길이, 바람직하게는 3 내지 20 잔기의 길이를 갖는 생체절단가능한 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 이는 주로 세포 내에서 발견되는 카텝신과 같은 특정 효소(세포내 효소)에 의해 절단되는 특정 아미노산 서열(즉, 통상 소수성임)을 포함하는 특정 천연 또는 합성 폴리펩티드로서 정의된다. 좌측의 아미노 또는 "N" 말단 및 우측의 카르복실 또는 "C" 말단으로 출발하는 통상의 경우를 이용하여, 일부 예는, 쌍을 형성한 아미노산 Phe-Leu, Leu-Phe 또는 Phe-Phe, 예컨대 Gly-Phe-Leu-Gly(GFLG) 및 기타 조합을 포함하는 임의의 펩티드이다. (다른 것들 중에서도) 바람직한 예에는 문헌 [J. J. Peterson, et al., in Bioconj. Chem., Vol. 10, 553-557, (1999)] 및 그 안의 참조문헌들, 및 미국 특허 출원 일련번호 제10/923,112호(이들은 본원에 참조 인용됨)에 개시된 류신 엔케팔린 유도체 및 임의의 카텝신 절단성 펩티드 연결기 서열이 포함된다.

[0406] 또 다른 바람직한 유형의 생체절단가능한 연결기는 티올레이트 이온 또는 기타 절단 기전으로부터의 공격을 입체적으로 억제하는, 임의의 "힌더드(hindered)" 또는 "보호된" 이황화물 결합이다. 상기 보호된 이황화물 결합의 (비제한적) 예가 이하와 같이 커플링제에서 발견된다: S-4-숙신이미딜-옥시카르보닐-α-메틸 벤질 티오황산염(SMBT) 및 4-숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오) 톨루엔(SMPT). 환원에 대해 내성을 가지는 또 다른 유용한 커플링제가 문헌 [Worrell, et al., Anticancer Drug Design 1: 179-188(1986)]에 의해 개시된 SPDB이다. 또한, 문헌 [S. Arpicco, et al., Bioconj. Chem. 8(3):327-337(1997)]에 개시된 에틸 S-아세틸 3-머캅토부티로 티오이미데이트(M-AMPT) 및 3-(4-카르복시아미도 페닐디티오)프로프리온티오이미데이트(CDPT)를 포함한, 이황화물에 인접한 메틸기 또는 페닐기로 치환된 특정 아릴디티오 티오이미데이트도 포함된다.

[0407] 각종 화합물을 항체와 같은 단백질에 부착하기 위한 많은 절차 및 링커 분자가 알려져 있다(예를 들어, 유럽 특허 출원 제188,256호; 미국 특허 제4,671,958호, 제4,659,839호, 제4,414,148호, 제4,699,784호; 제4,680,338호; 제4,569,789호; 및 제4,589,071호; 및 문헌 [Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075]

참조).

[0408] 키메라 부분의 각 성분 상의 기와 반응성인 한 작용기를 가지는 이중작용적 링커 또는 삼중작용적 링커를 사용하여, 목적 면역접합체를 형성시킬 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태들에서 유도체화는 항체의 화학 처리, 예를 들어 당단백질 항체의 당 부분을 페리오데이트로 글리콜 절단하여 유리 알데히드기를 생성시키는 것을 수반할 수 있다. 항체 상의 유리 알데히드기가, 예를 들어 링커 상의 유리 아민 또는 히드라진기와 반응하여, 폴리펩티드를 결합시킬 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,671,958호 참조). 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 항체 단편 상의 유리 술프히드릴기의 생성 절차도 또한 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,659,839호 참조).

[0409] 또 다른 실시양태에서, 커플링은 이중 가닥 핵산 분자과 단일 가닥 핵산 간에 이루어진다. 대안적 실시양태에서, 단일 가닥 또는 이중 가닥이 표적화 부분에 커플링될 수 있다. 한 실시양태에서, 표적화 부분이 또 다른 핵산 분자에 커플링(예를 들어, 접합)하는 핵산 분자에 연결되어, 3중체 핵산 분자를 형성한다. 또한, 3중체 핵산 분자는 그 자체가 이중-가닥 또는 단일-가닥 핵산과 추가로 상호작용하여, 즉 4중체 및 5중체 핵산 분자를 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 3 가닥의 DNA가 와트슨-크릭(와트슨-크릭) 및 혹스틴(Hoogsteen) 염기-쌍형성에 의존하는 복합체를 형성하는 3중체가 형성된다. 3중체 분자는 높은 친화도 및 특이성으로 표적 영역에 결합할 수 있다. 3중체 형성 분자를 제조하고 사용하여 각종 상이한 표적 분자에 결합시키는 방법에 관한 대표예는 미국 특허의 하기 비제한적 목록에서 찾아볼 수 있다: 제US 5,176,996호, 제US 5,645,985호, 제US 5,650,316호, 제US 5,683,874호, 제US 5,693,773호, 제US 5,834,185호, 제US 5,869,246호, 제US 5,874,566호 및 제US 5,962,426호.

[0410] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 면역자극성이고 하나 이상의 종양 항원을 코딩하는 핵산 분자와 3중체를 형성하는 핵산 분자를 포함한다. 한 추가 실시양태에서, 하나 이상의 종양 항원을 코딩하는 핵산은 병원체와 관련된 하나 이상의 항원을 추가로 코딩하거나 대안적으로 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 그러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 미니서클 DNA이다. US 특허들, 즉 제US 6,143,530호, 제US 6,825,012호 및 제US 7,018,833호에 개시된 것들을 포함한 미니서클 발현 벡터가 알려져 있고, 본 발명의 범주 내에서 사용될 수 있다.

[0411] 또 다른 방법에서, 항체의 활성 제제(예를 들어, 핵산 분자)로의 커플링은 광친화도를 통해 수행된다. 항체는 광친화도 화합물이 선택적 부위-특이적으로 부착되도록 하는 하나 이상의 광친화도 부위를 포함한다. 특히, 퓨린, 아지도-퓨린 및 기타 유사한 복소환 유기 화합물, 및 구체적으로는 ATP- 또는 GTP-유사체에 대한 높은 친화도를 가지는 항체가 하나 이상의 부위를 포함한다는 것이 발견되었다. 또한, 다른 광친화도 결합 부위가, 예를 들어 항체를 비-퓨린 함유 광친화도 화합물, 예를 들어 5-아지도-2'-데옥시우리딘 5'-삼인산염(5-N_3 dUTP)를 포함한 dUTP의 광활성 유사체와 같은 피리미딘 유도체와 반응시킴으로써 추가로 동정될 수 있다.

[0412] 퓨린 또는 아지도퓨린 뉴클레오티드 친화도 부위는 이후 "퓨린 환 결합" 또는 간단히 "PRB" 도메인 또는 부위로 칭해질 것이다. 항체 분자 상의 PRB 부위는, 광친화도 화합물, 특히 퓨린 또는 아지도퓨린 광친화도 화합물이 온화한 생리학적 조건 하에서 일어나는 광활성화 화학 반응에 의해 항체 및 항체 단편에 용이하게 부착된다는 것이 본 발명자들에 의해 밝혀진 후에 발견되었다. 구체적으로 항체는, 퓨린 및 아지도퓨린 광친화도 유사체에 대한 높은 친화도를 나타내어, 온화한 생리학적 조건 하, 보다 특히 단지 단회의 2 내지 5분 광분해 후의 항체의 퓨린 및 아지도퓨린 광친화도 유사체와의 반응이 거의 100% 광부착을 초래하게 되는 하나 이상의 PRB 부위를 포함한다.

[0413] 미국 특허 제5,693,764호에 기재된 바와 같이, 광친화도는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 광친화도 화합물, 바람직하게는 퓨린, 아지도퓨린 또는 유사한 복소환 염기 함유의 광친화도 유사체 및 가장 바람직하게는 ATP- 또는 GTP-유사체 광친화도 화합물이 항체 분자 내로 효과적으로 광삽입되도록 하고, 이는 항원 결합의 실질적 손실을 초래하지 않는다.

[0414] 뉴클레오티드 광친화도 유사체를 단백질에 부착시키기 위한 적당한 방법이, 예를 들어 각기 전문이 본원에 참조 인용되는 문헌 [Potter & Haley, Meth. in Enzymol., 91:613-633, (1983)]; 문헌 [Owens & Haley, J. Biol. Chem., 259: 14843-148 48, (1987)]; 문헌 [Atherton et al., Biol, of Reprod., 32: 155-171, (1985)]; 문헌 [Khatoon et al., Ann. of Neurology, 26:210-219, (1989)]; 문헌 [King et al., J. Biol. Chem., 269: 10210-10218, (1989)]; 문헌 [Dholakia et al., J. Biol. Chem, 264:20638-20642, (1989)]; 문헌 [Campbell et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 87: 1243-1246, (1990)]; 및 문헌 [Kim et al., J. Biol. Chem., 265:3636-3641, (1990)]에 기재되어 있다.

[0415] 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 광친화도 화합물에 유효하게 결합하는, 임의의 항체 또는 항체 함유 조성물이

본 발명의 범주 내에 속한다. 이에는 예로서 다클론 및 단클론 항체, 재조합 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 단쇄 항체, 상이한 종(예를 들어, 마우스, 염소, 토끼, 인간, 래트, 소 등)으로부터의 항체, 항-이디오타입 항체, 상이한 이소타입의 항체(IgG, IgM, IgE, IgA 등), 및 이들의 단편 및 유도체(예를 들어, $(Fab)_2$ 단편)가 포함된다.

[0416] 한 예로서, 플라스미드 및 미니서클 DNA에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 구체 항목에 따라 생성될 수 있다:

[0417] 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화하고 결합할 수 있는 ds DNA 서열

[0418] 특이적 서열은 바람직하게 3중 나선 형성에 사용되는 올리고뉴클레오티드에 대해 완전 상보적임

[0419] 관심 유전자의 프로모터-지정 발현에 영향을 주지 않는 부위에 도입된 서열

[0420] 서열은 3 내지 50개 염기 쌍의 길이; 바람직하게는 >10개 염기 쌍의 길이를 가질 수 있음

[0421] 예시적 서열은 바람직하게 호모퓨린(Pu)-호모피리미딘(Py) ds DNA일 수 있음:

[0422] 반대 가닥에 상보성 반복체 (GA)n을 갖는 (CT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내의 영역, 예를 들어 5' CTCTCTCTCTCTCTC 3'(서열 번호 _)

[0423] 1) 3' GAGAGAGAGAGAGAG 5'(서열 번호 _)

[0424] 2) 상보성 가닥 (GGAA)n을 갖는 (CCTT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내의 영역, 예를 들어 5' CCTTCCTTCCTTCC 3'(서열 번호 _)

[0425] (2) 3' GGAAGGAAGGAAGG 3'(서열 번호 _)

[0426] 상보성 가닥 (GAA)n을 갖는 (CTT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내의 영역,

[0427] 예를 들어 5' CTT CTT CTT CTT CTT CTT 3'(서열 번호 _)

[0428] a. 3' GAA GAA GAA GAA GAA GAA 5'(서열 번호 _)

[0429] 상보성 가닥 (GGA)n을 갖는 (CCT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내의 영역,

[0430] 예를 들어 5' CCT CCT CCT CCT CCT CCT 3'(서열 번호 _)

[0431] b. 3' GGA GGA GGA GGA GGA GGA 5'(서열 번호 _)

[0432] 임의의 다른 호모퓨린-호모피리미딘 서열

[0433] 예를 들어 5' TCT CCT CCT TT 3'(서열 번호 _)

[0434] 3' AGA GGA GGA AA 5'(서열 번호 _)

[0435] 일부 실시양태들에서, 구아닌-풍부 DNA는 어셈블리되어, G-4쿼텟(1 내지 4)의 사각-평면 어레이의 적층에 기초하는 4-가닥 구조를 형성할 수 있다. G-쿼텟은 혹스틴형 염기 쌍형성에 의해 연결된 4개의 구아닌으로 구성된다. 단가 양이온은 G-쿼텟 간의 중심 공동에서 선택적으로 결합되고, 이 구조는 칼륨에 의해 특이적으로 안정화되고; 나트륨은 덜 안정한 복합체를 생성시키는 반면, 리튬은 어셈블리(5, 6)를 억제한다. G-4중체는 4개의 DNA 가닥(5, 7, 8)의 분자간 결합에 의해, 2개의 G-트랙트(9, 10)를 가지는 서열의 이량체화에 의해, 또는 적어도 4개의 G-트랙트(11 내지 15)를 가지는 한 가닥의 분자내 접힘에 의해, 형성될 수 있다. 특히, 텔로머 서열은 인간 및 기타 고등 유기체의 경우에 매우 반복되는 G-풍부 서열, 예컨대 $(GGGTTA)_n$로 구성되고, 섬충류에서는 $(GGGGTT)_n$로 구성되며, 편모충류에서는 $(GGGGTTTT)_n$로 구성된다. 4중체는 또한 일부 발암유전자, 특히 c-myc(16, 17), 면역글로불린 스위치 영역(3), 망막아종 감수성 유전자(18), FMR-1 유전자(19), 닭 β-글로불린 유전자(20) 및 인슐린 유전자(21)의 조절 영역에 연루되었다. 추가로, HIV-인테그라제(22) 및 트롬빈(12)에 표적화된 것을 포함한 G-4중체 플랫폼 주위에 기초하는 수가지 합성 압타머가 알려져 있다. G-쿼텟을 포함한 분자는 비-와트슨-크릭, 구아닌-구아닌 염기-쌍형성의 분자내 구조를 형성함으로써 자가-결합할 수 있다. 이 구조는 보통의 이온 강도 및 중성 pH에서 40℃ 미만에 형성하여, 헤어핀 2중체와 같이 거동한다. 말단 T(3' 말단 또는 5' 말단)의 첨가는 4중체 구조(37)를 안정화하는 것으로 나타났고, 이 효과는 말단 G-쿼텟(38)과 가능히 일부 쌍형성하면서 부가적 염기 적층에 의해 유발된다.

[0436] 예를 들어, 프라이밍을 위한 서열은 하기의 것일 수 있다: 5' TGGGGT 3'

[0437] (1) 3' TGGGGT 5'

[0438] 한 실시양태에서, 이하와 같이, 플라스미드 또는 미니서클 DNA 내에 (표적 세포 활성 프로모터 서열, 관심 유전자 및 올리고뉴클레오티드 결합 서열을 포함한) 특정화된 뉴클레오티드 서열을 도입하는 방법이 제공된다. 관심 유전자에 대한 DNA 서열을 먼저 포유동물의 세포(DNA 2.0) 내 효율적 발현을 위해 코돈 최적화한다. 선택된 서열(표적 세포 특이적 프로모터, 관심 유전자, 올리고뉴클레오티드 결합 모티프)을 CMVie 프로모터 및 SV40 종결자 벡터를 포함하는 중간체 포유동물의 발현 벡터에 클로닝한다[예를 들어, 유전자 발현을 구동하는 CMV 즉각 조기 프로모터를 갖는 플라스미드 pGL3 베이직(Basic)(프로메가(Promega))]. 서열 확인 후, 전체 발현 카세트(프로모터, 관심 유전자, SV40 종결자, 올리고뉴클레오티드 결합 모티프)를 SpeI(5' 말단) 또는 ApaI(3' 말단) 제한 엔도뉴클레아제 부위 특이적 테일을 포함하는 PCR 프라이머로 PCR 증폭시킨다. 이어서, PCR 산물을 SpeI 및 ApaI로 분해하여 p2ΦC31 미니서클 벡터의 SpeI 및 ApaI 부위 내에 결찰한다. 이어서, 작제물인 p2ΦC31-유전자를 E. 콜라이 NM522 세포로 형질전환하여, 재조합 용량에 대해 시험한다. 플라스미드를 함유한 E. 콜라이를 성장시킨 후, 아라비노스(0.25% 최종 농도)를 첨가하여 재조합을 유도한다. 분취량의 배양액을 유도 전(시간 0) 및 유도 후(60분 및 120분)에 취하여, 미니프렙 플라스미드 단리를 행한다. 생성된 플라스미드 프렙을 전기영동하여, 모 플라스미드가 미니플라스미드 및 미니서클로 재조합되었는지의 여부를 결정한다. 재조합은 겔 상에 미니서클 밴드의 존재로 결정할 때 성공적이다. 성공적 재조합을 겔 상의 미니서클의 존재에 의해 결정한다. 골격 플라스미드 밴드(미니플라스미드)의 강도의 경시적 감소는 플라스미드 골격이 I-SceI 효소에 절단되어, 세포성 엔도뉴클레아제에 의해 분해됨을 가리킨다.

[0439] 플라스미드 DNA를 키아젠 맥시프렙(Qiagen MaxiPrep) 절차를 이용하거나 키아젠 말단 불포함 플라스미드 맥시 키트를 이용하여 제조하고, 1 mg/ml로 TE(10 mM 트리스±HCl, 1 mM EDTA)(pH 8.0)에 재현탁시킨다. 플라스미드는 아가로스 겔 전기영동에 의해 >95% 수퍼코일링된다.

[0440] 분자 방법 및 클로닝 기법, 예컨대 제한 효소를 이용한 분해, 겔 전기영동, E. 콜라이의 형질전환(타입-메틸화), 핵산 석출, 핵산 하이브리드화 등이 문헌에 기재되어 있다(문헌 [Maniatis et al., T, E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1989. Molecule cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]; 문헌 [Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kinston, D.D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl. 1987. Current Protocols in molecular biology 1987-1988. John Willey and Sons, New York]).

[0441] 일부 실시양태들에서, 플라스미드는 올리고뉴클레오티드, 예컨대 DNA, LNA, PNA의 부위-특이적 결합이 가능하다. 루시퍼라제(gWiz) 또는 녹색 형광 단백질(GFP; pGGGFP)를 발현하는 p진그립(pGeneGrip) 계열에 기초한 플라스미드(문헌 [GTS; Zelphati et al. (8)]). 플라스미드 gWiz 및 pGGGFP의 전사 종결자 내에서, 유전자 발현을 간섭하지 않으면서 부위-특이적 결합을 가능하게 하는 것은 반대 가닥 위에 상보성 반복체 (GA)n를 갖는 (CT)n에 기초한 반복 서열의 플라스미드 내 영역인 진그립 부위 1이다. 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터에 대해 5'에 위치한 부위 2는 상보성 가닥 (GGAA)n을 갖는 (CCTT)n에 기초하고, 부가적으로 부위 1을 포함하는 플라스미드 pGG2XGFP 및 pGG2XEMPTY에서만 발견된다(문헌 [GTS Catalogue 2002; Zephati et al. (8)]). 플라스미드 pGG2XEMPTY는 GFP 유전자의 결실에 의해 pGG2XGFP로부터 유래된다. 플라스미드 pGG2XEMPTY를 작제하기 위해, pGG2XGFP를 NheI 및 BamHI로 분해하고, 잔존 5.1 kb 플라스미드 단편을 겔로 정제하고, 클레노우(Klenow) DNA 중합효소로 처리하고, 결찰에 의해 재환형화한다(33).

[0442] 통상적 방법을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 플라스미드/미니서클 DNA로의 하이브리드화를 위한 선형 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 합성. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는, 이중 가닥 플라스미드 또는 미니서클 DNA 분자에서 뉴클레오티드 서열에 결합하는 (또한 바람직하게 상보성인) 특이적 서열을 포함하는 DNA, RNA, LNA, PNA 또는 하이브리드(DNA-LNA, DNA-PNA, RNA-LNA, RNA-PNA 등)의 선형 가닥이다.

[0443] 또한, 올리고뉴클레오티드 서열은 하이브리드화에 의한 3중 나선의 훅스틴 염기-쌍 기재 형성을 통해 플라스미드 또는 미니서클 DNA에 결합할 수 있다. 훅스틴 염기 쌍형성은 시토신 잔기는 포함하지 않고 슈도이소시토신을 포함하는 PNA에 대해 더 강하며, 이는 높은 pH >5±6에서의 훅스틴 염기 쌍형성을 가능하게 하고, 반면 시토신을 포함하는 PNA는 낮은 pH<5±6(30)에서만 결합한다. 특정 아미노산의 첨가는 DNA에 결합된 '비스(bis)' PNA의 안정성을 향상시킨다.

[0444] 대안적으로, 올리고뉴클레오티드는 와트슨-크릭 기재 가닥 침범 및 가닥 치환을 통해 플라스미드/미니서클 DNA에 결합할 수 있다. 예를 들어, LNA ODN는 수퍼코일링된 플라스미드 DNA의 가닥 치환 제제이다. 플라스미드 DNA

에 결합하는 서열-특이적 LNA ODN은 그것의 동족 결합 부위에서 비결합 DNA 가닥의 가닥 치환을 유발한다. 몇개의 양 하전 아미노산이 부가된 '비스' PNA ODN도 또한 우수한 가닥 치환 제제이다.

[0445] 추가로, 그러한 핵산 분자는 4중체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 사각-평면 어레이의 적층에 기초하는 4-가닥 구조를 형성하도록 어셈블리될 수 있다는 구아닌-풍부 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0446] 올리고뉴클레오티드는 하기 염기를 포함할 수 있다: 티미딘(T) - A와 염기 쌍을 형성하고/하거나 ds DNA의 AT 2중체와 3중체를 형성함; 시토신 또는 양자화 시토신(C+) - G와 염기 쌍을 형성하고/하거나 ds DNA의 GC 2중체와 3중체를 형성함; 아데닌(A) - T와 염기 쌍을 형성하고/하거나 ds DNA의 AT 2중체와 3중체를 형성함; 구아닌(G) - C와 염기 쌍을 형성하고/하거나 ds DNA의 GC 2중체와 3중체를 형성함; 우라실(U) - A와 염기 쌍을 형성하고/하거나 ds DNA의 AT 2중체와 3중체를 형성함.

[0447] 추가 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 그것의 뉴클레아제에 대한 내성을 증가시키고/시키거나 그것의 상보성 ds DNA에 대한 친화도를 향상시키고/시키거나[뉴클레아제 내성 - 골격(메틸포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포아미데이트 등)의 변형; 2' O 메틸 변형]; 플라스미드/미니서클 내 상보성 ds DNA에의 결합 - 예를 들어 시토신의 메틸화(이로써 중성 pH에서 안정한 3중 나선을 형성함)을 향상시키기 위한 비변형 천연 염기 또는 화학적으로 변형 염기로 구성될 수 있다.

[0448] 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 3 내지 50개 염기일 수 있고, 하이브리드화 영역은 바람직하게는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 초과의 염기일 수 있다.

[0449] 한 실시양태에서, '하이브리드' 올리고뉴클레오티드는, 작용성(표적화 부분의 부착을 위한 링커 암, 면역자극 서열, 예컨대 CpG 모티프, 부가적 결합 모티프, 환형화를 가능하게 하는 서열 등)을 부가하기 위해, 하이브리드화 영역(DNA, LNA, PNA) 및 임의의 길이의 연장(DNA, RNA, LNA, PNA)으로 구성될 수 있다. 예를 들어, LNA(하이브리드화 모티프)는 포스포로티오에이트 CpG ODN까지 확장된다. PTO CpG ODN을 항원을 코딩하는 플라스미드에 결합시키기 위해 LNA를 사용함으로써, 고수준 항원 발현을 억제하지 않으면서 면역보조 효과를 수득할 수 있다. 또한, 링커 암은 플라스미드/미니서클 DNA에 대한 하이브리드화를 간섭하지 않는 염기를 갖는 임의의 서열일 수 있고, 바람직한 거리에서 플라스미드/미니서클이 항체에 커플링할 수 있도록 한다(예를 들어, 링커는 3 내지 20개 퓨린 염기를 함유할 수 있다; GAGG).

[0450] 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열-특이적 3중 나선 형성에 기초한 2중체 DNA에 대한 패드록(Padlock) 올리고뉴클레오티드에 순응할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 올리고퓨린-올리고피리미딘 서열에서 DNA 주요 그루브에의 결합에 의한 3중 나선 형성을 통해 이중-가닥 DNA 주위에서 환형화될 수 있디. 3중 나선 형성을 통한 이중-가닥 DNA 표적의 서열-특이적 인식 후, 3중체-형성 올리고뉴클레오티드의 말단을 T4 DNA 리가제의 작용을 통해 결합시켜, 표적 서열을 포함한 플라스미드에 카테나화한 원형 DNA 분자를 형성시킨다. 이중-가닥 DNA 서열의 표지화를 상기 서열의 어떠한 화학적 또는 효소적 변형없이 수행하였다. 이 "패드록" 올리고뉴클레오티드는 수퍼코일링된 플라스미드 또는 기타 이중-가닥 DNA에 비가역적 방식으로 비공유 택을 부착시키기 위한 도구를 제공한다(문헌 [Padlock oligonucleotides for duplex DNA based on sequence-specific triple helix formation. Escude, C, T Garestier, C Helene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 10603-10607, September 1999, Biochemistry] 참조).

[0451] 올리고뉴클레오티드는 임의의 알려진 기법(핵산 합성장치, 포스포르아미다이트 화학)에 의해 합성될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 3' 및/또는 5' 변형(아민, 티올, 카르복실, 인산염 기 등)으로 작용화되어, 이황화물, 티오에테르, 에스테르, 아미드 또는 아민 연결기를 통해 표적화 부분/항체(이황화물, 말레이미드, 아민, 카르복실, 에스테르, 에폭시드 또는 알데히드를 가짐)에 공유 접합되는 것을 가능하게 할 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 임의의 다른 작용화를 또한 수행하여, 표준 프로토콜에 따라 공지된 이중작용적 커플링 시약을 통해 표적화 부분/항체에 접합시킬 수 있다.

[0452] (플라스미드/미니서클 ds DNA 내에 도입된 상보성 DNA에 상응하는) 올리고뉴클레오티드의 예시적 서열:

[0453] (i) 반대 가닥에 상보성 반복체 (GA)n를 갖는 (CT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내 영역에 대해 상보적임.

[0454] 예를 들어, 올리고뉴클레오티드=5' CTCTCTCTCTCTC 3'

[0455] 플라스미드/미니서클 DNA; 5' CTCTCTCTCTCTC 3'

[0456] i) 3' GAGAGAGAGAGAGAG 5'

[0457] (ii) 상보성 반복체 (GGAA)n를 갖는 (CCTT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내 영역에 대해 상보적임.

[0458] 예를 들어, 올리고뉴클레오티드=5' CCTTCCTTCCTTCC 3'

[0459] 플라스미드/미니서클 DNA; 5' CCTTCCTTCCTTCC 3'

[0460] 2) 3' GGAAGGAAGGAAGG 5'

[0461] (iii) 상보성 반복체 (GAA)n를 갖는 (CTT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내 영역에 대해 상보적임.

[0462] 예를 들어, 올리고뉴클레오티드=5' CTT CTT CTT CTT CTT CTT 3'

[0463] 플라스미드/미니서클 DNA; 5' CTT CTT CTT CTT CTT CTT 3'

[0464] a) 3' GAAGAA GAAGAA GAAGAA 5'

[0465] (iv) 상보성 반복체 (GGA)n를 갖는 (CCT)n에 기초한, 반복 서열의 플라스미드 내 영역에 대해 상보적임.

[0466] 예를 들어, 올리고뉴클레오티드=5' CCT CCT CCT CCT CCT CCT 3'

[0467] 플라스미드/미니서클 DNA; 5' CCT CCT CCT CCT CCT CCT 3'

[0468] b) 3' GGA GGA GGA GGA GGA GGA 5'

[0469] (v) 임의의 다른 호모퓨린-호모피리미딘 서열에 대해 상보적임

[0470] 예를 들어, 올리고뉴클레오티드=5' TCT CCT CCT TT 3'

[0471] 플라스미드/미니서클 DNA: 5' TCT CCT CCT TT 3'

[0472] 3' AGA GGA GGA AA 5'

[0473] (vi) G-쿼텟의 사각-평면 어레이의 적층에 기초하는 4-가닥 구조를 형성할 수 있는 구아닌-풍부 뉴클레오티드.

[0474] 예를 들어, 올리고뉴클레오티드= 5' TGGGGT 3'

[0475] ii. 3' TGGGGT 5'

[0476] 플라스미드/미니서클 DNA: 5' TGGGGT 3'

[0477] 1) 3' TGGGGT 5'

[0478] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 (플라스미드/미니서클 ds DNA 내 도입된 상보성 ds DNA에 상응하는) ss RNA 올리고뉴클레오티드이다. 예시적 서열은 이하와 같다:

[0479] i. 5' CUCUCUCUCUCUCUC 3'

[0480] ii. 5' CCUUCCUUCCUUCC 3'

[0481] iii. 5' CUU CUU CUU CUU CUU CUU 3'

[0482] iv. 5' CCU CCU CCU CCU CCUCCU 3'

[0483] v. 5' UCU CCUCCU UU 3'

[0484] vi. 5' UGGGGU 3'

[0485] LNA 및 PNA 올리고뉴클레오티드의 예시적 서열(진그립 플라스미드 계열 상에 존재하는 ODN-결합 부위; 진그립 플라스미드 계열(GTS)에서 발견되는, 반복 결합 부위 1 및 2에서의 DNA 서열에 기초한 LNA 및 PNA ODN. (CT)n 또는 (GA)n 반복 모티프를 포함하는 PNA/LNA ODN를 진그립 부위 1에 결합하도록 설계하고; (CCTT)n 및 (GGAA)n를 진그립 부위 2에 결합하도록 설계한다.

설명	서열
13량체 100% LNA	5'-NH2-CTCTCTCTCTCTC-3'
13량체 100% LNA	5'-NH2-GAGAGAGAGAGAG-3'
17량체 50% LNA	5'-NH2-CtCtCtCtCtCtCtCtC-3'
14량체 100% LNA	5'-NH2-CCTTCCTTCCTTCC-3'
14량체 100% LNA	5'-NH2-GGAAGGAAGGAAGG-3'
9량체 '비스' 50% LNA, 50% DNA	5'-NH2-CtCtCtCtC-XXX- CtCtCtCtC-3'
21량체 DNA, 13량체 LNA	5'-tccatgacgttcctgacgtttGAGAGAGAGAGAG-3'
21량체 DNA, 13량체 LNA	5'-tccatgagcttcctgagtcttGAGAGAGAGAGAG-3'
GTS PNA 8량체 '비스' 100% PNA	5'O-O-TCTCTCTC-O-O-O-JTJTJTJT-CONH2
Os PNA 13량체 '비스' 100% PNA	5'O-O-gCTCTCTCTCTCTC-O-CTCTCTCTCTCTCk
Os PNA 13량체 '비스' 100% PNA	5'O-O-gCTCTCTCTCTCTC-O-O-O-CTCTCTCTCTCTCk
Os PNA 13량체 '비스' 100% PNA	5'O-O-gCTCTCTCTCTCTCk
35량체 DNA REP, 13량체 LNA (반복 유전자외 회문-REP 서열; P. 아에루기노사)	5' cggcggataaccgcgagcggttattcgccctacgg-CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'
19량체 CpG A DNA, 13량체 LNA	5' gggggacgatcgtcggggg-CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'

LNA 잔기는 굵은 체의 대문자로 되어 있고; DNA 잔기는 굵은 체의 소문자로 되어 있으며;
PTO 잔기는 부가적으로 이탤릭체로 되어 있고;
PNA 및 아미노산 잔기는 이탤렉체로 된 일반 텍스트이고, PNA 염기는 대문자이며;
O = 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산 링커; J = 슈도이소시토신; g = 글리신; k = 리신;
X = 'PEG 스페이서'-9-O-디메톡시트리틸-트리에틸렌글리콜, 1-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트, 스페이서 포스포르아미다이트 9;
NH2 = 5'-아미노-개질제 C12 포스포르아미다이트 스페이서.

[0486]

[0487] (문헌 [Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. Kirsten M. L. Hertoghs, Jonathan H. Ellis and Ian R. Catchpole. Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 20 5817-5830] 참조).

[0488] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 접합체는 패드록 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. ds DNA 주위의 순환을 위한 패드록 올리고뉴클레오티드의 예시적 서열: 20-량체 올리고뉴클레오티드(B)와 각기 10개 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열에 2개의 T_n 링커에 의해 연결되는 중심의 3중 나선-형성 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드(A). 올리고뉴클레오티드(A)의 총 길이는 15-염기-3중체 3중 나선을 형성함으로써 2중체 표적에 결합함과 동시에 20-bp 이중 나선을 형성함으로써 20-량체 주형(올리고뉴클레오티드 B)에 결합하는 것을 가능하게 해야 한다. 효소적 환형화를 위해 요구되어지는 경우, 인산염기를 상기 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 부가한다.

….3’- CTCCCCTCCCCTCCC -5’……

….5’-GAGGGGAGGGGAGGG-3’……

Tn…….. [GAGGGGAGGGGAGGG…….Tn]

GCTCGGATCC -3’ ODN A 5’CGTACGGTCG

[0489] ODN B 3 ’CGAGCCTAGG GCATGCCAGC 5’

[0490] 그러므로, 본원에 개시된 임의의 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥 플라스미드 또는 미니서클 DNA에서 상보성 뉴클레오티드 서열에 선형 올리고뉴클레오티드를 하이브리드화하는 데 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 플라스미드 또는 미니서클 DNA에 결합시키는 한 예시적 방법은 구체 항목을 포함할 수 있다: (i) 플라스미드 내 ODN-결합 부위 대비 최대 4- 내지 40-몰배 과량의 ODN로 하여, 37℃에서 16시간 동안 10 mM 인산염 완충액, 1 mM EDTA(pH 5.8) 중에서 플라스미드를 PNA/LNA ODN과 함께 항온배양하고; (ii) 플라스미드에의 DNA±LNA ODN 결합을 위해, ODN을 10분 동안 80℃에서 예비 가열한 후, 얼음 내로 플런징하여, 플라스미드 결합에 영향을 줄 수 있는 ODN 내 DNA 및 LNA 염기 간의 임의의 자가-상보성 상호작용을 저해한다. DNA ODN의 플라스미드 DNA±LNA 복합체로의 임의의 부가적 결합은 10 mM 인산나트륨(pH 7.1), 4 mM DNA ODN에서의 1 mM EDTA 중에 37℃에서 45분 동안 이루어지고; (iii) 3중 나선 형성을 위한 어닐링 방법: (a) DNA 올리고뉴클레오티드를 0.2 M 아세트산나트륨 및 0.1 M 염화나트륨 함유의 완충액에서 상보성 ds DNA 뉴클레오티드 서열을 포함한 플라스미드/미니서클에 첨가하고; 혼합물을 20℃에서 30분 동안 항온배양함. (b) 2중체 DNA 및 3중체-형성 올리고뉴클레오티드의 3중체를 150 mM NaCl 함유의 50 mM 아세트산나트륨(pH 5.0)에서 제조함. (c) 3중 나선 형성을 위해, 올리고뉴클레오티드(100 fmol)를 각종 양의 이중-가닥 표적의 존재 하에 10 ml의 50 mM 트리스 HCl(pH 7.5) 10 mM $MgCl_2$ 10 mM DTT, 1 mM ATP 25 mg/ml BSA 중에서 항온배양한다. 샘플을 75℃로 가열한 후, 45℃로 천천히 냉각한다. 플라스미드/미니서클 및 올리고뉴클레오티드를 포함한 3중 나선을 에탄올 석출 및 원심분리에 의해 회수한다.

[0491] 또한, 결합한 ODN를 가시화하기 위해, 2.5 mg의 플라스미드 DNA를 브롬화에티듐(EtBr)없이 아가로스±TAE 겔 전기영동에 의해 분석한다. 높은 백분율(2%)의 겔을 사용하여 양 플라스미드-결합 및 유리 ODN 모두의 분리를 최대화한다. 임의의 비결합 ODN를 마이크로스핀 세파크릴(MicroSpin Sephacryl) S400 HR 칼럼을 이용하여 겔 배제 크로마토그래피에 의해 플라스미드 및 플라스미드-결합 ODN으로부터 분리한다.

[0492] 추가로, 제한 효소 분석도 또한 수행할 수 있다: 37℃에서 LNA 또는 PNA ODN 결합을 하룻밤 동안 행한 후, 2.5 mg의 플라스미드 DNA의 제한 효소 분해를 수행한다. 플라스미드 gWiz를 BsaI 및 SphI로 분해하고, 플라스미드 pGG2XGFP는 NdeI로 분해한다. 이어서, 샘플을 EtBr없이 2% 아가로스±TAE 겔 상에서 분석한다.

[0493] 플라스미드 DNA에의 LNA 또는 PNA 결합에 의한 가닥 치환의 확인: DNA 시퀀싱 반응: 형광 디데옥시 종결자 방법을 이용한 '빅 염료(big dye)' PCR-염기 써모사이클 시퀀싱에 의해 표준 dsDNA 시퀀싱을 수행하고, PE-바이오시스템 프리즘 3700 모세관 시퀀서에서 행하며, ABI 3700 DNA 애널라이저에서 가시화한다. 플라스미드 DNA에 결합한 LNA 또는 PNA ODN로부터의 가닥 치환을 확인하기 위해, ssDNA 시퀀싱 검정을 PNA 또는 LNA ODN 가닥 치환을 입증하는 확립된 방법에 기초하여 수행한다.

[0494] 최적 DNA 시퀀싱 프라이머(RevGG2B, 22량체 100% DNA-5'Cy5) ggaaggaagttaggaaggaagg-3')를 설계하고, 표준 '빅 염료' 시퀀싱에 의한 pGG2XGFP 내 진그립 부위 2 반복 영역에 거친 양호한 품질 시퀀싱에 의해 입증한다. 25 mg 분취량의 플라스미드 pGG2XGFP(0.024 mM)에 ODN LNA(낮은 농도: 0.5 mM)를 결합시키고, 비결합 LNA ODN을 제거한다. 이어서, 결합한 LNA가 존재 및 부재하는 플라스미드 pGG2XGFP를 Cy5-표지 RevGG2B DNA 프라이머 및 T7 DNA 중합효소와 함께 오토리드 시퀀싱 키트(AutoRead Sequencing Kit)(아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech))를 이용하여 변형 ssDNA 시퀀싱 프로토콜에 적용한다. 주형 플라스미드 DNA의 용량을 1 내지 3 mg 내에서 변화시키고, 어닐링 온도는 37 또는 42℃로 감소시키나, 어닐링 시간은 플라스미드의 이중-가닥 성질을 저해하지 않도록 하는 조건 하에 임의의 치환된 ssDNA 영역에의 DNA 시퀀싱 프라이머의 서열-특이적 결합을 확장하기 위해 30분까지 연장된다. 이어서, 시퀀싱 반응을 비저블 지네틱스 DNA 시퀀서(Visible Genetics DNA Sequencer)로 행하고, 크로마스(Chromas) 소프트웨어를 이용하여 변형시킨다. 영역의

알려진 DNA 서열을 이용하여 LNA가 결합된 플라스미드에 대해 수득된 DNA 서열을 육안으로 해석한다(문헌 [Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. Kirsten M. L. Hertoghs, Jonathan H. Ellis and Ian R. Catchpole. Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 20 5817-5830] 참조).

[0495] 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드를 플라스미드/미니서클 주위에 환형화한다. 플라스미드-결합 올리고뉴클레오티드를 환형화하기 위해, 주형 올리고뉴클레오티드(1 pmol) 및 40 유닛의 T4 DNA 리가제를 첨가하고 45℃에서 1시간 동안 항온배양함으로써, 완충액(50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 mg/ml BSA) 중에서 결찰 반응을 수행한다. 리가제를 65℃에서 15분 동안 열 불활성화한다(문헌 [Padlock oligonucleotides for duplex DNA based on sequence-specific triple helix formation. Escude, C, T Garestier, C Helene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 10603-10607, September 1999, Biochemistry] 참조).

[0496] 핵산 및 폴리펩티드/펩티드의 커플링을 위한 상기 수단은 단지 예시적이고 비제한적이다.

[0497] 본 발명의 방법은 일반적으로 INAS를 펩티드 및 항체를 포함한 각종 아미노산 중합체에 연결하기 위해 사용될 수 있다. 생물학적 활성 제제의 표적화 부분(예를 들어, 펩티드, 항체, 압타머)과의 접합은 이하의 것들을 포함한 임의의 통상적 방법에 의해 달성될 수 있다: 공유 또는 비-공유 접합, 화학적 접합, 물리적 접합, 링커를 통한 접합(예컨대, 프로타민, 비오틴-아비딘 결합 등). 또한, 일부 실시양태들에서, 본 발명의 조성물은 핵산 분자를 포함하는데, 여기에서 조성물은 폴리양이온(예를 들어, 프로타민) 또는 세포로 전달하기 위해 핵산 분자를 축합하거나 팩키징하기 위해 통상 사용되는 기타 제제와 결합된다.

[0498] 한 예시적 접합 방법이 개시되어 있고, 도 4에 나와 있다.

[0499] 본 발명의 조성물의 2개 이상의 성분을 커플링 또는 결합하기 위한 부가적 방법이 통상적이고, 이는 3중체 또는 4중체 핵산 가닥 형성을 사용하는 단계를 포함한다. 그러한 방법에는 활성화제의 첨가에 의한 펩티드 또는 항체 상의 카르복실산 부분의 활성화가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 활성화제에는 HATU(O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트); HBTU(O-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트); TBTU(2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1-1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트); TFFH(N,N',N",N"-테트라메틸우로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트); BOP(벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄헥사플루오로포스페이트); PyBOP(벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄헥사플루오로포스페이트); EEDQ(2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로-퀴놀린); DCC(디시클로헥실카르보디이미드); DIPCDI(디이소프로필카르보디이미드); HOBt(1-히드록시벤조트리아졸); N-히드록시숙신이미드; MSNT(1-(메시틸렌-2-술포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸); 아릴 술포닐 할로겐화물, 예를 들어 트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드이 포함된다. 바람직한 활성화제는 카르보디이미드이다. 한 측면에서, 활성화제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염(EDC) 및/또는 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸)카르보디이미드(CDC)이다.

[0500] 상기 기재된 바와 같은 활성화된 카르복실산 부분은 활성화된 카르복실산 부분과 친핵 부분의 반응을 촉진하기에 충분한 것으로 숙련된 실무자에게 알려진 조건 하에서 INAS 상의 친핵 부분과 반응한다. 적절한 조건 하에서, 비교적 낮은 pH를 유지하는데, 즉 pH가 약 6.5 미만으로 유지된다. 통상의 방법 하에서(즉, 보다 높은 pH 수준 하에서), 활성화된 카르복실산 및/또는 활성화제는 급속히 가수분해하고, 이에 접합 반응의 효율을 감소시키는 것으로 사료된다.

[0501] 본 발명의 생물학적 활성 제제는 통상적 방법을 통해 본 발명의 표적화 부분에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 면역자극 핵산 분자(INAS)의 경우, INAS는 접합(연결기)을 포함하나 이들에 국한되지 않는 다수의 방식으로 펩티드 또는 폴리펩티드와 커플링될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 부분은 공유 및/또는 비-공유 상호작용을 수반하는 접합체의 펩티드 또는 폴리펩티드 부분과 커플링될 수 있다. 일반적으로, INAS 및 펩티드 또는 폴리펩티드는 종양 또는 표적 세포에 의한 접합체의 수용이 증진되거나 용이하게 되도록 하는 방식으로 연결된다.

[0502] 펩티드 또는 폴리펩티드와 INAS 간의 연결은 INAS의 3' 또는 5' 말단에서 또는 INAS 내의 내부 위치에서의 적절히 변형된 염기에서 이루어질 수 있다. 펩티드 또는 폴리펩티드가 적당한 반응성 기(예를 들어, N-히드록시숙신이미드 에스테르)를 포함하는 경우, 그것은 시토신 잔기의 N^4 아미노기와 직접적으로 반응할 수 있다. INAS 내의 시토신 잔기의 수 및 위치에 따라, 하나 이상의 잔기에서의 특이적 커플링이 달성될 수 있다.

[0503] 본 발명의 방법을 사용하여, 각종 접합체들을 제조할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 접합체에는 DNA-항체 접합체, DNA-펩티드 접합체, RNA-항체 접합체 및 RNA-펩티드 접합체가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0504] 접합 반응 후에, 접합체를 당업자에게 자명한 각종 방법에 의해 단리할 수 있다. 예를 들어, 반응 혼합물을 칼럼 크로마토그래피 시스템에 적용하여 크기 배제에 의해 분리할 수 있다. 또한, 접합체(예를 들어, 표적화 부분-INAS 접합체)의 종양 표적 또는 면역 세포 내로의 도입은 수용체-매개 세포흡수작용 또는 전기천공을 포함한 임의의 방법에 의해 용이하게 될 수 있다.

[0505] **B. 선별**

[0506] 본 발명의 또 다른 측면은 생물학적 활성 제제에 대해 그 시험 제제가 면역자극성인지에 대해 선별하는 방법에 관한 것이다. 일반적으로 그러한 선별 방법은 어떠한 활성 제제가 면역자극성이고 그러한 활성 제제의 어떠한 수준이 면역자극적인지를 결정하는 수단을 제공한다. 그러한 제제는 본원에 기재된 본 발명의 표적화 부분(예를 들어, 항체, 압타머, 펩티드)에 커플링된 임의의 핵산 분자, 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 각종 실시양태들에서, 표적화 부분 및 생물학적 활성 제제는 임의의 통상적 방법을 통해 접합되고 커플링되거나, 펩티드 또는 핵산 링커일 수 있는 링커를 통해 커플링될 수 있다.

[0507] 예를 들어, 마커는 DNA 손상 또는 세포 스트레스를 결정하기 위해 시험 제제의 투여 전/후에 선별될 수 있다. 예를 들어, DNA 이중 가닥 파단이 일어날 수 있고, 이는 검정될 수 있다. 세포는 DNA 수복 기전, 및 일차 기능이 DNA 손상이 제거될 때까지 세포 주기 진행을 중지하거나 저속화하는 것인 체크포인트 생성을 촉발하는 것을 포함한, 광위의 반응을 개시함으로써 DSB와 반응한다(문헌 [Shiloh, Y. Nature Reviews Cancer 3, 155-68(2003)], 문헌 [Nyberg, K. A. et al Annu Rev Genet 36, 617-56(2002)], 문헌 [Khanna & Jackson Nat. Genet 27 247-254(2001)]).

[0508] 예를 들어, 세포를 ATM 또는 ATR 키나제의 활성 증가에 대해 검정할 수 있다. 인간 세포를 IR로 처리함으로써, DNA-손상 신호전달자 단백질 키나제 ATM 및 ATR의 급속 활성화를 초래한다. 이어서, 이 키나제가 이펙터 단백질 키나제 CHK1 및 CHK2 및 체크포인트 매개자 단백질 53BP1 및 MDC1을 포함한 한 계열의 다운스트림 표적을 인산화하고 활성화한다. 추가로, ATM 및 ATR은 Ser-139 상의 히스톤 변이체 H2AX를 인산화하고; 이 반응은 1분간의 IR 노출 내에 검출될 수 있고, DNA 손상 부위가 플랭킹된 크로마틴의 큰 도메인에 걸쳐 연장된다. 이 점진적으로 보존된 반응은 한 DNA DSB만큼 적은 정도로 촉발될 수 있고(문헌 [Chen, H. T. et al. Science 290, 1962-1964(2000)]), 상기 유형의 손상의 생체내 생성에 대한 특이적이고 명료한 마커로서 널리 인식되고 있다. 이어서, 히스톤 H2AX의 인식은 53BP1, MDC1, MRE11/RAD50/NBS1 복합체 및 염색체 1(SMC1) 단백질의 구조적 유지의 인산화 형태를 포함한 체크포인트 및 DNA 수복 인자 계열의 DNA 손상의 부위로의 동원을 용이하게 한다. DNA DSB의 부위에서 상기 초점의 형성은 체크포인트 반응의 한 특징적 특성이다(문헌 [Goldberg, M. et al., Nature 421, 952-6(2003)]). 상기의 것은 본 발명의 화합물 및 방법을 이용하여 하나 이상의 생물학적 활성 제제를 검정하는 방법에서 선별될 수 있는 각종 마커의 단지 한 예이다.

[0509] 예를 들어, 세포에 대한 효과에 관한 시험 제제(예를 들어, 아포프토시스 유도제)의 선별 방법에서, 체크포인트 반응 폴리펩티드를 검정할 수 있다(예를 들어, 발현/단백질 활성에 대한 면역화학 또는 PCR). 그러한 폴리펩티드는 DNA 손상, 특히 이중 가닥 파단에 의한 세포 주기 체크포인트의 활성화를 매개함에 있어 활성을 가지는데, 즉 DNA 손상 체크포인트 반응 경로의 성분인 폴리펩티드를 말한다. 적당한 폴리펩티드에는 ATM, ATR, ATRIP, CHK1, CHK2, BRCA1, NBS1, RAD50, MRE11, CDC25C, 14-3-3σ, CDK2/사이클린 E, CDK2/사이클린 B1 53BP1, MDC1, 히스톤 변이체 H2AX, SMC1, RAD 17, RAD1, RAD9, HUS1 및 MRC1이 포함된다. 본원에 기재된 DNA 손상 체크포인트 반응에는 ATM 및 ATR 의존성 시그널링 경로 모두가 포함된다.

[0510] DNA 손상 체크포인트 경로 폴리펩티드의 인산화는 그것의 활성화된 상태를 가리킬 수 있다. 그러므로, 활성은 또한 DNA 손상 체크포인트 경로 폴리펩티드의 인산화를 결정함으로써 결정될 수 있다. 인산화에 의해 활성화되는 DNA 손상 체크포인트 경로 폴리펩티드에는 ATRIP, CHK1, CHK2, BRCA1, NBS1, RAD50, MRE11, CDC25C, 14-3-3σ, CDK2/사이클린 E, CDK2/사이클린 B1 53BP1, MDC1, 히스톤 변이체 H2AX, SMC1, RAD17, RAD1, RAD9, HUS1 및 MRC1이 포함된다.

[0511] 인간 및 효모에서의 DNA 손상 체크포인트 경로의 각종 성분의 핵산 및 단백질 서열이 하기 등록 번호 하에 유전자은행 데이터베이스로부터 입수가능하다: 인간 ATM(핵산 코딩 서열(CDS): W82828, 단백질 서열: AAB65827, 인간 CHK1(CDS: AF016582, 단백질: AAC51736), 인간 CHK2(CDS: NM_007194, 단백질: 096017), NBS1(CDS: AF3169124, 단백질: BAA28616), 인간 RAD50(CDS: 5032016, 단백질: NP_005723), MRE11(CDS: U37359, 단백질:

AAC78721), BRCA1(CDS: U14680, 단백질: A58881), ATR, (CDS: NM_001 184, 단백질: NP_001175) ATRIP(CDS: AF451323, 단백질: AAL38042.1), CDC25C(CDS: NM_001790, 단백질: NP 001781.1), 53BP1(CDS: NM_005657, 단백질: NP_005648), MDC1(CDS: NM_014641 단백질: NP_055456), 히스톤 변이체 H2AX(CDS: NM_002105, 단백질: NP_002096), SMC1(CDS: NM_006306, 단백질: NP_006297), RAD17(CDS: NM_33338, 단백질: NP_579916), RAD1(CDS: NM_002853, 단백질: NP_002844), RAD9(CDS: NM_004584, 단백질: NP_004575), HUS1(CDS: NM_148959, 단백질: NP_683762) 및 MRC1(CDS: NM_002438, 단백질: NP_002429)이 포함된다.

[0512] 또한, 본 발명의 선별 방법은 면역 자극 화합물의 활성을 검정하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역자극 활성은 수지상 세포에 의한 인터페론, IL-12, NKG2D 리간드, IL-15 및 IL-2의 자극으로부터 발생할 수 있다. 이는 IFN-γ를 생산하기 위한 NK 세포의 자극을 초래하고, $CD4^+$ Th1 세포의 발달을 유도한다. 이어서, 유도된 Th1 세포는 IFN-γ 및 IL-2를 생성시킨다. 이어서, IL-2는 Th1 세포의 추가 증식 및 항원(예를 들어, 종양 및 병원체)-특이적 $CD8^+$ T 세포의 분화를 증진시킨다. IL-2 및 IFN은 또한 선천성 면역계의 NK 세포의 세포독성 활성을 자극한다.

[0513] 본원에 기재된 검정 방법의 다른 실시양태들에서, 세포 또는 동물에서의 면역자극 반응은 하나 이상의 시험 화합물과 접촉하도록 하는 면역 세포의 반응을 검정함으로써 결정된다. 이에 따라, 전-염증성 또는 면역자극 인자가 검정될 수 있다. 예를 들어, IL-12이 유형-1 면역력(Th1 반응)의 일차적 매개자인 것으로 알려져 있다. 그것은 자연 살해(NK) 세포가 IFN-γ를 선천성 면역 반응으로서 생성하도록 유도하고, IFNγ를 생성하는 $CD4^+$ Th1 세포 및 세포독성 $CD8^+$ 세포의 확장을 촉진한다. 그러므로, 그것은 종양의 T-세포 침범 및 T-세포 침범에 대한 종양 세포의 감수성을 증가시킨다.

[0514] 이에 따라, 시험 화합물을 본 발명의 방법을 이용하여 검정하고 사이토카인 분비의 자극제인 것으로 결정되면, 예를 들어 그것은 면역자극성인 것으로 결정된다. 하나 이상의 사이토카인(임의적으로 하나 이상의 다른 사이토카인과 함께, 예를 들어, Th1 사이토카인, 예를 들어 IFN, IL-12 및/또는 IL-2)의 시험관내 방출을 유도, 강화, 활성화 또는 자극하는 화합물이 특히 바람직하다. 시험 화합물의 그러한 면역조절 활성이 특정 의료 용도들에서 특히 중요하다. 예를 들어, IFN 및 IL-12의 생성 증가는 암 세포에 의한 면역 탈피에서 관찰되는 선천성 및 세포성 면역의 억제를 극복할 수 있다.

[0515] 또한, 나타내어진 사이토카인 자극은 공동자극성 제제의 존재에 전체적으로 또는 부분적으로 의존성일 수 있다. 그러한 공동자극성 제제에는 예를 들어 Toll-유사 수용체(TLR) 리간드를 포함한 선천성 면역계를 자극하는 제제가 포함될 수 있다.

[0516] 본 발명의 각종 실시양태들에서, 면역자극 활성에 대한 시험 제제의 선별 방법은 세포를 (다가 접합체를 포함한) 본 발명의 접합체와 접촉시켜, 생물학적 활성 제제인지의 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 임의의 상기 실시양태들에서, 생물학적 활성 제제를 세포에 투여하고, 수득되는 해독값은 시험 제제(예를 들어, 핵산 분자, 펩티드, 폴리펩티드)가 세포 스트레스(예를 들어, DNA 손상), 아포프토시스, 물리적 스트레스, 세포 과융합, 또는 세포 스트레스 관련 마커의 발현 증가를 초래하는지의 여부에 대한 정보를 제공한다.

[0517] 또 다른 실시양태에서, 해독값은 시험 접합체(예를 들어, 형광 또는 방사성동위원소 마커)에 존재하는 마커에 의해 제공되고, 여기에서 해독값은 시험 접합체가 표적 세포(예를 들어, 수지상 세포, 대식세포와 같은 면역 세포)에 의해 수용되는지, 시험 제제가 면역 세포 활성(예를 들어, NK 활성, 공동자극성 수용체 발현; 또는 예컨대 CD40, B7 패밀리, CD86/CD83, MHC 발현, 사이토카인 방출, 전염증성 반응 등을 통한 것과 같은 면역 세포 함입)을 유도하는지에 대한 정보를 제공한다. 면역 활성에 대한 상기 마커가 알려져 있고, ELISA, 면역화학과 같은 통상적 기법을 이용하여 측정될 수 있다(예를 들어 문헌 [CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(문헌 [Coligan, John E. et al., eds. 1999] 참조). 또한, 미국 특허 공보 제20070155814호, 제20070135372호 또는 제20070134261호를 참조한다.

[0518] 예를 들어, 세포(예를 들어, 수지상 세포, 종양 세포)를 상기 세포 상에 존재하는 성분에 특이적으로 결합하는 표적화 부분을 포함한 화합물과 배양액 중에서 접촉시킬 수 있다. 화합물은 또한 하나 이상의 시험 제제(예를 들어, 핵산 또는 펩티드) 및 하나 이상의 검출성 표지(예를 들어, 형광 또는 방사선표지)를 포함한다. 세포를 태깅된 마커가 세포에서 관찰되는지의 여부(예를 들어, 수용)를 결정하기 위해 현미경으로 조사하여, 시험 제제가 세포막을 통과할 수 있는지의 여부(예를 들어, 세포흡수작용)를 결정할 수 있다.

[0519] 다른 실시양태들에서, 하나 이상의 시험 제제를 비-인간 동물에 투여하여, 면역자극 효과를 결정한다. 예를 들어, 통상적 기법을 이용하여 마우스의 측면에 이식된 종양은 시험 접합체에 의해 (예를 들어, 종양 세포 항원에 대해 특이적인 항체로) 표적화될 수 있고, 종양은 꼬리 정맥을 통해 전신적으로 또는 종양에의 주사에 의해 직접적으로 투여되기 전에 취해지게 될 수 있다. 후속하여, 면역활성화에 대한 마커를 평가하여, 시험 제제가 면역 반응을 유도하는지의 여부를 결정할 수 있다. 발현된 마커에 따라, 본 발명의 선별 방법을 이용하여, 시험 제제가 PAMP, DAMP(예를 들어, LL37), 알라민 유도제, Toll-유사 수용체(TLR)-비의존성 방식; TLR-의존성 활성화제(예를 들어, TLR 3, 7, 8 또는 9); 사멸 시그널링을 활성화하거나 생존 유전자 발현을 억제하는 제제; 또는 세포 스트레스/손상을 유발함으로써 면역 반응을 간접적으로 유도하는 제제인지의 여부를 결정할 수 있다.

[0520] 시험 제제는 플라스미드, ODN, RNA, DNA, ssRNA, ssDNA, dsDNA, RNA-DNA 하이브리드, PNA, 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한 임의의 핵산 분자일 수 있다. 각종 실시양태들에서, 하나 이상의 시험 제제를 포함한 다가 화합물이 투여될 수 있는데, 여기에서 상기 화합물은 또한 (예를 들어, 시험관내 또는 생체내) 특이적 표적 세포에 결합하는 본 발명의 표적화 부분도 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 다가 접합체의 경우, 상이한 시험 제제의 2개 이상의 조합을 선별하여, 상승 효과가 관찰되는지의 여부를 결정할 수 있다. 또한, 동일한(또는 상이한) 세포 성분에 대한 표적화 부분을 각기 포함하는 2개 이상의 화합물을 본 발명의 선별 또는 치료 방법에 사용할 수 있다. 또 다른 실시양태들에서, 동일하거나 상이한 표적화 부분을 각기 포함하는 2개 이상의 화합물은 동일하거나 상이한 시험 제제를 포함한다. 예를 들어, 첫 번째 화합물은 표적화 부분 a을 포함하고 두 번째 화합물은 표적화 부분 b를 포함하는 한편, 첫 번째 화합물은 시험 제제 x를 포함하고 두 번째 화합물은 시험 제제 y를 포함한다. 즉, 표적화 부분 및 시험 제제의 각종 조합으로 된 다중 시험 제제를 본 발명의 선별 또는 치료 방법에 이용할 수 있다.

[0521] 물론, 추가 실시양태들에서, 종양 세포 성장 또는 증식을 감소 또는 제거하기 위한 면역자극 반응을 유도함에 있어 하나 이상의 상기 화합물과 조합되는 상기 접합체의 상승 효과를 결정하기 위해, 시험 접합체를 하나 이상의 약학적 화합물과 함께 선별할 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 마커를 사용하여, 시험 접합체를 "태킹"할 수 있고, 세포 내로의 도입을 결정 및/또는 측정할 수 있다.

[0522] 각종 실시양태들에서, 면역자극 관련 마커의 측정은 임의의 통상적 증폭(예를 들어, PCR, RT-PCR)에 의해 행해질 수 있다. 각종 상업적으로 이용가능한 시약을 RT-PCR을 위해 이용가능하며, 예컨대 키아젠 1-단계 RT-PCR 키트 및 어플라이드 바이오시스템즈 태크맨(Applied Biosytems TaqMan) 1-단계 RT-PCR 마스터 믹스 리전트(Master Mix Reagents) 키트를 포함한 1-단계 RT-PCR 시약이 있다. 그러한 시약을 사용하여, 조절 세포/동물 대(vs) 본원에 기재된 하나 이상의 시험 화합물과 접촉된 세포/동물에서의 면역 반응과 관련된 마커 유전자의 발현 수준 조절을 결정할 수 있다.

[0523] 또한, 일부 실시양태들에서, 시험 제제는 (예를 들어, 핵산 서열에 코딩된 펩티드/단백질을 발현할 수 있는) 플라스미드 레플리콘일 수 있다. 이에 따라, 그러한 플라스미드는 검출가능하고/하거나 정량화가능한 "태깅된" 단백질을 발현할 수 있다.

[0524] 본 발명의 화합물에 커플링되고 본 발명의 세포 배양 또는 생체내 방법에 이용될 수 있는 (마커로도 칭해지는) 검출성 표지에는 발색단, 전기화학 부분, 효소, 방사능 부분, 인광기, 형광 부분, 화학발광 부분 또는 양자점, 또는 더욱 특히 방사선표지, 형광단-표지, 양자점-표지, 발색단-표지, 효소-표지, 친화도 리간드-표지, 전자기 스핀 표지, 중원자 표지, 나노입자 광 산란 표지 또는 기타 나노입자로 표지된 프로브, 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), TRITC, 로다민, 테트라메틸로다민, R-파이코에리트린, Cy-3, Cy-5, Cy-7, 텍사스 레드(Texas Red), 파-레드(Phar-Red), 알로파이코시아닌(APC), 에피토프 태크, 예컨대 FLAG 또는 HA 에피토프 및 효소 택(tag), 예컨대 알칼리성 포스파타제, 호스래디쉬 퍼옥시다제, I^2-갈락토시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린 에스테라제 및 합텐 접합체, 예컨대 디곡시제닌 또는 디니트로페닐, 또는 스트렙타비딘/비오틴, 아비딘/비오틴 또는 예를 들어 토끼 IgG 및 항-토끼 IgG를 포함한 항원/항체 복합체와 같은 복합체를 형성할 수 있는 결합 쌍의 구성원; 형광단, 예컨대 움벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 테트라메틸 로다민, 에오신, 녹색 형광 단백질, 에리트로신, 쿠마린, 메틸 쿠마린, 파이렌, 말라카이트 녹색, 스틸벤, 루시퍼 옐로우, 캐스케이드 블루, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 단실 클로라이드, 파이코에리트린, 형광 란탄계 복합체, 예컨대 유로퓸 및 터븀, Cy3, Cy5, 분자 비콘 및 그것의 형광 유도체를 포함하는 것들, 발광 물질, 예컨대 루미놀; 광 산란 또는 플라즈몬 공명 물질, 예컨대 금 또는 은 입자 또는 양자점; 또는 방사능 물질, 예를 들어 ^{14}C, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, Tc99m, ^{35}S 또는 ^{3}H 삽입 염료, 예컨대 페탄트리딘 및 아크리딘(예를 들어, 브롬화에티듐, 요오드화프로피듐, 요오드화헥시듐, 디히드로에

티듐, 에티듐 호모이량체-1 및 -2, 에티듐 모노아지드 및 ACMA); 일부 마이너 그로브 결합제, 예컨대 인돌 및 이미다졸(예를 들어, 호에스트(Hoechst) 33258, 호에스트 33342, 호에스트 34580 및 DAPI); 및 미량 핵산 염색약, 예컨대 아크리딘 오렌지(또한 삽입가능한 것), 7-AAD, 악티노마이신 D, LDS751 및 히드록시스틸브아미딘; 시아닌 염료, 예컨대 SYTOX 블루, SYTOX 녹색, SYTOX 오렌지, POPO-1, POPO-3, YOYO-1, YOYO-3, TOTO-1, TOTO-3, JOJO-1, LOLO-1, BOBO-1, BOBO-3, PO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-1, BO-PRO-3, TO-PRO-1, TO-PRO-3, TO-PRO-5, JO-PRO-1, LO-PRO-1, YO-PRO-1, YO-PRO-3, 피코그린, 올리그린, 리보그린, SYBR 골드, SYBR 그린 I, SYBR 그린 II, SYBR DX, SYTO-40, -41, -42, -43, -44, -45(청색), SYTO-13, -16, -24, -21, -23, -12, -11, -20, -22, -15, -14, -25(녹색), SYTO-81, -80, -82, -83, -84, -85(오렌지색), SYTO-64, -17, -59, -61, -62, -60, -63(적색)가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Principles of Fluorescence Spectroscopy, Joseph R. Lakowicz(Editor), Plenum Pub Corp, 2nd edition(July 1999) and the 6th Edition of Molecular Probles Handbook by Richard P. Hoagland]; 및 미국 특허 제6,207,392호를 참조한다.

[0525] 한 실시양태에서, 시험관내 하나 이상의 세포를, 종양 세포의 세포 성분, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경의 성분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 RGD 모티프 또는 CDGRC 모티프를 포함하는 인테그린 유래 펩티드를 포함한 시험 접합체와 접촉시키는 단계(여기에서, 항체 또는 펩티드는 하나 이상의 면역자극 핵산 서열을 포함하는 핵산에 접합되고, 핵산 서열의 하나 이상은 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)을 포함함), 및 면역 세포의 존재 또는 부재 하에 하나 이상의 세포에서의 마커의 유도 또는 표현형 변화를 결정하는 단계(여기에서, 하나 이상의 세포 내 시험 핵산 접합체의 존재 하에서 결정된 유도 또는 변화는 세포사 시그널링, 세포 성숙 및/또는 NKG2D 리간드 의존성 시그널링을 가리킴)를 포함하는, 세포사, 세포 성숙 및/또는 NKG2D 리간드 의존성 시그널링을 유도하는 본 발명의 접합체를 동정하는 방법이 개시된다. 예를 들어, 접촉이 (a) 세포가 면역 세포의 부재 하에 융합되도록 유발하고(여기에서, 세포는 종양 세포임), (b) 종양 세포가 PBMC 세포 및 종양 세포의 혼합물에서 용해되도록 하며, (c) CD86, IFN-γ 및/또는 Apo2L/TRAIL을 포함하나, 이들에 국한되지 않는 하나 이상의 마커의 발현이 유도되도록 하는 경우(여기에서, 세포는 PBMC 또는 수지상 세포(DC)임), 시험 접합체는 세포사 시그널링의 유도, 세포 성숙 및/또는 NKG2D 리간드 의존성 시그널링과 관련된다.

[0526] 발현된 마커의 유도는 세포 분류에 의해 확립될 수 있다. 또한, 세포는 인간 세포를 포함하나 이들에 국한되지 않는 비태아 동물의 골수로부터 수득된다. 태아 세포도 또한 사용될 수 있다.

[0527] 세포 분류는 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 및 자기 비드 세포 분류(MACS)에 의한 분류를 포함한, 세포를 분류하는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의한 것일 수 있다. MACS에 의해 세포를 분류하기 위해, 세포를 자기 비드로 표지화하고, 세포를 상자기 분리 칼럼에 통과시킨다. 분리 칼럼을 강한 영구 자기 내에 둠으로써, 칼럼 내에 자기장을 형성시킨다. 자기 표지된 세포가 칼럼 내에 포획되어; 세포가 통과하지 않게 된다. 이어서, 포획된 세포를 칼럼으로부터 용출한다.

[0528] 한 실시양태에서, 종양 세포의 세포 성분, 종양 혈관계 및/또는 종양 미세환경의 성분에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한 항체-핵산 접합체가 개시된다. 종양 미세환경은 종양을 둘러싸고 있는, 상피 세포, 기저막, 섬유아세포, 기질 세포 및/또는 근섬유아세포를 포함할 수 있다. 한 추가의 관련 측면에서, 종양을 둘러싸고 있는 상기 세포는 작용적 CLIC4를 발현할 수 있다. 또한, 접합체는 적어도 1 nM 내지 20 nM의 결합 친화도를 가지며, 이는 상기 접합체가 종양 세포의 세포 성분의 결합에 후속하는 시험관내 종양 세포 내 세포 과융합을 촉발하게 됨을 내포한다.

[0529] *C. 처리*

[0530] 일반적으로, 본 발명의 조성물 및 방법은 암 또는 감염성 질병의 예방 또는 치료에 관한 것이다. 본 발명의 각종 측면들에서, 하나 이상의 생물학적 활성 제제에 커플링된 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 본 발명의 조성물을 세포에 투여하여, 신생물을 예방, 감소 또는 제거한다. 본 발명의 다른 측면에서, 하나 이상의 생물학적 활성 제제에 커플링된 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 본 발명의 조성물을 세포에 투여하여, 감염 제제에 의해 유발되는 질병 또는 증상을 예방, 감소 또는 제거한다. 일부 실시양태들에서, 본 발명의 조성물을 단독으로 또는 다른 요법제와 조합하여 투여하여, 본원에 기재된 신생물성 질병 또는 감염성 질병을 앓는 대상을 치료한다.

[0531] 예를 들어, 각종 실시양태들에서, 상기 세포 성분을 특이적으로 표적으로 하는 항체 또는 그것의 작용적 단편, 폴리펩티드(예를 들어, 항체), 압타머 또는 리간드를 투여하여, 암을 예방 또는 치료하는데, 여기에서 상기 조성물은 표적화 부분 및 본 발명의 하나 이상의 생물학적 활성 성분을 포함한다.

[0532] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 질병 또는 증상의 진단, 검출 및/또는 영상화를 위한 제품 및/또는 질병 또는 증상의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 (상기 정의된 바와 같은) 하나 이상의 생물학적 활성 제제에 커플링된 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 화합물(접합체)의 용도가 제공된다. 그러한 질병 또는 증상에는 두경부암, 호흡소화기암, 위장암, 식도암, 정상위/위암, 췌장암, 간-쓸개/간암, 직장결장암, 항문암, 소장암, 비뇨생식기암, 비뇨기과암, 콩팥/신장암, 요관암, 고환암, 요도/음경암, 부인과암, 난소/자궁관암, 복막암, 자궁/자궁내막암, 자궁경부/질/외음부암, 임신성 융모성 질병, 전립선암, 뼈암, 육종(연조직/뼈), 폐암, 중피종, 세로칸암, 유방암, 중추 신경계암, 뇌암, 흑색종, 혈액암 백혈병, 림프종(호지킨 질병 및 비호지킨 림프종), 형질 세포 신생물, 골수종, 골수 형성 이상 증후군, 내분비선 종양, 피부암, 멜라노마, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 췌장 내분비선암, 암양종, 다발성 내분비선 신생물, AIDS-관련 악성 종양, 미지 원발성 부위암 및 각종 소아암을 포함하나 이들에 국한되지 않는 면역 장애, 염증성 질병, 감염성 질병 및 신생물성 질병/암이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 암에는 종양 세포로 이루어진 종양이 포함될 수 있다. 예를 들어, 종양 세포에는 흑색종 세포, 방광암 세포, 유방암 세포, 폐암 세포, 결장암 세포, 전립선암 세포, 간암 세포, 췌장암 세포, 위암 세포, 고환암 세포, 뇌암 세포, 난소암 세포, 림프암 세포, 피부암 세포, 뇌암 세포, 골암 세포 또는 연조직암 세포가 포함될 수 있으나, 이들에 국한되지 않는다.

[0533] 질병을 유발하는 병원체 및 감염 제제의 예가 알려져 있고 본원에 개시되어 있다.

[0534] 한 측면에서, 본 발명의 접합체를 단독으로 또는 기타 항암제, 예컨대 화학요법제, 이온화 조사선, 호르몬요법, 사이토카인, 면역요법, 세포요법, 백신, 단클론 항체, 항혈관신생제, 표적 요법제(소분자 약물) 또는 생물학적 요법제와 조합하여 사용한다. 예를 들어, 화학요법제에는 항종양 알킬화제, 예컨대 머스타드(메클로레타민 HCl, 메팔란, 클로람부실, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 부술판), 니트로소우레아(BCNU/카르무스틴, CCNU/로무스틴, MeCCNU/세무스틴, 포테무스틴, 스트렙토조토신), 테트라진(다카르바진, 미토졸로마이드, 테모졸로마이드), 아지리딘류(티오테파, 미토마이신 C, AZQ/디아지쿠온), 프로카르바진 HCl, 헥사메틸멜라민, 아도젤레신; 시스플라틴 및 그것의 유사체, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴; 항대사물, 메토트렉세이트, 기타 항엽산물, 5-플루오로피리미딘류(5-플루오로우라실/5-FU), 사이타라빈, 아자시티딘, 젬시타빈, 6-티오퓨린(6-머캅토퓨린, 티오구아닌), 히드록시우레아; 토포이소머라제 상화제제, 에피포도필로톡신류(에토포시드, 테니포시드), 캄프토테신 유사체(토포테칸 HCl, 이리노테칸, 9-아미노캄프토테신), 안트라사이클린류 및 관련 화합물(독소루비신 HCl, 리포좀 독소루비신, 다우노루시빈 HCl, 리포좀 다우노루비신 HCl 시트르산염, 에피루비신, 이다루비신), 미톡산트론, 로속산트론, 악티노마이신-D, 암사크린, 피라졸로아크리딘; 안티마이크로튜불제, 빈카 알칼로이드류(빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈), 탁산류(파클리탁솔, 도세탁셀), 에스트라무스틴; 플루다라빈, 2-클로로데옥시아데노신, 2'-데옥시코포르마이신, 호모해링토나인, 수라민, 블레오마이신, L-아스파라기나제, 플록수리딘, 카페시타빈, 클라드리빈, 류코보린, 펜토스타틴, 레티노이드류(올-트랜스 레티노산, 13-시스-레티노산, 9-시스-레티노산, 이소트레티노인, 트레티노인), 파미드로네이트, 탈리도마이드, 시클로스포린; 호르몬요법제, 항에스트로겐제(타목시펜, 토레미펜, 메드록시프로게스테론 아세트산염, 메게스트롤 아세트산염), 아로마타제 억제제(아미노글루테티미드, 레트로졸/페마라, 아나스트로졸/아리미덱스, 엑세메스탄/아로마신, 보로졸), 고나도트로핀-방출 호르몬 유사체, 항안드로겐제(플루타미드, 카소덱스), 플루옥시메테론, 디에틸스틸베스트롤, 옥트레오티드, 류프롤리드 아세트산염, 졸라덱스; 스테로이드성 및 비스테로이드성 항-염증제(덱사메타손, 프레드니손); 항-HER2/neu 항체(헤르셉틴/트라스투주맙), 항-EGFR 항체(세툭시맙/에르비툭스, ABX-EGF/파니투무맙, 니모투주맙), 항-CD20 항체(리툭산/리툭시맙, 이브리투모맙/제발린, 토시투모맙/벡사르), 항-CD33 항체(겜투주맙/마일로타르그), 알렘투주맙/캄파쓰, 베바시주맙/아바스틴을 포함하나 이들에 국한되지 않는 단클론 항체; 및 소분자 억제제가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0535] 한 측면에서, 본 발명의 접합체를 화학요법, 조사선, 사멸 리간드, 항체, 냉동요법, 고주파 열치료, 독소, 전기천공, 바이러스 유전자 요법, 비-바이러스 유전자 요법, 플라스미드, 백신, 나노입자, 압타머, 펩티드/펩티도모방체, 호르몬 요법, 사이토카인, 세균 요법, 기타 암 요법을 포함하나 이들에 국한되지 않는, 종양 세포사를 유도하고/하거나 종양 성장을 억제하도록 설계된 보조 요법과 조합하여 사용한다.

[0536] 한 측면에서, 본 발명의 접합체를, 종양 항원/세포에 대한 내인성을 파괴하고/하거나 종양 세포에 대한 면역 반응을 증폭시키고/시키거나 종양 세포의 면역-매개 사멸을 증가시키도록 설계된 보조 요법, 예컨대 (a) 하기의 것들 중 하나 이상을 이용한 동종 또는 자가 세포 요법: 동종 또는 자가 T 세포; 동종 또는 자가 수지상 세포(DC); 동종 또는 자가 NK 세포; 및/또는 (b) 백신(예를 들어, 종양 또는 병원체에 대한 백신); 및/또는 (c) (항체, 예를 들어 항-CD25; 화학요법; 극성화의 조절, 예를 들어 GATA3 억제; 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO) 억제; TLR 작용자; 또는 기타 방법을 통한) T 조절/억제자 세포의 결실 또는 불활성화; 및/또는 (d) 면역 반응을

증진시키는 사이토카인 또는 공동자극성 분자 또는 기타 면역자극제의 전달 또는 발현(flt-3 리간드, IL-12, GM-CSF, CD40L, B7-1, IL-2, TLR 작용자, 알라민, PAMP, DAMP); 및/또는 (e) 면역 반응을 증진시키는 항체(예를 들어, 항-CTLA-4, 항-41BB, 항-CD28, 항-CD40, 항-B7 패밀리)의 투여; 및/또는 (f) 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경에 대한 항체(예를 들어, 각종 종양- 또는 종양-관련 항원 또는 수용체를 표적으로 하는 항체; 접합된 항체)의 투여; 및/또는 (g) 신호 전달 억제제(STI), 탈메틸화제(예를 들어, 아자시티딘), 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 조절제를 포함한, 종양 유전자 발현 또는 표적 세포 시그널링을 변형시킬 수 있는 임의의 제제의 투여와 조합하여 사용한다.

[0537] 본 발명의 한 측면에서, (상기 정의된 바와 같은) 하나 이상의 활성제를 본원에 기재된 표적화-치료 접합체를 투여하기 전, 후 또는 중에 투여한다. 그러한 실시양태들에서, 하나 이상의 활성제는 종양 세포사를 증가시키고/시키거나, 종양 성장을 억제하고/하거나 항종양 면역 반응을 증진시킬 수 있다.

[0538] 예를 들어, 한 실시양태에서, 하나 이상의 활성 제제는 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO)의 억제제이다. IDO의 억제제는 효소적 수준으로 이루어질 수 있는데, 예컨대 활성 부위를 차단하거나 효소의 활성 부위에 결합하는 소분자 억제제가 있다. 대안적으로, 억제제는 유전자 발현 수준으로 작용할 수 있는데, 예컨대 안티센스, siRNA 또는 리보자임으로 표적화하여, IDO 활성을 감소시킨다. 그러므로, 각종 실시양태들에서, 본 발명의 치료제(예를 들어, 항체-FNAS 접합체)를 임의의 IDO 억제제와 함께 투여하며, 이로써 임의의 순서로 또는 동시에 투여한다.

[0539] 간외 효소 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO)는 중심 대사성 공동-인자 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD)의 생합성으로의 첫 번째 및 속도-제한 단계에서 트립토판 분해를 촉매한다. IDO는 IDO 발현이 인터페론-감마에 의해 자극된다는 관찰로 인해 면역학적 역할과 연관되었고, 그 후 모성 면역력으로부터 태아를 보호함에 있어 생리학적으로 중요하다는 발견에 의해 확인되었다. 종양 및 배수 림프절에서 통상 상승된 IDO는 종양 미세환경에서 T 세포 면역력을 억제한다. 암에서, IDO 활성은 종양 항원에 대해 후천적 내인성을 촉진하는 것을 도울 수 있다. 종양 항원에 대한 말초적 내인성을 생성시킴으로써, IDO는 종양의 성장을 용이하게 하는 기저 염증 환경의 범주에서 종양 세포 생존을 좌절시키는 면역반응을 약화시킬 수 있다. 임상전 연구에서, IDO의 소분자 억제제는 상기 면역억제 기전을 절충시키고, 각종 통상적 화학요법제들의 효능을 강하게 뒷받침하며, 이는 치료 목표로서의 IDO 억제제의 임상적 개발을 지지한다.

[0540] IDO 억제제 1-메틸-트립토판은 임상적 시험을 위해 개발 중에 있다. 문헌 [Hou et al. Cancer Res. 2007 Jan 15; 67(2):792-801]. Hou 등에 의해 나타난 바와 같이, 1-메틸-트립토판의 D 이성체는, D-1-메틸-트립토판의 항종양 효과가 IDO 유전자의 파괴를 갖는 마우스(IDO-녹다운 마우스)에서 완전히 소실되었기 때문에, IDO 유전자를 특이적으로 표적화한다. 그러므로, 각종 실시양태들에서, D 이성체 또는 L 이성체, 바람직하게는 D-1-메틸-트립토판을 투여하여, 본 발명의 치료제와의 조합 설정에 있어 IDO 억제를 행하고, 숙주-매개 면역억제를 차단하며, 항종양 면역력을 증진시킨다.

[0541] 또한, 다른 실시양태들에서, 조합 투여는 IDO 활성의 업스트림 활성화제를 표적으로 하여, IDO 발현을 불가능하게 함으로써 IDO 활성을 감소 또는 제거하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, IDO는 신호 전달자 및 전사 1α(STAT1α) 및 인터페론 조절 인자(IRF)-1의 활성화제의 인터페론(IFN)-γ-매개 효과에 의해 유도된다. 유도 기전이 확인된 것은 아니나, IDO의 유도는 또한 IFN-γ-비의존성 기전을 통해 매개될 수 있다. 그러므로, 소분자 억제제 또는 IDO 발현의 업스트림 활성화제를 표적으로 하는 녹-다운 핵산은 본 발명의 조성물 및 방법의 항암 효과를 증진시키기 위한 부가적 표적을 제공한다. 한 관련 측면에서, 표적화 부분의 IDO를 표적으로 하는 면역자극 siRNA(INAS)와의 접합체를 사용하여, 항종양 면역력을 증진시킬 수 있다.

[0542] 그러므로, 본 발명의 조성물 및 방법을 소분자 억제제를 포함한 하나 이상의 기타 활성제 및 IDO 발현 및/또는 활성을 예방하는 화합물과 조합하여 이용할 수 있다. 그러한 활성제는 본 발명의 치료 조성물 및 방법과 함께 투여되도록 구상된다. 그러한 활성제 및 그것의 사용 방법이 알려져 있고, 예컨대 미국 특허출원 제20070173524호, 제20070105907호, 제20070099844호, 제20070077234호, 제20060292618호, 제200601 10371호, 제20050186289호 및 제20040294623호에 개시되어 있다.

[0543] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 미생물 감염, 진균류 감염, 기생충 감염, 세균 감염 및 바이러스 감염으로 구성된 군으로부터 선택되는 감염에 의해 유발되는 감염성 질병의 진단, 검출 및/또는 영상화를 위한 제품 및/또는 질병 또는 증상의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 (상기 정의된 바와 같은) 하나 이상의 생물학적 활성 제제에 커플링된 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 접합체의 용도가 제공된다.

[0544] 본 발명은 또한 유효량의, 장애를 치료할 수 있는 적어도 하나의 화합물 및 약학적으로 허용되는 비히클 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 기재된 바와 같은 다른 치료제를 포함할 수도 있으며, 예를 들어 통상적 고체 또는 액체 비히클 또는 희석제뿐만 아니라, 목적하는 투여 방식에 적절한 유형의 약학적 첨가제(예를 들어, 부형제, 결합제, 방부제, 안정제, 향료 등)를 사용하여 약학적 제제의 업계에 공지된 바와 같은 기법에 따라 제형될 수 있다.

[0545] 본 발명의 제조 물품의 성분으로 이용되는 약학적 조성물은 고체, 용액, 유화액, 분산물, 미셀, 리포좀 등의 형태로 사용될 수 있으며, 여기에서 생성된 조성물은 활성 성분으로서 상술된 하나 이상의 화합물을 장내 또는 비경구 적용에 적합한 유기 또는 무기 담체 또는 부형제와 혼합하여 함유한다. 본 발명의 제조 물품의 성분으로 사용되는 화합물은 예를 들어, 정제, 펠렛, 캡슐, 좌약, 용액, 유화액, 현탁액 및 사용에 적합한 임의의 다른 형태에 통상적인 약학적으로 허용되는 비독성 담체와 조합될 수 있다. 사용할 수 있는 담체에는 고체, 반고체 또는 액체 형태의 글루코스, 락토스, 아카시아검, 젤라틴, 만니톨, 전분 페이스트, 마그네슘 트리실리케이트, 탈크, 옥수수 전분, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 감자 전분, 우레아, 중쇄 길이의 트리글리세리드, 덱스트란, 및 제제를 제조하는 데 사용하기에 적합한 기타 담체가 포함된다. 보조제 외에도, 안정제, 증점제, 착색제 및 향료가 사용될 수 있다.

[0546] 본 발명의 약학적 조성물은 임의의 적절한 수단, 예를 들어 경구적으로, 예컨대 정제, 캡슐, 과립 또는 산제의 형태로; 설하적으로; 구강적으로; 비경구적으로, 예컨대 피하, 피내, 정맥내, 근육내 또는 수조내 주사 또는 주입 기술(예를 들어 멸균 주사용 수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액으로)에 의해; 비강내로, 예컨대 흡입 스프레이에 의해; 국소적으로, 예컨대 크림 또는 연고의 형태로; 또는 직장내로, 예컨대 좌약의 형태로; 약학적으로 허용되는 비독성 비히클 또는 희석제를 함유하는 투약 단위 제제로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은, 예를 들어 속효성 또는 서방성에 적절한 형태로 투여될 수 있다. 속효성 또는 서방성은 본 발명의 화합물을 함유하는 적합한 약학적 조성물을 사용하거나, 특히 서방성의 경우에는, 피하 이식물 또는 삼투 펌프와 같은 장치를 사용하여 달성될 수 있다. 본 발명의 접합체는 또한 리포좀으로 투여될 수도 있다. 한 측면에서, 조성물은 전신적으로, 종양 내로 또는 종양 부위에 투여될 수 있다.

[0547] 영장류, 예컨대 인간 외에도, 각종 다른 포유동물들이 본 발명의 방법에 따라 처리될 수 있다. 예를 들어, 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 기니아피그, 래트 또는 다른 소과 동물, 양과 동물, 말과 동물, 개과 동물, 고양이과 동물, 설치류 또는 쥐 종을 포함하나 이들에 국한되지 않는 포유동물들이 처리될 수 있다. 그러나, 방법은 또한 다른 종, 예컨대 조류 종(예를 들어, 닭)에 수행될 수도 있다.

[0548] 세포가 조절의 표적으로 되는 것이 요망되는, 상기 방법으로 처리되는 대상은 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 기니아피그, 래트 또는 다른 소과 동물, 양과 동물, 말과 동물, 개과 동물, 고양이과 동물, 설치류 또는 쥐 종, 바람직하게는 남성 또는 여성의 인간을 포함하나 이들에 국한되지 않는 포유동물들이다.

[0549] 본 발명의 화합물을 투여하기 위한 약학적 조성물은 편리하게도 투약 단위 형태로 제공할 수 있으며, 제약 업계에 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 모든 방법은 활성 성분을 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 배합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 약학적 조성물은 활성 성분을 액체 담체 또는 미분 고체 담체 또는 양자 모두와 균일하고 친밀하게 배합시킨 후, 필요에 따라 생성물을 목적하는 제제로 성형하여 제조된다. 약학적 조성물에서, 활성 대상 화합물은 질병 과정 또는 증상에 목적 효과를 제공하기에 충분한 양으로 포함된다.

[0550] 활성 성분을 함유하는 약학적 조성물은 경구 사용에 적합한 형태, 예를 들어 정제, 구내정, 로젠지, 수성 또는 유성 현탁액, 분산성 산제 또는 과립, 유화액, 경질 또는 연질 캡슐, 또는 시럽 또는 엘릭시르일 수 있다.

[0551] 경구용 용도로 의도된 조성물은 약학적 조성물의 제조 업계에 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있으며, 이 조성물은 약학적으로 세련되고 맛있는 제제를 제공하기 위하여 감미제, 향미제, 착색제 및 방부제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제제를 포함할 수 있다. 정제는 활성 성분을 정제 제조에 적합한 약학적으로 허용되는 비독성 부형제와 혼합하여 함유한다. 이들 부형제는 예를 들어, 불활성 희석제, 예컨대 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 인산칼슘 또는 인산나트륨; 제립제 및 붕해제, 예를 들어 옥수수 전분 또는 알긴산; 붕해제, 예를 들어 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 및 활택제, 예를 들어 스테아르산마그네슘, 스테아르산 또는 탈크일 수 있다. 정제는 코팅되지 않을 수 있거나, 위장관에서의 붕해 및 흡수를 지연시킴으로써, 장기간 지속적으로 작용할 수 있도록 공지 기술로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 모노스테아르산글리세릴 또는 디스테아르산글리세릴과 같은 시간 지연 물질이 사용될 수 있다. 이들은 또한 방출 조절용 삼투 치료 정제를 형성하도록 코팅될 수도 있다.

[0552] 경구용 용도의 제제는 또한 활성 성분이 불활성 고체 희석제, 예를 들어 탄산칼슘, 인산칼슘 또는 카올린과 혼합되어 있는 경질 젤라틴 캡슐, 또는 활성 성분이 물 또는 유성 매질, 예를 들어 땅콩유, 액체 파라핀 또는 올리브유와 혼합되어 있는 연질 젤라틴 캡슐로 제공될 수 있다.

[0553] 수성 현탁액은 활성 물질을 수성 현탁액을 제조하기에 적합한 부형제와 혼합하여 함유한다. 이러한 부형제는 현탁화제, 예를 들어 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 알긴산나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸트 검 및 아카시아 검; 자연산 포스파미드일 수 있는 분산제 또는 습윤제, 예를 들어 레시틴, 또는 알킬렌 옥시드와 지방산의 축합 생성물, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 에틸렌 옥시드와 장쇄 지방족 알콜의 축합 생성물, 예를 들어 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 또는 에틸렌 옥시드와 지방산으로부터 유도된 부분 에스테르 및 헥시톨의 축합 생성물, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레에이트, 또는 에틸렌 옥시드와 지방산으로부터 유도된 부분 에스테르 및 헥시톨 무수물의 축합 생성물, 예컨대 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레에이트이다. 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 방부제, 예를 들어 에틸, 또는 n-프로필, p-히드록시벤조에이트, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 향미제 및 하나 이상의 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린을 함유할 수도 있다.

[0554] 유성 현탁액은 활성 성분을 식물성유, 예를 들어 아라키스유, 올리브유, 참깨유 또는 코코넛유, 또는 광유, 예컨대 액체 파라핀에 현탁시켜 제형될 수 있다. 유성 현탁액은 증점제, 예를 들어 밀납, 경질 파라핀 또는 세틸 알콜을 함유할 수 있다. 상술된 바와 같은 감미제 및 향미제가 맛있는 제제를 제공하기 위해 첨가될 수도 있다. 이들 조성물은 아스코르브산과 같은 항산화제를 첨가하여 보존할 수 있다.

[0555] 물을 첨가하여 수성 현탁액을 제조하기에 적합한 분산성 산제 및 과립은 활성 성분을 분산 또는 습윤제, 현탁화제 및 하나 이상의 방부제와 혼합하여 함유한다. 적당한 분산 또는 습윤제 및 현탁화제로는 상기 언급된 것들이 예시된다. 추가의 부형제, 예를 들어 감미제, 향미제 및 착색제가 또한 존재할 수도 있다.

[0556] 시럽 및 엘릭시르를 감미제, 예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 소르비톨 또는 수크로스와 함께 제형될 수 있다. 이 제제는 또한 점활제, 방부제, 향미제 및 착색제를 함유할 수도 있다.

[0557] 약학적 조성물은 무균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 상기 언급되어 있는 적합한 분산 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한 비경구적으로 허용가능한 비독성 희석제 또는 용매중의 무균 주사용 용액 또는 현탁액, 예를 들어 1,3-부탄디올 중의 용액일 수도 있다. 사용될 수 있는 적합한 비히클 및 용매는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 추가로, 무균 고정 오일이 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 비롯한 임의의 저자극성 고정 오일이 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사제에 사용된다.

[0558] 본 발명의 화합물은 또한 약물을 직장 투여하기 위한 좌약 형태로 투여될 수도 있다. 이들 조성물은 약물을, 상온에서 고체이나 직장 온도에서 액체가 됨으로써 직장에서 용융하여 약물을 방출할 적합한 무자극 부형제와 혼합하여 제조할 수 있다. 그러한 물질은 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0559] 국소 사용의 경우, 본 발명의 화합물을 함유하는 크림제, 연고, 젤리, 용액제 또는 현탁액 등이 사용된다. (이러한 적용의 목적을 위해, 국소 적용은 구강 세척액 및 가글을 포함한다).

[0560] 세포가 조절의 표적이 되는 대상의 치료에 있어서, 적절한 투약량 수준은 일반적으로 환자 1일 체중 kg당 약 0.01 내지 500 mg일 것이며, 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 바람직하게, 투약량 수준은 1일 약 0.1 내지 약 250 mg/kg; 보다 바람직하게는 1일 약 0.5 내지 약 100 mg/kg일 것이다. 한 적당한 투약량 수준은 1일 약 0.01 내지 250 mg/kg, 1일 약 0.05 내지 100 mg/kg 또는 1일 약 0.1 내지 50 mg/kg일 수 있다. 이 범위 내에서, 투여량은 1일 0.05 내지 0.5, 0.5 내지 5, 또는 5 내지 50 mg/kg일 수 있다. 경구 투여의 경우, 조성물은 바람직하게는 치료할 환자에 대해 증상에 따른 투여량 조절을 위해 1.0 내지 1000 mg의 활성 성분, 특히 1.0, 5.0, 10.0, 15.0. 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0 및 1000.0 mg의 활성 성분을 함유하는 정제 형태로 제공된다. 화합물은 1일 1 내지 4회, 바람직하게는 1일 1 또는 2회 요법으로 투여될 수 있다.

[0561] 그러나, 임의의 특정 환자에 대한 특정 용량 수준 및 투여 빈도는 변동될 있으며, 사용하는 특정 화합물, 그 화합물의 대사 안정성 및 작용 기간, 연령, 체중, 전반적 건강, 성별, 식이, 투여 방식 및 시간, 배출 속도, 약물 배합, 특정 증상의 심각도 및 요법을 받는 숙주를 포함하는 다양한 요인에 따라 달라질 것임은 당연하다.

[0562] 한 실시양태에서, 혈액 분취액을 포유동물 대상, 바람직하게는 인간으로부터 추출하여 혈액 분취액을 생체외에서 본 발명의 접합체로 처리한다. 접합체의 효과는 분취액에 함유된 혈액중 면역 이펙터 세포의 활성을 조절하는 것이다. 이어서, 변형된 분취액을 예방접종에 적합한 임의의 경로에 의해 대상의 신체에 재도입한다.

[0563] 한 측면에서, 대상으로부터 면역 세포를 제거하는 단계, 상기 세포를 체외에서 접합체와 접촉시키는 단계 및 세포를 대상에 재도입하는 단계를 포함하는 방법이 개시된다.

[0564] 한 측면에서, 분취액의 부피는 항응고제(예를 들어, 시트르산나트륨 2 ml)와 함께, 약 400 ml 이하, 약 0.1 내지 약 100 ml, 약 5 내지 약 15 ml, 약 8 내지 약 12 ml, 또는 약 10 ml이다.

[0565] 한 측면에서, 대상은 혈액 분취액을 제거하는 단계, 이 분취액을 상술된 바와 같이 처리하는 단계 및 처리한 분취액을 대상에 재투여하는 단계를 포함하는 개별 치료와 같은 치료 과정을 받는다. 이러한 치료 과정은 처리한 혈액 분취액을 다수의 연속일동안 매일 투여하는 것을 포함할 수 있거나, 지정 기간동안 일차의 매일 치료 과정을 행한 후, 일정한 간격이 지나면 하나 이상의 추가의 매일 치료 과정을 행하는 것을 포함할 수 있다.

[0566] 한 관련 측면에서, 대상에 처리한 혈액의 4 내지 6 분취액을 투여하는 것을 포함하는 초기 치료 과정이 주어진다. 다른 바람직한 실시양태에서, 대상에 처리한 혈액의 2 내지 4 분취액을 투여하는 것을 포함하는 초기 치료 과정이 주어지는데, 임의 쌍의 연속 분취액 투여는 연속일상에 놓여 지거나, 환자에 분취액이 투여되지 않는 1 내지 21일의 휴지 기간으로 분리되며, 이 때 선택한 한 쌍의 연속 분취액을 분리하는 휴지 기간은 약 3 내지 15일이다. 또 다른 관련 측면에서, 초기 치료 과정의 투약량 용법은 제1 및 제2 분취액이 연속일에 투여되고, 제2 및 제3 분취액 투여 사이에 11일의 휴지 기간이 주어지는 총 3의 분취액을 포함한다.

[0567] 다른 한 관련 측면에서, 초기 치료 과정후 추가의 치료 과정이 따른다. 예를 들어, 후속 치료 과정이 초기 치료 과정을 마치고 적어도 약 3주 후에 투입된다. 한 측면에서, 대상은 초기 치료 과정 후에, 처리한 혈액 1 분취액을 30일 마다 6개월간 투여하는 것을 포함하는 제2의 치료 과정을 받게 된다.

[0568] 치료의 연속 과정 사이의 간격은 본 발명의 긍정적인 치료 효과가 유지되도록 하는 것이어야 하며, 개별 대상에서 관측된 반응에 기초해 결정될 수 있음을 인지하도록 한다.

[0569] 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로서 제한하고자 의도되지 않는다.

[0570] **[실시예]**

[0571] **실시예 1: 접합된 항체 또는 펩티드의 생성**

[0572] 핵산 서열(DNA 또는 RNA)의 항-인간 EGFR 항체, 항-인간 HER2 항체 및 항-쥐 neu 항체로의 접합:

[0573] 항체:

[0574] (1) 항-인간 EGFR 항체(키메라)

[0575] (2) 항-인간 HER2/neu 항체

[0576] (3) 항-쥐 neu 항체

[0577] DNA 서열:

[0578] (1) 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)-(서열 번호 1)

[0579] 5' G*G*G GAC GAC GTC GTG G*G*G *G*G*G-3' 인산염

[0580] (*은 포스포로티오에이트 결합이고, 나머지는 포스포디에스테르 결합임)

[0581] 유형=DNA-PS; 크기=21; 엡실론 1/(mMcm)=208;

[0582] MW(g/몰)=6842CpG A; 부류=CpG A; 21.92 μM

[0583] 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)-(서열 번호 2)

[0584] 5' G*G*G GGA GCA TGC TGG*G*G *G*G*G-3' 인산염

[0585] (*은 포스포로티오에이트 결합이고, 나머지는 포스포디에스테르 결합임)

[0586] 유형=DNA-PS; 크기=20; 엡실론 1/(mMcm)=197.6;

[0587] MW(g/몰)=6553; 부류=비-CpG; 18.34 μM

[0588] 플라스미드 DNA

[0589] DpnI+Hha로 100 bp 내지 250 bp의 크기로 절단하여, 90℃에서 불활성화하고, 페놀+클로로포름 및 EtoH 중에서 정제한 플라스미드 DNA(공 플라스미드 DNA 벡터). 정제된 불활성 플라스미드 DNA 단편을 이하 기재된 바와 같은 항체에 접합하였다.

[0590] RNA 서열:

[0591] (1) 올리고리보뉴클레오티드-(서열 번호)

[0592] 5' 인산염 GGG GAC GAC GUC GUG GGG GGG

[0593] (*는 포스포로티오에이트 결합임 - ss RNA로서 안정함)

[0594] siRNA

[0595] 5' UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA-(서열 번호)

[0596] 5' AAUUGUGUAAUGUCCUUCAA-(서열 번호)

[0597] 종양-표적화 펩티드 서열:

[0598] i. -

[0599] CDCRGDCFC(RGD-4C 펩티드)-(서열 번호 3);

[0600] (2) GGCDGRCG-(서열 번호 4)

[0601] CDGRC-(서열 번호 5)

[0602] 500 ㎕의 항체 펩티드 용액을 에펜도르프관에 옮기고, 거기에 540 ㎕의 0.1M 이미다졸(즉, PBS 중에서 0.1M로 희석시킨 3M 이미다졸)을 첨가하였다. 5 mg의 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 염산염(EDC)를 별도의 관에서 CpG DNA(ODN)와 혼합하고, 즉시 항체 이미다졸 또는 펩티드 이미다졸 용액과 혼합하였다(Ab:ODN 몰비 = 1:30.6).

[0603] 튜브를 내용물이 용해될 때까지 와동시키고(vortex), 용액을 잠시동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 250 ㎕의 0.1M 이미다졸을 첨가하고, 생성된 용액을 50℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0604] 비반응 EDC, 그것의 부산물 및 이미다졸을 센트리콘(CENTRICON)® 여과(밀리포어 코포레이션(Millipore Corporation), 미국 메사추세츠주 빌러리카 소재)로 제거하였다. 그 후, 샘플을 SDS-PAGE 겔 및 질량 분석법으로 검정하여 항체 및/또는 펩티드에 대한 뉴클레오티드의 접합을 결정하였다. 단백질 검정을 수행하여, 항체 또는 펩티드 농도를 정량화하였다.

[0605] 핵산의 항체/표적화 부분으로의 접합 방법(도 4)

[0606] SDS-PAGE/면역블롯팅에 따라 DNA- 및 RNA-접합 단클론 항체가 실제로 생성되었음이 입증되었다(도 5).

[0607] **실시예 2: DNA-접합 항-EGFR 항체에 의한 EGFR 활성의 억제**

[0608] HT-29 결장 암종 세포를 항-EGFR 항체 또는 DNA-접합 항-EGFR 항체[항-EGFR Ab-DNA 1(서열 번호 1) 또는 항-EGFR Ab-DNA 2(서열 번호 2)]의 존재 하에 0.5% 소 태아 혈청중에서 배양한 후, 37℃에서 20 분동안 EGF(5 ng/ml)로 자극하였다. 이어서, 세포를 1 mM 나트륨 오르토바나데이트를 함유하는 빙냉 PBS로 세척하고, 포스포-특이적 EGFR(티로신 1068; 세포 시그널링)을 탐지하는 항체를 사용하여 세포 용해물을 웨스턴 블롯 분석에 적용하였다. HT-29 세포를 항-EGFR 항체 또는 DNA-접합 항-EGFR 항체로 처리하여 EGFR의 EGF-자극 인산화를 억제하였다(도 6).

[0609] **실시예 3: DNA/RNA-접합 항 EGFR 항체에 의한 수지상 세포의 성숙**

[0610] 인간 단핵구를 골수 단핵 세포에서 분리한 후, AIM5 배지(10% 인간 AB 혈청 포함) 및 하기의 것들 중 하나에서 6일 동안 배양하였다: (1) RANKL 1 ㎍/ml +TNF-α 20 ng/ml + GM-CSF 800 U/ml + IL-4 500 U/ml의 사이토카인 조합; (2) CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 서열 번호 1(DNA)(5 ㎍/ml)(사이토카인 부재); 또는 (3) DNA-접합 항-EGFR 항체(EGFR Ab-DNA)(5 ㎍/ml)(사이토카인 부재). 7일째 세포를 수거하고, MHC I형 PE, MHC II형 FITC 및

CD86-PE 에 대한 항체로 염색하였다. 성숙 마커 CD86의 세포 표면 발현 증가를 유세포분류 분석법으로 분석하여, 수지상 세포(DC)의 성숙을 평가하였다. DNA-접합 항-EGFR 항체는 사이토카인 칵테일에 의해 관찰된 것과 유사한 CD86 발현(즉, DC의 성숙)을 유도하였다(도 7). 항-EGFR Ab-DNA 2(서열 번호 2), 항-EGFR Ab-플라스미드 DNA 및 항-EGFR Ab-RNA 접합체에서도 유사한 결과가 얻어졌다.

[0611] **실시예 4: DNA-접합 항-EGFR 항체 또는 DNA-접합 항-HER2 항체는 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 의한 사이토카인[인터페론-γ(INF-γ) 및 Apo2L/TRAIL]의 발현을 유도한다**

[0612] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 항-인간 EGFR 항체(항-EGFR Ab) 5 ㎍/ml, 항-인간 HER2 항체(항-HER2 Ab) 5 ㎍/ml, 올리고데옥시뉴클레오티드 서열 번호 1(DNA) 5 ㎍/ml 또는 DNA-접합 항체[항-EGFR 항체-DNA(항-EGFR Ab-DNA) 또는 항-HER2 항체-DNA(항-HER2 Ab-DNA) 5 ㎍/ml]로 처리하였다. PBMC 상등액 중 사이토카인(INF-γ 또는 Apo2L/TRAIL)의 수준을 24 시간 후 ELISA로 평가하였다(pg/ml). PBMC를 DNA(서열 번호 1) 또는 DNA 접합 항체로 처리함으로써 세포 상등액 중에 가용성 INF-γ 또는 Apo2L/TRAIL의 발현이 증가되었다(도 8). 항-EGFR Ab-DNA 2(서열 번호 2)에서도 유사한 결과가 얻어졌다.

[0613] **실시예 5: DNA-접합 항-EGFR 항체에 의한 자연 살해 세포의 활성화**

[0614] 정상 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(존슨스 홉킨스 백혈구 성분 채집술 연구소(Johns Hopkins leucopheresis Unit))를 DNA-접합 항-EGFR 항체[항-EGFR Ab-DNA 1(서열 번호 1)] 또는 EGFR Ab(대조군)(4 ㎍/ml) 중 어느 하나로 3일간 처리하거나, 처리하지 않은 채로 방치하였다. 세포를 항-CD56 피코에리트린(CD56 PE) 및 항-CD8 FITC(CD8 FITC)로 표지한 후, 유세포분류 분석법으로 분석하였다. PBMC는 EGFR Ab-DNA 1 접합체로 자극한 후 $CD56^+$ 세포수가 증가하였음을 보여주었다(도 9).

[0615] **실시예 6: DNA- 또는 RNA-접합 항-EGFR 항체에 의한 증가된 MHC 발현**

[0616] 정상 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(존슨스 홉킨스 백혈구 성분 채집술 연구소)를 DNA-접합 항-EGFR 항체[항-EGFR Ab-플라스미드 DNA] 또는 EGFR Ab-RNA(서열 번호) 또는 EGFR Ab(대조군)(4 ㎍/ml) 중 어느 하나로 3일간 처리하거나, 처리하지 않은 채로 방치하였다. 세포를 항-HLA II형(DR)로 표지한 후, 유세포분류 분석법으로 분석하였다. PBMC는 EGFR Ab-플라스미드 DNA 또는 EGFR Ab-RNA 접합체로 자극한 후 DR^+ 세포 백분율이 증가하였음을 보여주었다(도 10).

[0617] **실시예 7: DNA-접합 항-EGFR 항체 또는 DNA-접합 항-HER2 항체에 의한 종양 세포 내 Apo2L/TRAIL의 유도**

[0618] EGFR-발현 MDA-MB468 세포를 EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2) 또는 EGFR Ab(대조군)(5 ㎍/ml)로 3일 동안 처리하였다. HER2-발현 SKBr-3 세포를 HER2 항체-DNA 접합체(HER2 Ab-DNA 서열 번호 1 또는 HER2 Ab-DNA 서열 번호 2) 또는 HER2 Ab(대조군)(5 ㎍/ml)로 3일 동안 처리하였다. 세포 중 Apo2L/TRAIL의 수준을 정량적 PCR 후 24, 48 및 72시간에 평가하였다. Apo2L/TRAIL 발현이 EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2)로의 처리에 의해 EGFR-발현 종양 세포(MDA-MB468)에서 유도되었고, HER2 항체-DNA 접합체(HER2 Ab-DNA 서열 번호 1 또는 HER2 Ab-DNA 서열 번호 2)로의 처리에 의해 HER2/neu-발현 종양 세포(SKBr-3)에서 유도되었다(도 11).

[0619] **실시예 8: DNA-접합 항체는 신규 형태의 표적 종양 세포사-세포 과융합을 유도하고, 이는 비접합 항체 또는 임의의 공지된 부류의 항암제에 의해서는 관찰되지 않는다**

[0620] EGFR 발현 인간 결장암 세포(HT-29)를 항-EGFR 항체(항-EGFR Ab) 또는 EGFR 항체-DNA 접합체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2) 또는 유리 올리고데옥시뉴클레오티드(DNA)(5 ㎍/ml)의 존재 하에 플레이팅하였다(5×10^4 세포/ml). 세포를 위상차 및 경시적 현미경으로 96시간 동안 검사하였다. DNA-접합 항-EGFR 항체로의 처리로 HT-29 세포의 융합이 유도되었으며, 수명이 보다 짧고 복제능이 손상된(과융합) 합체(하이브리드 또는 다핵화) 세포가 형성되었는데, 이는 EGFR Ab 또는 유리 DNA에서는 관찰되지 않았다(도 12). HT29 세포 배양 플레이트는 EGFR 항체 또는 비접합 핵산으로의 처리가 아닌, EGFR 항체-DNA 접합체로의 처리에 의한 직접적 사멸(콜로니 형성의 손실 동반)의 유도를 나타냈다(도 13).

[0621] EGFR 발현 인간 유방암 세포(MCF-7 또는 MDA-MB-468)를 항-EGFR 항체(항-EGFR Ab)(2 내지 8 ㎍/ml) 또는 DNA-접합 항-EGFR 항체(EGFR Ab-DNA 서열 번호 1 또는 EGFR Ab-DNA 서열 번호 2)(2 내지 4 ㎍/ml) 또는 유리 올리고데옥시뉴클레오티드(DNA)(4 ㎍/ml)의 존재 하에 플레이팅하였다(5×10^4 세포 /ml). DNA-접합 항-EGFR 항체의 처리로 유방암 세포의 과융합이 유도되었으며, 모(비접합) 항-EGFR 항체로 처리한 세포에 비해 수명 및 복제능

이 보다 짧아진 합체 세포체가 형성되었다(도 14). 세포 배양 플레이트는 EGFR 항체 또는 비접합 핵산으로의 처리가 아닌, EGFR 항체-DNA 접합체로의 처리에 의한 직접적 사멸(콜로니 형성의 손실 동반)의 유도를 나타냈다(도 15).

[0622] HER2/neu-발현 인간 유방암 세포(SKBr 또는 MCF-7)를 항-인간 HER2/neu 항체(항-HER2/neu Ab) 또는 DNA-접합 항-HER2/neu 항체(항-HER2/neu Ab-DNA 1; 서열 번호 1 또는 항-HER2/neu Ab-DNA 2; 서열 번호2)(5 ㎍/ml)의 존재 하에 플레이팅하였다(5×10^4 세포/ml). 세포 생존/증식을 위상차 현미경으로 평가하였다. DNA-접합 항-HER2/neu 항체의 처리로 유방암 세포의 과융합이 유도되었으며, 수명 및 복제능이 보다 짧은 합체 세포체가 형성되었는데, 이는 모 항-HER2/neu 항체로 처리한 세포에서는 관찰되지 않았다(도 16).

[0623] 마우스 neu-발현 유방암 세포(NT2 세포)를 항-neu 항체(항-neu Ab) 또는 DNA 접합 항-neu 항체(항-neu Ab-DNA1; 서열 번호 1)(5 ㎍/ml)의 존재 하에 플레이팅하였다(5×10^4 세포/ml). 세포 생존/증식을 위상차 현미경 및 트립판-블루 염료 배제 분석으로 평가하였다. DNA-접합 항-neu 항체의 처리로 마우스 neu-발현 유방암 세포(NT2)의 과융합이 유도되었으며, 수명 및 복제능이 감소된 합체 세포체가 형성되었다. 여기에서도, 비접합 항체 또는 DNA에 의해서는 상기 과융합 및 세포사는 유도되지 않았다(도 17).

[0624] **실시예 9: DNA-접합 항-EGFR 항체는 EGFR-발현 종양 세포의 면역 세포-매개 용해를 유도한다**

[0625] HT-29 결장 암종 세포를 ^{3}H-티미딘(2.5 μCi/ml)으로 표지하고, 트립신 처리한 후, PBS로 세척하고, EGFR-Ab 또는 EGFR Ab-DNA 1(서열 번호 1) 또는 유리 DNA(4 ㎍/ml)으로 처리하여, 96-웰 플레이트(5×10^3 세포/웰)에서 PBMC와 함께 E:T 비를 변화시켜가면서 37℃에서 4시간 내지 72시간 동안 삼중으로 공배양하였다. 세포를 여과지 상에서 수거하여, 세포사/생존율을 백분율의 특이적 ^{3}H-티미딘 방출율로 정량화하였다. EGFR-Ab에 비해, EGFR Ab-DNA로의 처리는 4시간에 걸쳐 HT-29 세포의 더욱 급속한 사멸을 초래하였다(도 18A). HT-29 세포를 EGFR-Ab 또는 DNA로 처리하는 것과 대조적으로, HT-29 세포를 EGFR Ab-DNA와 함께 배양함에 의해 72시간에 걸쳐 HT-29 세포의 제거가 초래되었다(PBMC:종양 세포 비=25)(도 18B).

[0626] **실시예 10: DNA 접합 항-EGFR 항체는 누드 마우스에서의 인간 EGFR$^+$ 결장암 이종이식편의 성장을 억제한다**

[0627] BALB/c 누드 마우스에 HT-29 인간 결장암 세포를 피하로 주입하였다(4×10^6). 종양 접종 5일 후, 마우스에 항-EGFR 항체 또는 DNA-접합 항-EGFR 항체(EGFR Ab-DNA 1-서열 번호 1)를 투여하거나(20 ㎍을 3주간 주 2회 종양 주위에 투여함), 투여하지 않은 채로 방치하였다. 종양 크기 및 체적의 분석으로 EGFR Ab-DNA의 투여 후, 종양 성장이 비접합 모 항-EGFR 항체의 경우보다 현저히 억제된 것으로 나타났다(도 19A 및 19B). EGFR Ab의 일시적 효과와 대조적으로, EGFR Ab-DNA로의 처리에 의한 종양 성장의 억제가 12개월 초과 동안 지속되었다.

[0628] **실시예 11: DNA 접합 항-neu 항체는 동계 FVB 마우스에서의 Neu+ 종양의 성장 및 HER2/neu 유전자도입 마우스에서의 자발적 종양의 성장을 억제한다**

[0629] FVB 마우스에 NT2 neu+ 유방암 세포(4×10^6)를 동시에 주입하였다(4×10^6). 종양 접종 5일 후, 마우스에 항-Neu 항체 또는 DNA-접합 항-Neu 항체(Neu Ab-DNA 1-서열 번호 1)를 투여하거나(20 ㎍을 3주간 주 2회 종양 주위에 투여함), 투여하지 않은 채로 방치하였다. 종양 크기 및 체적의 분석으로 Neu Ab-DNA의 투여 후, 종양 성장이 비접합 모 항-EGFR 항체의 경우보다 현저히 억제된 것으로 나타났다(도 20).

[0630] 자발적 유방 암종을 지니는 Neu(neu/N)-유전자도입 마우스에 DNA-접합 항-neu 항체(Neu Ab-DNA 1-서열 번호 1)를 투여하거나(100 ㎍를 2주간 주 2회 복강내로 또는 50 ㎍을 2주간 주 2회 종양내에 투여함), 처리하지 않은 채로 방치하였다. 종양 크기 및 체적의 분석으로 DNA-접합 항-neu 항체 투여 후, 종양 성장이 현저히 억제되고, 종양 체적이 감소된 것으로 나타났다(도 21A 및 21B).

[0631] 본 발명이 상기 실시예를 참조하여 기재되었으나, 본 발명의 취지 및 범주 내에 변형 및 변화가 포괄되는 것으로 이해하도록 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구범위에 의해서만 제한된다.

SEQUENCE	SEQ ID NO:
5' pUGGAUCCGGCUUUGAGAUCUU	56
5' ppGGGAGACAGGGGUGUCCGCCAUUUCCAGGUU	57
5' pppGGGAGACAGGCUAUAACUCACAUAAUGUAUU	58
5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUUU	59
5'-UGUGU-3'	60
5'-UGU-3'	61
5'- CUACACAAAUCAGCGAUUU	62
3'-GAUGUGUUUAGUCGCUAAA	63
5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUA	64
3'-AACUACACAAAUCAGCGAU	65
5'-GAUUAUGUCCGGUUAUGUA	66
3'-CUAAUACAGGCCAAUACAU	67
5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG	68
3'-UACAUAACCGGACAUAAUC	69
5'-GGUCGGAAUCGAAGGUUUA	70
3'-CCAGCCUUAGCUUCCAAAU	71
5'-GGUCGGAGCUAAAGGUUUA	72
3'-CCAGCCUCGAUUUCCAAAU	73
5'-CAGCUUUGUGUGAGCGUAU	74
3'-GUCGAAACACACUCGCAUA	75
5'-GUCCUUCAA-3'	76
5'-GUCCUUCAA-3'	77
5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAAdTdT-3'	78
5'-UUGAAGGACAGGUUAAGCUdTdT-3'	79
5'-ACCUGUCCUUCAAUUACCAdTdT-3'	80
5'-UGGUAAUUGAAGGACAGGUdTdT-3'	81
5'-AAAAAAAACUGUCCUUCAA	82
5'- AAAAAAAAAUGUCCUUCAA	83
5'- AAAAAAAAAAGUCCUUCAA	84
5'-UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA	85
5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAA	86
5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAACUACA CAAAUUGAAGGACAGGUUAAGCU	87
5'- GGACUGCGUUCGCGCUUUCC-3'	88
5'- GGCUUAUCCAUUGCACUCCGGA-3'	89
5'-ACGAAGGUGGUUUUCCCAG-3'	90
5'- UUUGUGGUAGUGGGGGACUG-3'	91
5'-GUAGUGUUUGUGGGGGACUG-3'	92
5'- GUAGUGGGGGACUGUUUGUG-3'	93
5'-GGACUGCGUUGUGGCUUUCC-3'	94
5'-GAUACUUACCUG-3'	95
5'-AAUUUGUGG-3'	96
5'- AAUUUUUGA-3'	97
5'- RAUxGR-3'	98
5'- GACUAGCUUGCUGUUU-3'	99
5'- GACUAGCCUUU-3'	100
G*G*TGCATCGATGCAG*G*G*G*G*G	101
TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT	102
TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG	103
5'-TCGXCGX	104
5'-TCGXTCG	105
5'TCGACGT	106
5'TCGATCG	107
T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T	108
T*C*C*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T	109
5'-pppAGCUUAACCUGUCCUUCAA-3'	110
5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	111
5'-pppGGGGAUGAACUUCAGGGUCAGCUU-3'	112

[0632]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	113
3'- UUCGACUGGGACUUCAAGUAGGGGppp-5'	114
5'-GGUGCAUCGAUGCAGGGGGG	115
5'-GGUGCUUCGUUGCAGGGGGG	116
5'-GGUGCUUCGAUGCAGGGGGG	117
5'-GGUGCUACGUUGCAGGGGGG	118
5'-TCATCATTTTGT CATTTTGTCATT	119
5'-TCATTATTTTGT TATTTTGTCATT	120
5'-TCATCCTTTTGT CCTTTTGTCATT	121
5'-TCATCTTTTTGT CTTTTTGTCATT	122
5'-TCATCAATTTGT CAATTTGTCATT	123
5'-TCATCATCTTGT CATCTTGTCATT	124
5'-TCATCATGTTGT CATGTTGTCATT	125
5'-TCATCATTCTGT CATTCTGTCATT	126
5'-TCATCATTGTGT CATTGTGTCATT	127
5'-TCATCATTTGGT CATTTGGTCATT	128
5'-TCATTTTTTTGT TTTTTTGTCATT	129
5'-TCATTGTTTTGT TGTTTTGTCATT	130
5'-TCATTCTTTTGT TCTTTTGTCATT	131
5' – AAG AGG TGG TGG AGG AGG TGG TGG AGG AGG TGG AGG-3'	132
5' – TTG AAT TCC TAG TTT CCC AGA TAC AGT-3'	133
5'- TCG GTA ACG GG-3'	134
5' – TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3'	135
5' – CGTTA-3'	136
5' – GCCACTGC-3'	137
5'- GCAGTGGC-3'	138

Pathogen Sequences	SEQ. ID NOS.
Bacillus anthracis: Protective Antigen	139

atgaaaaaacgaaaagtgttaataccattaatggcattgtctacgatattagtttcaagcacaggtaatttagaggtgat
tcaggcagaagttaaacaggagaaccggttattaaatgaatcagaatcaagttcccaggggttactaggatactatttta
gtgatttgaattttcaagcacccatggtggttacctcttctactacaggggatttatctattcctagttctgagttagaa
aatattccatcggaaaaccaatattttcaatctgctatttggtcaggatttatcaaagttaagaagagtgatgaatatac
atttgctacttccgctgataatcatgtaacaatgtgggtagatgaccaagaagtgattaataaagcttctaattctaaca
aaatcagattagaaaaaggaagattatatcaaataaaaattcaatatcaacgagaaaatcctactgaaaaaggattgga
t
ttcaagttgtactggaccgattctcaaaataaaaaagaagtgatttctagtgataacttacaattgccagaattaaaaca
aaaatcttcgaactcaagaaaaaagcgaagtacaagtgctggacctacggttccagaccgtgacaatgatggaatcc
ctg
attcattagaggtagaaggatatacggttgatgtcaaaaataaaagaacttttctttcaccatggatttctaatattcat
gaaaagaaaggattaaccaaatataaatcatctcctgaaaaatggagcacggcttctgatccgtacagtgatttcgaaa
a
ggttacaggacggattgataagaatgtatcaccagaggcaagacacccccttgtggcagcttatccgattgtacatgta
g
atatggagaatattattctctcaaaaaatgaggatcaatccacacagaatactgatagtcaaacgagaacaataagtaa
a
aatacttctacaagtaggacacatactagtgaagtacatggaaatgcagaagtgcatgcgtcgttctttgatattggtgg
gagtgtatctgcaggatttagtaattcgaattcaagtacggtcgcaattgatcattcactatctctagcaggggaaagaa
cttgggctgaaacaatgggtttaaatacccgctgatacagcaagattaaatgccaatattagatatgtaaatactgggacg
gctccaatctacaacgtgttaccaacgacttcgttagtgttaggaaaaaatcaaacactcgcgacaattaaagctaagg
a
aaaccaattaagtcaaatacttgcacctaataattattatccttctaaaaacttggcgccaatcgcattaaatgcacaag
acgatttcagttctactccaattacaatgaattacaatcaatttcttgagttagaaaaaacgaaacaattaagattagat
acggatcaagtatatgggaatatagcaacatacaattttgaaaatggaagagtgagggtggatacaggctcgaactg
gag
tgaagtgttaccgcaaattcaagaaacaactgcacgtatcatttttaatggaaaagatttaaatctggtagaaaggcgga
tagcggcggttaatcctagtgatccattagaaacgactaaaccggatatgacattaaaagaagcccttaaaatagcattt
ggatttaacgaaccgaatggaaacttacaatatcaagggaaagacataaccgaatttgattttaatttcgatcaacaaac
atctcaaaatatcaagaatcagttagcggaattaaacgcaactaacatatatactgtattagataaaatcaaattaaatg

[0633]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
caaaaatgaatatttttaataagagataaacgttttcattatgatagaaataacatagcagttggggcggatgagtcagta gttaaggaggctcatagagaagtaattaattcgtcaacagagggattattgttaaatattgataaggatataagaaaaat attatcaggttatattgtagaaattgaagatactgaagggcttaaagaagttataaatgacagatatgatatgttgaata tttctagtttacggcaagatggaaaaacatttatagattttaaaaaatataatgataaattaccgttatatataagtaat cccaattataaggtaaatgtatatgctgttactaaagaaaacactattattaatcctagtgagaatggggatactagtac caacgggatcaagaaaattttaatcttttctaaaaaaggctatgagataggataa	
Protein	140
MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGNLEVIQAEVKQENRLLNESESSSQGLLGY YFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELE NIPSENQYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKAS NSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKLYWTDSQNKKEVISSDNL QLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRT FLSPWISNIHEKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEAR HPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSTSRTHTSEV HGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLN TADTARLNANIRYVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQI LAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTKQLRLDTDQ VYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRI AAVNPSDPLETTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFD QQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAV GADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVIN DRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTII NPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG	
AhpC TSA	141
atgttattaatcggcacagaagtaaaaccgtttaaagctaatgcttaccataatggagaatttatccaagttactgacga aagtttaaaaggaaaatggagtgtagtttgtttctacccagctgacttcacattcgtttgcccaactgaacttgaagact tacaaaaccaatatgcaactcttaaagagttaggcgttgaagtatactctgtatctacagacactcacttcactcacaaa gcatggcatgatagctcagaaactatcggtaaaatcgagtacatcatgattggtgacccaactcgcacaatcactacaa a cttcaacgttttaatggaagaagaaggtcttgctgctcgtggtacattcatcatcgatccagacggtgttatccaatcta tggaaatcaatgctgacggtatcggccgtgacgcaagcattcttgttaacaaaattaaagcagctcaatacgtacgtaa c aacccaggtgaagtttgcccagctaaatggcaagagggttctgctacacttaaaccaagccttgaccttgtaggcaaa at ctaa	
Protein	142
MLLIGTEVKPFKANAYHNGEFIQVTDESLKGKWSVVCFYPADFTFVCPTE LEDLQNQYATLKELGVEVYSVSTDTHFTHKAWHDSSETIGKIEYIMIGDPT RTITTNFNVLMEEEGLAARGTFIIDPDGVIQSMEINADGIGRDASILVNKIK AAQYVRNNPGEVCPAKWQEGSATLKPSLDLVGKI.	
Alanine Racemase	143
atggaagaagcaccattttatcgtgacacttgggtggaagtggatttagatgccatttataacaacgttacacatattaa agaatttatcccgagtgatgtagaaatttttgccgttgttaaagggaatgcatatgggcacgattatgtaccggtggcta aaatagcattagaagcgggggcgacaaggttagcagttgcgttcttagatgaagctttagtgcttcgaagagctggtat t actgcgccaattttggtgttaggtccttctcctcctcgtgatataaatgtagctgctgaaaatgatgtagcattaactgt ttttcaaaaggaatgggtagatgaagcaatcaaactttgggatggttcgtctacgatgaaataccatattaatttcgata gtggtatggggagaattggaatacgtgaacgtaaagaattaaaaggatttttaaaaagcttagaaggtgcaccattctta gagttggaaggagtttatacgcattttgcaacagcagatgaggtggagacttcttactttgataagcaatataacacatt tttggagcagttaagttggttgaaagaattcggagtggatcctaagtttgttcatacagctaatagtgctgcaacgctac gttttcaagggattacatttaatgcagtacgaattggcattgcgatgtatgggttatctccatctgtagaaatacgccct tttttaccgtttaaattagaaccagcgctatcattgcatacgaaagttgctcatatttaaacaggtgattaaaggggatgg aattagttataacgtcacttatcgaacgaaaactgaagaatggattgcgaccgttgcaattggttatgcagatggctggc	

[0634]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
ttagaagattacaaggatttgaagtacttgtaaatggtaaaagggtaccgattgtagggcgagtaacgatggatcaatt c	
atgattcaccttccttgtgaagtgcctcttggtacgaaagttacactcattggaaggcaaggagatgaatatattagcgc tacagaggttgcggaatattcagggactattaattatgaaattattacgacgatcagttttcgtgtgccgagaatattta tacggaatggaaaagttgtggaagtaattaattatttgaacgatatatag	
Protein	144
MEEAPFYRDTWVEVDLDAIYNNVTHIKEFIPSDVEIFAVVKGNAYGHDYV PVAKIALEAGATRLAVAFLDEALVLRRAGITAPILVLGPSPPRDINVAAEN DVALTVFQKEWVDEAIKLWDGSSTMKYHINFDSGMGRIGIRERKELKGFL KSLEGAPFLELEGVYTHFATADEVETSYFDKQYNTFLEQLSWLKEFGVDP KFVHTANSAATLRFQGITFNAVRIGIAMYGLSPSVEIRPFLPFKLEPALSLH TKVAHIKQVIKGDGISYNVTYRTKTEEWIATVAIGYADGWLRRLQGFEVL VNGKRVPIVGRVTMDQFMIHLPCEVPLGTKVTLIGRQGDEYISATEVAEY SGTINYEIITTISFRVPRIFIRNGKVVEVINYLNDI.	
LSU Ribosomal Protein 12P	145
atgactaaagaacaaatcattgaagcagttaaatctatgactgtattagaacttaacgacttagtaaaagctatcgagga agaattcggcgtaactgctgctgctcctgtagctgttgctggtggcgctggagaagctgctgctgagaaaactgaattt g	
atgtggaactaactagcgctggtgcacaaaaaatcaaagttatcaaagttgttcgtgaaatcactggtcttggcttaaaa gaagctaaagaattagttgacaacactccaaaagtaatcaaagaagctgctgctaaagaagaagctgaagaaatcaa agc	
taaacttgaagaagttggcgctgctgtagaagttaagtaa	
Protein	146
MTKEQIIEAVKSMTVLELNDLVKAIEEEFGVTAAAPVAVAGGAGEAAAE KTEFDVELTSAGAQKIKVIKVVREITGLGLKEAKELVDNTPKVIKEAAAKE EAEEIKAKLEEVGAAVEVK.	
Oligopeptide ABD Transporter	147
atgaagaaaaagatgaagaagttcacggcagttgtagcgcctgttttagcgatgagtgtggcgttgacagcttgttctg g	
atctggtggggagaagaaatcaactacgacgtctagtggtggtggggaagagaaaaagtctgaaattaaatacgca gcga	
aacaagtgttaaatcgtacagagaatcaagagattccgacgatggatgtttcaaaatctaccgatacattaggttctcaa attttagggaacacgatggaaggtttatatcgattagataaagataataagccaatcccagctgcagcagaatctagta c	
gaaaagcgaggatggcaaaaaatatacatttaaattacgtaaagatgcaaaatggtcaaatggtgatcctgtaacagc ga	
aagatttcgtatatgcatggcagcgcttacttgataaaaatacagcggcagaatatgcatttattgcttactatattaaa	
aacgcagaggcaattaataaaggtgaaaaaccactaacagatttaggagcaaaagcggtagatgattatacgctaga agt	
agaattagagaaaccagtaccatatttcttgaatttaatggcattcccatcttactatcctttaaatgaaaagttcgtaa	
aagaaaaaggagataaattcggtttagaagcagatacaacgttgtataacggaccgttcgttatggcttcatggaaaca t	
gaacaaggatggcagctaaagaaaaatgataagtactgggataataagactgtaaaattagaagaaattaactatagt gt	
agtaaaagaagttgcgacgaaagtaaacttatatgatacaggatcaattgatttcacgttattatcaggagaattcgttg	
ataaatataaatcgaacaaagaagagtacggcgagtattcggaagcaagtacattcttcttacgtttaaatcaaaagcgt	
aacggacaagatacaccgttaaagagcaaaaaacttcgtgaagcgatcgcattatcaattgataaaaaaggattagca ac	
cgttattttaaataacggttcaaaagcaacagatcaattagtaccaaaagggcttgcgacaggaccagacggtaaaga ct	
accaagatacgtttaaaaatggtctaaaatatgatccgaaaaaaggtgcagcagcttgggaagaagcgaaaaaagaa ctt	
ggaaaagatcaagtgacaattgaattactaagctatgatgatggaactgcgaaaaaaattgctgactactttaaagatc a	
aattgagaaaaacttaaaaggtgtaacggttaacacgaaaattcaaccgttcaaacaaaaactaaaattagagtcagca c	

[0635]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
aagattatgaagtttcgtttgcaggttggagtccagattattcggatccaatgacatttattgatatgtttgaatcgaag agcccatataaccaaatgagttattcgaatccaaaatatgatgaaatggtagcgaaagcaggtaatgaattactgtctg a tccgaagaagcgttgggaaacgttaggaaaagcagagaaattattccttgaagaagatgcaggattagttccttttatat c aaacaggaagagcgtatgtaatgaaaccgaatgtaaaaggaattgtgaaacataacattagtccagaatatagctttaa g tgggcttatgtaacggaaggtaaataa	
Protein MKKKMKKFTAVVAPVLAMSVALTACSGSGGEKKSTTTSSGGGEEKKSEI KYAAKQVLNRTENQEIPTMDVSKSTDTLGSQILGNTMEGLYRLDKDNKPI PAAAESSTKSEDGKKYTFKLRKDAKWSNGDPVTAKDFVYAWQRLLDKN TAAEYAFIAYYIKNAEAINKGEKPLTDLGAKAVDDYTLEVELEKPVPYFL NLMAFPSYYPLNEKFVKEKGDKFGLEADTTLYNGPFVMASWKHEQGWQ LKKNDKYWDNKTVKLEEINYSVVKEVATKVNLYDTGSIDFTLLSGEFVD KYKSNKEEYGEYSEASTFFLRLNQKRNGQDTPLKSKKLREAIALSIDKKG LATVILNNGSKATDQLVPKGLATGPDGKDYQDTFKNGLKYDPKKGAAA WEEAKKELGKDQVTIELLSYDDGTAKKIADYFKDQIEKNLKGVTVNTKIQ PFKQKLKLESAQDYEVSFAGWSPDYSDPMTFIDMFESKSPYNQMSYSNPK YDEMVAKAGNELLSDPKKRWETLGKAEKLFLEEDAGLVPLYQTGRAYV MKPNVKGIVKHNISPEYSFKWAYVTEGK.	148
Aldehyde dehydrogenase	149
atgagtcaactagctgtaaatcttcatgaaaaggtagaaaagtttcttcaaggtacgaaaaagttatatgtgaatggatc attcattgaaagcgcttccggtaagacgtttaatacacctaatccagcaactggcgaaacacttgccgtcgtttctgaag ccggtcgcgaagatattcataaagctgtagttgcagctcgcatggcttttgacgaaggtccttggtctcgcatgagcac t gcggagcgaagccgtcttatgtacaagttagctgatttaatggaagaacataaagaagagcttgcacagctcgagac gtt agataacggaaagccaatccgtgaaacaatggcagcagacataccacttgcaattgagcacatgcgctattatgctg gct gggcgacgaaaatcgttggtcaaacaatccctgtttccggtgatttctttaactatacacgccatgaagctgttggtgtc gttggtcaaattatcccttggaacttcccgcttcttatggccatgtggaaaatgggagcagcgcttgctacaggatgtac aatcgttttaaaacctgcagaacaaactccactatctgctctatacttagctgaattaattgaagaagctggattcccga aaggcgttattaatatcgttcctggattcggtgaatcagctggacaagctctcgttaatcatccactcgttgataaaatt gcatttaccggttctactccagtcggtaaacaaattatgcgacaagcatctgaatccttgaaacgtgttactttagagct tggtggtaaatcaccgaacattattttaccagacgctgatttatctcgcgcaattcctggtgcactttctggtgttatgt ttaaccaagggcaagtatgctctgctggatcacgcctatttgttccgaagaaaatgtatgataatgtcatggctgatctc gtcctctattctaaaaaactaaatcaaggtgtcggtcttgaccctgaaacgacaattggtcctctcgtttccgaagaaca acaaaaacgtgtaatgggctacattgaaaaagggattgaagaaggcgctgaagtactttgcggaggaaataatccatt cg atcaaggctacttcatttctcctacagtattcgctgacgtaaatgacgaaatgacaatcgcaaaagaagaaattttcggt ccagttatttctgcaatacctttaacgatattgatgaagtaattgaacgagcaaataaatcacaattcggcttagcggc tggtgtgtggacagaaaatgttaaaacagcacactatgttgcaagtaaagtacgtgcaggtacagtatgggttaactgt t acaacgtctttgatgcagcatctccatttggaggatttaaacaatctggtctcggccgtgaaatgggatcttacgcatta aataactatacagaagtgaagagcgtttggcttaacttaaattaa	
Protein MSQLAVNLHEKVEKFLQGTKKLYVNGSFIESASGKTFNTPNPATGETLAV VSEAGREDIHKAVVAARMAFDEGPWSRMSTAERSRLMYKLADLMEEHK EELAQLETLDNGKPIRETMAADIPLAIEHMRYYAGWATKIVGQTIPVSGDF FNYTRHEAVGVVGQIIPWNFPLLMAMWKMGAALATGCTIVLKPAEQTPL SALYLAELIEEAGFPKGVINIVPGFGESAGQALVNHPLVDKIAFTGSTPVG KQIMRQASESLKRVTLELGGKSPNIILPDADLSRAIPGALSGVMFNQGQVC SAGSRLFVPKKMYDNVMADLVLYSKKLNQGVGLDPETTIGPLVSEEQQK RVMGYIEKGIEEGAEVLCGGNNPFDQGYFISPTVFADVNDEMTIAKEEIFG PVISAIPFNDIDEVIERANKSQFGLAAGVWTENVKTAHYVASKVRAGTVW VNCYNVFDAASPFGGFKQSGLGREMGSYALNNYTEVKSVWLNLN.	150

[0636]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
ATP Synthase Family	151
atgaataaagggcgcgttacgcaaatcatgggtccggttgtagacgttaagtttgatggcggaaagctaccagaaatc ta caacgcccttacggtaaaacagagcaacgaaaacggaacaagcattaacttaacatttgaagttgcacttcatttaggt g atgacacagttcgtacagttgcaatgtcttccacagatggacttgttcgtggcacagaagtagaagatactggtaaagc a atctctgtaccagttggtgatgcaacacttggtcgtgtatttaacgtattaggtgatgcaattgacttagatggtgaggt tcctgcggatgtacgtcgtgatccaattcaccgtcaagcacctgcattcgaagaattatctactaaagtagaaattcttg aaactggtattaaagtagtagacttacttgctccttacattaagggtggtaagatcggtctattcggtggtgccggtgta ggtaaaacggtattaattcaggaattaatcaataacatcgcacaagaacacggtggtatctctgtattcgctggtgtagg tgagcgtactcgtgagggtaatgacttataccacgaaatgagcgattctggcgtaattaagaaaactgcgatggtattc g gacaaatgaacgagccacctggagcacgtcaacgtgttgcgttaacaggtttaacaatggctgagcatttccgtgatg ag caaggacaagatgtacttctgttcatcgataatatcttccgtttcacgcaagcaggttctgaagtatctgcccttcttgg ccgtatgccatctgcggtaggttaccaaccaacacttgcaacagaaatgggtcaattacaagagcgtattacatctaca a ataaagggtctatcacgtctatccaagcggtatatgtaccagccgatgactatactgacccagcaccagctacaacgtt c gctcacttagatgcaacaacaaacttagagcgtcgtttaacacaaatgggtatttacccagccgtagatccattagcatc tacatctcgtgcactttctccagaaatcgtaggagaagagcattatgaagtggctcgtcaagtacagcaaactttacaa c gctacaaagagcttcaagatatcatcgctatcttaggtatggatgagttatctgaagaagataagttagttgtacatcgt gctcgtcgtattcaattcttcttatctcaaaacttccacgtagcggagcagtttacaggtcaaaaaggttcttatgtacc tgtaaaagaaacagttcgtggtttcaaagaaattctagaaggaaaatatgatgaccttccagaagatgcattccgcttag ttggtggcattgaagaagttattgaaaacgcgaagaaaatgatggcgtaa	
Protein MNKGRVTQIMGPVVDVKFDGGKLPEIYNALTVKQSNENGTSINLTFEVAL HLGDDTVRTVAMSSTDGLVRGTEVEDTGKAISVPVGDATLGRVFNVLGD AIDLDGEVPADVRRDPIHRQAPAFEELSTKVEILETGIKVVDLLAPYIKGG KIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIAQEHGGISVFAGVGERTREGNDLYHEMS DSGVIKKTAMVFGQMNEPPGARQRVALTGLTMAEHFRDEQGQDVLLFID NIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGQLQERITSTNKGSITSIQ AVYVPADDYTDPAPATTFAHLDATTNLERRLTQMGIYPAVDPLASTSRAL SPEIVGEEHYEVARQVQQTLQRYKELQDIIAILGMDELSEEDKLVVHRAR RIQFFLSQNFHVAEQFTGQKGSYVPVKETVRGFKEILEGKYDDLPEDAFRL VGGIEEVIENAKKMMA.	152
CLP Protease	153
atgaatttaattcctacagtaattgaacaaacaaatcgtggagaacgcgcttacgatatttactctcgactattaaaaga ccgtatcattatgcttggtagtgcaattgatgacaacgtagctaactcaatcgtttcccagcttttattcttggaatctc aagatcctgaaaaagatattcatatctacatcaacagccctggtggttctatcacagcaggtatggcaatttacgataca atgcagtttattaaaccgcaagtatcaacaatctgtatcggtatggctgcatctatgggtgcattcttacttgcagcagg tgaaaaaggaaaacgttatgcacttccaaacagtgaagcaatgattcaccaaccacttggtggggcacaaggtcaag cga ctgaaatcgaaatcgctgctaaacgtatcctattcttacgtgaaaaactaaaccaaattcttgctgaccgcacaggtcaa ccacttgaagtactacaacgcgacacagaccgcgacaacttcatgacagcagaaaaagctttagaatacggtttaatc ga taagatctttacaaatcgttaa	
Protein MNLIPTVIEQTNRGERAYDIYSRLLKDRIIMLGSAIDDNVANSIVSQLLFLE SQDPEKDIHIYINSPGGSITAGMAIYDTMQFIKPQVSTICIGMAASMGAFLL AAGEKGKRYALPNSEAMIHQPLGGAQGQATEIEIAAKRILFLREKLNQILA DRTGQPLEVLQRDTDRDNFMTAEKALEYGLIDKIFTNR.	154
CotJC	155

[0637]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
atgtggatttatgaaaaaaaattacaataccctgttaaagtaggaacttgtaatccagcacttgcaaaattattaattga gcaatacggtggtgcagatggagaattagctgctgcactacgttacttaaatcagcgttatacaatcccggataaagtc a ttggcctccttaccgatattggtacagaagaatttgcgcatcttgaaatgattgctacgatggtttataagctgacaaaa gatgcgactcctgaacagatgaaggcagctggtctcgaccctcattacgtcgatcatgacagcgcacttcattaccata a cgcagctggtgttccatttactgcaacctatatacaagctaaaggtgatccaattgccgacctatacgaagatattgcgg ctgaagaaaaagcgcgtgccacatatcaatggcttatcaaccaatctgacgatcccgacataaatgacagtttacgctt t ttacgcgaacgagaaattgtccattcacaacgtttccgagaagcggttgaaattttaaaagaagaacgcgatagaaaa at atatttttaa00	
Protein MWIYEKKLQYPVKVGTCNPALAKLLIEQYGGADGELAAALRYLNQRYTI PDKVIGLLTDIGTEEFAHLEMIATMVYKLTKDATPEQMKAAGLDPHYVD HDSALHYHNAAGVPFTATYIQAKGDPIADLYEDIAAEEKARATYQWLINQ SDDPDINDSLRFLREREIVHSQRFREAVEILKEERDRKIYF	156
DHAP Synthase Family	157
atggcaaatcatgaattagatcaattacgtaaacaggtagatgaaattaacttacaactattacacctttaaacaaacg cggtgaaatcgttcaaaaaattggggaacaaaagcaagtacaaggtacaaaacgttttgatccagtacgtgagcgtg aag tgcttgatatgattgcagagaataacgaaggaccattcgaaacatcaacagttcaacatattttcaaaacaatcttcaaa gctagcttagaattacaagaagatgataaccgtaaagcattactagtatcacgtaaaaagaaacaagaaaacacaatc gt tgatgtaaaaggtgaattgattggtaacggcacacaaacgttcatcatgggaccttgcgcggtagaaagcttagagca ag ttcgccaagtagggcaagcgatgaaagaccaaggcttaaaattaatgcgcggtggtgctttcaaaccgagaacatct cca tacgatttccaaggtttaggagtagaagggctacaaattttacgtcaagtagcagatgagttcgacttagcgatcattag tgagattttaaatccaaacgatgttgaaatggcattagactacgttgatgtaattcaagttggtgcacgtaacatgcaaa acttcgatttactacgagctgtaggtaaagttaacaagccagtattattaaaacgtggattagcagcaacaattgatgag ttcattaatgcagcggaatacatcattgcacaaggtaatgaccaaattattctatgtgagcgcggtattcgcacatacga aagagcaacacgtaacacattagacatttcagcagtaccgatcttaaagaaagaaacacatttaccagttgttgttgac g taacgcattcaactggacgtagagatttattattaccaacagcgaaagcggctcttgcaattggtgcagatgcagtaat g gctgaagtacatccagacccagcagttgcattatcagattctgcacaacaaatggatattccggaattccatagattcat ggaagagttaaaaggtttcaaaaataaattatcttaa	
Protein MANHELDQLRKQVDEINLQLLHLLNKRGEIVQKIGEQKQVQGTKRFDPV RREREVLDMIAENNEGPFETSTVQHIFKTIFKASLELQEDDNRKALLVSRKK KQENTIVDVKGELIGNGTQTFIMGPCAVESLEQVRQVGQAMKDQGLKLM RGGAFKPRTSPYDFQGLGVEGLQILRQVADEFDLAIISEILNPNDVEMALD YVDVIQVGARNMQNFDLLRAVGKVNKPVLLKRGLAATIDEFINAAEYIIA QGNDQIILCERGIRTYERATRNTLDISAVPILKKETHLPVVVDVTHSTGRR DLLLPTAKAALAIGADAVMAEVHPDPAVALSDSAQQMDIPEFHRFMEEL KGFKNKLS.	158
ExsFA atgttctcttctgattgcgaatttactaaaattgattgcgaggcaaaaccagctagtacactacctgccttcggttttgcttt caacgcgtctgcacctcagttcgcttcattatttacaccactactattacctagcgtaagtccaaacccaaatattactgtt cctgtaataaatgatacagtaagtgtcggagatggcattcgaattctacgagctggtatttatcaaatcagttatacattaa caattagtcttgataactcacctgttgcaccagaagctggtcgtttcttcttatcattaggtacaccagctaacattattcct ggatcaggtacagcggttcgttctaacgttattggtactggtgaagtagacgtatccagcggtgttattcttattaacttaa accctggtgacttaatcagaatcgtaccagttgaattgattggaactgtagacatccgtgcagcagcattaacagttgca caaattagctag	159
Protein MFSSDCEFTKIDCEAKPASTLPAFGFAFNASAPQFASLFTPLLLPSVSPNPNI	160

[0638]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
TVPVINDTVSVGDGIRILRAGIYQISYTLTISLDNSPVAPEAGRFFLSLGTPA NIIPGSGTAVRSNVIGTGEVDVSSGVILINLNPGDLIRIVPVELIGTVDIRAA ALTVAQIS	
ExsFY	161
atgcgatcatctagtcgtaagctcacaaactttaattgtagagcacaagcccccagtacactaccagctctcggttttgc ttttaatgctacttcacctcaatttgcaacactatttacaccactactactacctagtacaggcccaaatccaaacatta ctgtccctgtaatcaatgatacaattagtacaggaactggtattagaattcaagtagctggtatttatcaaatcagttat acattaacaatcagcctcgataatgttccagtaaccccggaagcagcgcgctttttcttaacactaaactcatcaactaa tattattgcaggatctggaaccgcagtccgttctaatatcattggcactggtgaagtagatgtatccagcggtgtcattc taataaacttaaaccctggtgatttaattcaaattgtacccgttgaagtaattggtacagtagatattcgttctgccgct ttaacagttgcacaaattcgttaa	
Protein	162
MRSSSRKLTNFNCRAQAPSTLPALGFAFNATSPQFATLFTPLLLPSTGPNPN ITVPVINDTISTGTGIRIQVAGIYQISYTLTISLDNVPVTPEAARFFLTLNSST NIIAGSGTAVRSNIIGTGEVDVSSGVILINLNPGDLIQIVPVEVIGTVDIRSAA LTVAQIR.	
Fructose_bisphosphate	163
gtggaaagaagtttatctatggagttagtacgtgtaacagaggctgcagctttatcatcagcgcgttggatgggacgcg g gaaaaaggatgaggcagacggtgcagcaacatcagctatgcgtgatgtatttgatacaattccgatgaaaggtacagt tg taattggtgaaggtgaaatggatgaagcaccaatgctatatatcggagaaaaattaggtacaggatatggtccacgtgt a gacgttgcagttgatccttagaagggacaaacattgtagcagctggtggatggaatgctcttgctgttattgcaattgc agatcacggtaatttgttacatgctcctgacatgtacatggataaaatcgcggttggcccagaagcggttggggcggt cg atattgatgcgcctattatcgataacttacgtgcagttgcgaaagcgaaaaacaaggatattgaagatgttgtagcgac a gttttaaaccgtccacgtcatcaagcgattattgaagaaattcgtaaagctggtgctcgtattaaattgattaatgatgg agacgtagcaggtgcaattaatactgcatttgatcgtacaggtgtagatattttattcggatctggtggtgcgcctgagg gtgtattagcagcagttgcattaaaatgtttaggtggcgaaattcacggaaagctattaccacaaaacgaagctgaatt g gcgcgttgcaaaaagatgggcatagaagacatcaaccgcatccttcgcatggaggacttagtaaaaggtgacgatg caat ctttgcagcaacaggtgtaacagacggagaactattacgcggcgttcaatttaaaggtagcgtaggaacaacacaatc tc ttgttatgcgtgcaaaatcaggcacagtacgcttcgtagacggacgtcatagcttaaataaaaaaccgaacttggttatt aaataa	
Protein	164
VERSLSMELVRVTEAAALSSARWMGRGKKDEADGAATSAMRDVFDTIP MKGTVVIGEGEMDEAPMLYIGEKLGTGYGPRVDVAVDPLEGTNIVAAGG WNALAVIAIADHGNLLHAPDMYMDKIAVGPEAVGAVDIDAPIIDNLRAV AKAKNKDIEDVVATVLNRPRHQAIIEEIRKAGARIKLINDGDVAGAINTAF DRTGVDILFGSGGAPEGVLAAVALKCLGGEIHGKLLPQNEAELARCKKM GIEDINRILRMEDLVKGDDAIFAATGVTDGELLRGVQFKGSVGTTQSLVM RAKSGTVRFVDGRHSLNKKPNLVIK.	
OMP31b	165
atgtttagcttaaaagggactgttatgaaaaccgcacttcttgcatccgtcgcaatgttgttcacaagctcggctatggc tgccgacatcatcgttgctgaaccggcacccgttgcagtcgacacgttctcttggactggcggctatattggtatcaatg ctggttacgctggcggcaagttcaagcatccgttctcaggcatcgagcaggatggggcccaagatttttcaggttcgc tc gacgtcacggccagcggctttgttggcggcgttcaggccggttataactggcagcttgccaacggcctcgtgcttggt gg cgaagctgacttccagggctcgacggttaagagcaagcttgttgacaacggtgacctctccgatatcggcgttgcag	

[0639]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
gca acctcagcggcgacgaaagcttcgtcctcgagaccaaggttcagtggtttggaacggtgcgtgcgcgcctcggcttc acc ccgactgaacgcctgatggtctatggtaccggtggtttggcctatggtaaggtcaagacgtcgcttagcgcctatgac ga tggtgaatcgttcagcgccggaaactctaagaccaaggctggctggacgcttggtgcaggtgtagaatacgccgtca cca acaattggaccctgaagtcggaatacctctacaccgacctcggcaagcgttccttcaattacattgatgaagaaaacgt c aatattaacatggaaaacaaggtgaacttccacaccgtccgcctcggtctgaactacaagttctaa	
Protein MFSLKGTVMKTALLASVAMLFTSSAMAADIIVAEPAPVAVDTFSWTGGYI GINAGYAGGKFKHPFSGIEQDGAQDFSGSLDVTASGFVGGVQAGYNWQL ANGLVLGGEADFQGSTVKSKLVDNGDLSDIGVAGNLSGDESFVLETKVQ WFGTVRARLGFTPTERLMVYGTGGLAYGKVKTSLSAYDDGESFSAGNSK TKAGWTLGAGVEYAVTNNWTLKSEYLYTDLGKRSFNYIDEENVNINME NKVNFHTVRLGLNYKF.	166
Novel SLH Amidase	167
gtcgttcttggtttaccagttgatccaaaagcaaagccatcatttaaagatgcacaaaaccattgggcagctccgtacat tgctgcagtggaaaaagcaggtgtaattaatggggatggtactggtaaattcaatccatcaagccaaattaaccgtgca t ctatggcatctatgttagtacaagcatactcattagataagaaaattattggagaacttccaacacagtttaaagatttg gaacctcattggggtaagaaacaagctaatattttagtagctttagagatttctaaaggtacgggaaatggctggaatcc tgaaggaactgtaactcgtgcagaagcagctcagtttattgcgatggctgatcaaaataaaacaagtacatcaaaaag aa tgtatatgaacagaaacgttattacatatcatcaaccatcattatcctctggtattactgatgttcaacataagccacaa atggttgaagtgacagagcaaagagcagacggctggttgaaaattgtaacaagtaaaggtgagaagtggacacctct aac agaaaaaacagaaacgattaatgaagaatttactacttatgaaacagcttcacatagttctaaagtgctaggtacatata atgcacaaacagtaacggttatggaagagagtggtagctggattcgtatccgcgtaggcgctggtttccagtgggttg at aaaaatcaattaaatccagtaaaacaagagaactttttagaaggtaaagcaattattattgatccaggtcatggtggaat tgactcaggtaatgttggttattacgagaaagaaagtgaaactgtattagatgtatcattacgattaaagaaaatatttg agcaaaaagcaccatttactgttatgttcactcgtacagataatacacgtccaggagtaaactcaacagattcattgaaa aaacgagtagagtttgctcaggaacataatggagatatctttgtaagtatccatgctaatggttctgcagagaaaaatgg acaaggtacagaaacattatattatcagtcagcaagagcaaaagtaacgaatccgcatgtagaagacagtaagttatta g cacaaaaaattcaagaccgtcttgtagcagcacttggaacaaaagatcgtggtgtgaaacatcaggacttatacgttac t agagaaaatacaatgccagctgtattaacagaattagcatttgtagataataaaagtgatgcagataaaattgctacacc aaaacagagacaagctgcagcagaagcgatttatcaaggtattttagattattacgaagcaaagggtaataacgtatct t ctttccgttaa	
Protein VVLGLPVDPKAKPSFKDAQNHWAAPYIAAVEKAGVINGDGTGKFNPSSQI NRASMASMLVQAYSLDKKIIGELPTQFKDLEPHWGKKQANILVALEISKG TGNGWNPEGTVTRAEAAQFIAMADQNKTSTSKRMYMNRNVITYHQPSLS SGITDVQHKPQMVEVTEQRADGWLKIVTSKGEKWTPLTEKTETINEEFTT YETASHSSKVLGTYNAQTVTVMEESGSWIRIRVGAGFQWVDKNQLNPVK QENFLEGKAIIIDPGHGGIDSGNVGYYEKESETVLDVSLRLKKIFEQKAPFT VMFTRTDNTRPGVNSTDSLKKRVEFAQEHNGDIFVSIHANGSAEKNGQGT ETLYYQSARAKVTNPHVEDSKLLAQKIQDRLVAALGTKDRGVKHQDLY VTRENTMPAVLTELAFVDNKSDADKIATPKQRQAAAEAIYQGILDYYEA KGNNVSSFR	168
Novel SLH Protein	169

[0640]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
atgaagaagaacatgttacgtataatggcaacggtaactattatgggcggcttgtttgtaagtacgaatgttccaaacgt aaaagcagaagaatatccagaaatgattgtatttgatgatgttccagtaaaccactgggcatatgacgatataatggac g tagtatacaataaagtaatgttaggctatggaaatggtaagtttggtgtaggagataatgtaacacgagaacaagtagct gcagtactctatcgtacattgaatttgaaaaaagaaggacctttaaaaaatccatacaaagatatttcagagagggctac attctttttagatgaaatttttagtattaacaaagcatggtatttttgaaggcgatgaaaaaggaaattttagaccagccg caccagtaacacgtgcagaaacggcgcaaattcttacgaaggcatttacatttgaagtgaagaagaaccatacatttaa a gatgtaccaaataatcattgggcaaaaaatgcgattagtgcactgcagtctaatcatgtcatagtaggaacagggaatg g gaaatttgaaccgaataaagttgtaacacgtgagcaatatgcaacgtttttaaataaagctgtttttttattttccagtaa aagatgagaattatgaatga	
Protein	170
MKKNMLRIMATVTIMGGLFVSTNVPNVKAEEYPEMIVFDDVPVNHWAY DDIMDVVYNKVMLGYGNGKFGVGDNVTREQVAAVLYRTLNLKKEGPL KNPYKDISERATFFLDEILVLTKHGIFEGDEKGNFRPAAPVTRAETAQILTK AFTFEVKKNHTFKDVPNNHWAKNAISALQSNHVIVGTGNGKFEPNKVVT REQYATFLNKAVFYFPVKDENYE.	
Methylcitrate Dehydratase	171
atgattaaaacaaatgaaattaaacaaaaagatgcaatattagaagagattacggattatgtattaaataaagaggtaac aagtgcagaagcattcagtactgctcgttacgtattatttgatacacttggatgcggaattttagcattacaatatccag agtgtacgaaattattaggaccagttgtaccaggaacaatcgtgccaaatggaacacgagtgccaggtacgtcttatgt a ttagatccagtgaaaggtgcatttaatatcggatgtatgatccgttggttagactataacgatacttggcttgcagcaga atggggacatccatctgataaccttggcggcattttagcagttgcagattatattagccgtgttcgtatatcagaaggaa aagaaccgttaaaagtacgtgaagtattagaaatgatgattaaagcacatgaaattcaaggtgtattagctttagaaaac agcttaaaccgggttggtcttgaccacgtattatacgtaaaagtagcaacaactgctgtagttgcgaaaatgcttggcg g aacacgtgaagaaatctttaatgcattatcacatgcatggattgataattctagtcttcgtacatatcgtcacgctccaa atactggatcacgtaaatcatgggcagcaggtgatgcaacaagtcgcggtgttcaccttgcaatgactgctttaaaag gt gaaatgggttatccaacagcattatctgcaccgggttggggattccaagatgtattatttaataaacaagaattaaagtt agctagaccattagagtcttatgtaatggaaaatgtattattttaaagtttcatatccagcagaattccatgcacaaacag ctgcagaatgtgctgtaaaattacatccggaaattaaagaaagattagatgaaattgaccgtattacaattacaactcat gaatcagcaattcgtattattgataaagaaggtccattaaataacccagctgatcgtgatcattgtttacaatatattac ggcaattggtttattaaagggagatatcgttgcggatgattatgaggatgcagtagcaaatgatccacgtgtagatgaat tacgtaataagatggttgttgttgaaaacaaacagtacagtttagattaccttgacccgaacaagcgctcaatcgccaac gctgttcaagttcatttcaaggatggaactgtaacagaaaacgtggaatgtgaatatccacttggtcaccgtttccgtag agacgaagcaattccaaaagttgttcaaaaattcactgcaagtatggcaggtcattattctagtaaacagcaagaacaa a ttcatgaagtttgtttaaatgaagagaaactagaaaatatgaatgtaaacgaatttgtagatctattcttaatttaa	
Protein	172
MIKTNEIKQKDAILEEITDYVLNKEVTSAEAFSTARYVLFDTLGCGILALQ YPECTKLLGPVVPGTIVPNGTRVPGTSYVLDPVKGAFNIGCMIRWLDYND TWLAAEWGHPSDNLGGILAVADYISRVRISEGKEPLKVREVLEMMIKAHE IQGVLALENSLNRVGLDHVLYVKVATTAVVAKMLGGTREEIFNALSHAW IDNSSLRTYRHAPNTGSRKSWAAGDATSRGVHLAMTALKGEMGYPTALS APGWGFQDVLFNKQELKLARPLESYVMENVLFKVSYPAEFHAQTAAECA VKLHPEIKERLDEIDRITITTHESAIRIIDKEGPLNNPADRDHCLQYITAIGLL KGDIVADDYEDAVANDPRVDELRNKMVVVENKQYSLDYLDPNKRSIAN AVQVHFKDGTVTENVECEYPLGHRFRRDEAIPKVVQKFTASMAGHYSSK QQEQIHEVCLNEEKLENMNVNEFVDLFLI.	
Peptidyl prolylisomerase	173

[0641]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
atggctgcaaaatgggaaaaattagaaggtaacgtaggcgttttaacaatcgaagttgatgctaaagaagtaaacaac tc	
tatcgacgctgcgttcaaaaaagtagtaaaaacaatcaacgtaccaggtttccgtaaaggaaaaatgcctcgtccgtta t	
tcgaacaacgctttggtatcgaatctttataccaagatgctttagatatcatcttaccaaaagcatacggtgaagcgatc	
gatgaagctggtatcttcccagttgctcatcctgaaatcgacatcgagaagttcgaaaaaaatgctaaccttatcttcac	
tgcaaaagttacagtgaaacctgaagttaaattaggtgagtacaaaggtttagcagtagaaaaagttgaaacaactgta a	
ctgacgaagatgtagagaacgaattaaaatctttacaagagcgtcaagctgaactagttgttaaagaagaaggaactg tt	
gaaaacggtgatacagctgtaatcgacttcgaaggtttcgttgatggcgaagcatttgaaggcggaaaaggcgaaaa cta	
ctctctagcaatcggttctggtacattcatcccaggtttcgaagagcaagtaattggtcttaaatctggtgagtctaaag	
acgttgaagtatcattcccagaagagtaccatgctgctgaattagctggcaaaccagcaacattcaaagtaacagttca c	
gaaatcaaaacaaaagaacttcctgagttaaacgacgagttcgctaaagaagctgacgaagcggttgcaactcttgat ga	
attaaaagcaaaacttcgcacaaacttagaagaaggcaaaaagcacgaagctgagcacaaagtacgtgatgaagta gtag	
aattagctgctgctaacgctgaaatcgacattccagaagctatgatcgacactgagttagatcgtatggttcgtgaattc	
gagcaacgtttaagccaacaaggtatgaaccttgagctttactaccaattcacaggtactgatgctgacaagttaaaag a	
gcaaatgaaagaagacgctcaaaaacgcgtaagaatcaaccttgttcttgaagctatcattgaagctgaaaacatcga ag	
ttactgaagaagaagtaactgcagaagttgaaaaaatggctgaaatgtacggtatgccagtagacgctatcaagcaa gct	
cttggaagcgtagacgctttagctgaagatcttaaagttcgtaaagctgtagacttcttagtagaaaacgctgcataa	
Protein MAAKWEKLEGNVGVLTIEVDAKEVNNSIDAAFKKVVKTINVPGFRKGK MPRPLFEQRFGIESLYQDALDIILPKAYGEAIDEAGIFPVAHPEIDIEKFEKN ANLIFTAKVTVKPEVKLGEYKGLAVEKVETTVTDEDVENELKSLQERQAE LVVKEEGTVENGDTAVIDFEGFVDGEAFEGGKGENYSLAIGSGTFIPGFEE QVIGLKSGESKDVEVSFPEEYHAAELAGKPATFKVTVHEIKTKELPELNDE FAKEADEAVATLDELKAKLRTNLEEGKKHEAEHKVRDEVVELAAANAEI DIPEAMIDTELDRMVREFEQRLSQQGMNLELYYQFTGTDADKLKEQMKE DAQKRVRINLVLEAIIEAENIEVTEEEVTAEVEKMAEMYGMPVDAIKQAL GSVDALAEDLKVRKAVDFLVENAA.	174
pX01-130	175
atgaaaattgcatttacaaagatggtaggtatattaactattagttcaatgttagtgttagtaggctgtcagacttcagg	
ttcatctaaaaagcaagagcaaacatctgaaagtcatacacacgaaaatgaacacgatcacagtcatgatcatagtcat g	
ctcatgatgaatcaacagaaaaaatttatgaagggtatttcgaagacaaccaagtgaaggatcgatcactctccgattg g	
aaaggagactggcaatcggtatatccatatttacaagatggaacgcttgatgaggtatttgcttacaaagcgaaacata a	
aggtaaaatgtcagccaaagaatataaggagtattataatgaaggatatcaaacagatgtcaaccgtatcgtgattcaa g	
gagatactgtaacattctacaaaaacaaagaagaatattctggtaaatatatctatgatgggtacaaaattttgacatat	
gatgcagggaatagaggtgtaagatacatatttaaactagcagaaaaaacagaaggagttcctcagtatattcaattta g	
tgatcatggtatttatccgaataaagctaatcactaccacttgtattggggtgacaatcgtgaagctttattcgatgaag	
tcatacactggcctacctactacccatcggatatgaatggacatgatattgcgcacgagatgatggcgcattaa	
Protein MKIAFTKMVGILTISSMLVLVGCQTSGSSKKQEQTSESHTHENEHDHSHD HSHAHDESTEKIYEGYFEDNQVKDRSLSDWKGDWQSVYPYLQDGTLDE VFAYKAKHKGKMSAKEYKEYYNEGYQTDVNRIVIQGDTVTFYKNKEEY	176

[0642]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
SGKYIYDGYKILTYDAGNRGVRYIFKLAEKTEGVPQYIQFSDHGIYPNKA NHYHLYWGDNREALFDEVIHWPTYYPSDMNGHDIAHEMMAH.	
Pyrroline dehydrogenase	177
atggtagtagcatacaaacatgagccatttacagatttttcagtagaggctaacaaattagcgtttgaagaaggtttaaa gaaagtagaatcttatcttggacaagactatccattaattattgggggagaaaaaatcactacagaagacaaaattgttt ctgtaaaccctgcaaataaagaggaacttgttggtcgcgtttcaaaagcaagccgtgagttagctgaaaaagcaatgc aa	
gtagcggatgaaacattccaaacttggagaaagtcaaaaccagaaatgcgtgcagacattttattccgtgctgcagcg at	
cgttcgtcgtagaaaacatgaattctctgctattcttgtaaaagaagcaggtaaaccgtggaatgaggcagatgctgat a	
cagcagaagcaatcgactttatggaatattatggtcgccaaatgttgaaattaaaagacggaattccagtagaaagcc gt	
ccaattgaatataatcgtttctcttacattccattaggagtaggtgttatcatttctccttggaacttcccattcgcaat	
tatggcaggtatgacaacagctgctttagtttctggtaacacagtattactaaaaccagctagtacaactcctgtagtag	
cagcgaaattcatggaagtattagaagaagctggcttaccagctggcgtagtaaacttcgtaccaggtaatggttctga a	
gttggtgactacttagtagatcaccctcgtacacgcttcattagcttcactggatctcgtgatgtaggtatccgtattta	
tgagcgcgcagcgaaagtaaacccaggccaaatctggttaaaacgcgttatcgctgaaatgggtggtaaagatacaa ttg	
ttgttgataaagaagcagatcttgaattagcagctaaatctatcgttgcatcagcattcggattctcaggacaaaaatgt	
tctgcatgttctcgtgcagtaatccacgaagatgtatacgatcacgtattaaatcgtgctgttgaattaacgaaagaatt	
aacagttgctaacccagctgtattaggtacaaacatgggtcctgttaatgaccaagctgcattcgataaagtaatgagct	
atgttgcaattggtaaagaagaaggtagaattttagcaggtggcgaaggagacgactctaaaggctggttcatccaac ca	
acaatcgttgctgacgttgcagaagatgctcgcctaatgaaagaagaaatcttcggaccagtagtagcattctgtaaag c	
aaaagactttgatcatgcacttgcaattgcaaacaatacagaatacggtttaacaggagcagttatctctaacaaccgtg	
atcatattgaaaaagcacgtgaagacttccacgtaggtaacttatacttcaaccgtggatgtactggtgcaatcgtagga	
taccaaccattcggtggctttaacatgtctggtacagactctaaagctggtggtcctgactacttagcgcttcacatgca	
agcaaaaactacttctgaaactttataa	
Proteins	178
MVVAYKHEPFTDFSVEANKLAFEEGLKKVESYLGQDYPLIIGGEKITTED KIVSVNPANKEELVGRVSKASRELAEKAMQVADETFQTWRKSKPEMRAD ILFRAAAIVRRRKHEFSAILVKEAGKPWNEADADTAEAIDFMEYYGRQML KLKDGIPVESRPIEYNRFSYIPLGVGVIISPWNFPFAIMAGMTTAALVSGNT VLLKPASTTPVVAAKFMEVLEEAGLPAGVVNFVPGNGSEVGDYLVDHPR TRFISFTGSRDVGIRIYERAAKVNPGQIWLKRVIAEMGGKDTIVVDKEADL ELAAKSIVASAFGFSGQKCSACSRAVIHEDVYDHVLNRAVELTKELTVAN PAVLGTNMGPVNDQAAFDKVMSYVAIGKEEGRILAGGEGDDSKGWFIQP TIVADVAEDARLMKEEIFGPVVAFCKAKDFDHALAIANNTEYGLTGAVIS NNRDHIEKAREDFHVGNLYFNRGCTGAIVGYQPFGGFNMSGTDSKAGGP DYLALHMQAKTTSETL.	
SAP	179
atggcaaagactaactcttacaaaaaagtaatcgctggtacaatgacagcagcaatggtagcaggtgttgtttctccag t	
agcagcagcaggtaaaacattcccagacgttcctgctgatcactggggaattgattctattaactacttagtagaaaaa g	
gcgcagttaaaggtaacgacaaaggaatgttcgagcctggaaaagaattaactcgtgcagaagcagctacaatgatg gct	
caaatcttaaacttaccaatcgataaagatgctaaaccatctttcgctgactctcaaggccaatggtacactccattcat	
cgcagctgtagaaaaagctggcgttattaaaggtacaggaaacggctttgagccaaacggaaaaatcgaccgcgttt cta	
tggcatctcttcttgtagaagcttacaaattagatactaaagtaaacggtactccagcaactaaattcaaagatttagaa	
acattaaactggggtaaagaaaaagctaacatcttagttgaattaggaatctctgttggtactggtgatcaatgggagcc	
taagaaaactgtaactaaagcagaagctgctcaattcattgctaagactgacaagcagttcggtacagaagcagcaaa	

[0643]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
ag ttgaatctgcaaaagctgttacaactcaaaaagtagaagttaaattcagcaaagctgttgaaaaattaactaaagaagat atcaaagtaactaacaaagctaacaacgataaagtactagttaaagaggtaactttatcagaagataaaaaatctgcta c agttgaattatatagtaacttagcagctaaacaaacttacactgtagatgtaaacaaagttggtaaaacagaagtagctg taggttctttagaagcaaaaacaatcgaaatggctgaccaaacagttgtagctgatgagccaacagcattacaattcac a gttaaagatgaaaacggtactgaagttgtttcaccagagggtattgaatttgtaacgccagctgcagaaaaaattaatg c aaaaggtgaaatcactttagcaaaaggtacttcaactactgtaaaagctgtttataaaaaagacggtaaagtagtagct g aaagtaaagaagtaaaagtttctgctgaaggtgctgcagtagcttcaatctctaactggacagttgcagaacaaaataa a gctgactttacttctaaagatttcaaacaaaacaataaagtttacgaaggcgacaacgcttacgttcaagtagaattgaa agatcaatttaacgcagtaacaactggaaaagttgaatatgagtcgttaaacacagaagttgctgtagtagataaagct a ctggtaaagtaactgtattatctgcaggaaaagcaccagtaaaagtaactgtaaaagattcaaaaggtaaagaacttgt t tcaaaaacagttgaaattgaagctttcgctcaaaaagcaatgaaagaaattaaattagaaaaaactaacgtagcgctttc tacaaaagatgtaacagatttaaaagtaaaagctccagtactagatcaatacggtaaagagtttacagctcctgtaaca g tgaaagtacttgataaagatggtaaagaattaaaagaacaaaaattagaagctaaatatgtgaacaaagaattagttctg aatgcagcaggtcaagaagctggtaattatacagttgtattaactgcaaaatctggtgaaaaagaagcaaaagctacat t agctctagaattaaaagctccaggtgcattctctaaatttgaagttcgtggtttagaaaaagaattagataaatatgtta ctgaggaaaaccaaaagaatgcaatgactgtttcagttcttcctgtagatgcaaatggattagtattaaaaggtgcagaa gcagctgaactaaaagtaacaacaacaaacaaagaaggtaaagaagtagacgcaactgatgcacaagttactgtac aaaa taacagtgtaattactgttggtcaaggtgcaaaagctggtgaaacttataaagtaacagttgtactagatggtaaattaa tcacaactcattcattcaaagttgttgatacagcaccaactgctaaaggattagcagtagaatttacaagcacatctctt aaagaagtagctccaaatgctgatttaaaagctgcacttttaaatatcttatctgttgatggtgtacctgcgactacagc aaaagcaacagtttctaatgtagaatttgtttctgctgacacaaatgttgtagctgaaaatggtacagttggtgcaaaag gtgcaacatctatctatgtgaaaaacctgacagttgtaaaagatggaaaagagcaaaaagtagaatttgataaagctgt a caagttgcagtttctattaaagaagcaaaacctgcaacaaaataa	
Protein MAKTNSYKKVIAGTMTAAMVAGVVSPVAAAGKTFPDVPADHWGIDSIN YLVEKGAVKGNDKGMFEPGKELTRAEAATMMAQILNLPIDKDAKPSFAD SQGQWYTPFIAAVEKAGVIKGTGNGFEPNGKIDRVSMASLLVEAYKLDT KVNGTPATKFKDLETLNWGKEKANILVELGISVGTGDQWEPKKTVTKAE AAQFIAKTDKQFGTEAAKVESAKAVTTQKVEVKFSKAVEKLTKEDIKVT NKANNDKVLVKEVTLSEDKKSATVELYSNLAAKQTYTVDVNKVGKTEV AVGSLEAKTIEMADQTVVADEPTALQFTVKDENGTEVVSPEGIEFVTPAA EKINAKGEITLAKGTSTTVKAVYKKDGKVVAESKEVKVSAEGAAVASISN WTVAEQNKADFTSKDFKQNNKVYEGDNAYVQVELKDQFNAVTTGKVE YESLNTEVAVVDKATGKVTVLSAGKAPVKVTVKDSKGKELVSKTVEIEA FAQKAMKEIKLEKTNVALSTKDVTDLKVKAPVLDQYGKEFTAPVTVKVL DKDGKELKEQKLEAKYVNKELVLNAAGQEAGNYTVVLTAKSGEKEAKA TLALELKAPGAFSKFEVRGLEKELDKYVTEENQKNAMTVSVLPVDANGL VLKGAEAAELKVTTTNKEGKEVDATDAQVTVQNNSVITVGQGAKAGET YKVTVVLDGKLITTHSFKVVDTAPTAKGLAVEFTSTSLKEVAPNADLKAA LLNILSVDGVPATTAKATVSNVEFVSADTNVVAENGTVGAKGATSIYVK NLTVVKDGKEQKVEFDKAVQVAVSIKEAKPATK	180
Stage V Spore Protein	181
atgaaagcaactggaatcgtacgtcgaattgatgatttaggtagggtagtaatcccaaaggaaattcgtagaactttac g tattcgagaaggggacccattagaaatatttgttgatcgcgatggagaagtaattttaaagaaatattctccaattagcg	

[0644]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
aactaggtgattttgcaaaagaatatgcagaggctttatatgatagcttaggacataatgtgcttgtatgcgatcgagat tctattatcgcagtatcaggcgtatcaaaaaaagaatacttaaataaaagcgttggcgatttaattgaaaaaacgatgga agaaagaaagtctgttattatgacggacgaaagtgatgtttccattattgatggtgtaacagaaaaggttcattcttata cagttggaccgattgttgcaaatggagacccaattggggctgtcattatttttttcaaaagaagcgattataagcgaaata gagcacaaagcggtcaatactgctgccagtttcttagcgaaacaaatggaacagtaa Protein	182
MKATGIVRRIDDLGRVVIPKEIRRTLRIREGDPLEIFVDRDGEVILKKYSPIS ELGDFAKEYAEALYDSLGHNVLVCDRDSIIAVSGVSKKEYLNKSVGDLIE KTMEERKSVIMTDESDVSIIDGVTEKVHSYTVGPIVANGDPIGAVIIFSKEA IISEIEHKAVNTAASFLAKQMEQ	
Thermolysin Metallopeptidase Alpha	183
atgaaaaagaaaagtttagcgttagtgttagcgacaggaatggcagttacaacgtttggagggacaggctctgcttttg c agattctaaaaatgtgctctctacgaagaagtacaatgagacagtacagtcaccggagtttatttctggggatttaactg aagcaactggtaagaaagcagaatctgttgtgtttgattacttaaatgcagcaaaaggtgattataagttaggggaaaa g agtgcgcaagattctttcaaagtgaaacaagcgaagaaagatgctgtaactgattcaacagtattacgtttgcaacaag t ttacgaaggagtacctgtatggggttctacgcaagtagctcacgtaagtaaagatggttcattaaaagtattgtctggaa cagttgcacctgatttagacaaaaaagaaaagttgaaaaataaaaataagatcgaaggcgcaaaagcaattgaaattg cg caaaaagatttaggtgttacacctaaatatgaggtagaaccaaaagcggacttatatgtatatcaaaatggtgaagaaa c aacatatgcatacgttgtaaatttaaacttcttagagccaagcccaggaaactactactatttcattgaagcggacagcg gtaaagtattaaataaatataataaattggatcatgtagcaaatgaagataagtcaccagttaagcaagaggcacctaa a caagaagcgaaaccggctgtaaagcctgtaacaggcacaaatgcagtgggtactggtaaaggtgtattaggagata cgaa gtcacttaatacaacgttatctgcatcatcttactatttacaagataatacgcgcggagcaacgattttcacatatgatg cgaaaaaccgctcaacattaccaggaacgttatgggtagatgcggataatgttttcaatgcagcgtatgatgcagcgg ca gtagatgctcactactatgctggtagaacatatgattactataaagcgacatttaatagaaactctattaatgatgcagg agcaccattaaaatcaacagttcattatggaagtagatataataatgcgttctggaatggctctcaaatggtatacggag atggtgatggtgtaacattcacttcattgtctggtggaattgatgtaattggccatgaattaacgcatgctgttacagag tatagctcagatttaatttatcaaaatgaatcaggagcattaaatgaagctatttcagatgtatttggtacattagtaga gtattatgataaccgtaaccctgattgggaaattggtgaagatatttacacgcctggtaaagctggagatgcacttcgct ctatgagtgatccaacgaaatatggtgatccagatcattattctaagcgttacacaggtactggtgataacggtggcgtt catacaaatagcggtattattaacaaagcggcttacttactagcgaatggtggtacgcattacggtgttactgtaaacgg tattggtaaagataaagtaggagcgatttattaccgtgcaaatacgcaatatttcacacaatctactacgtttagtcaag ctcgtgctggattagtacaagctgcagctgacttatatggtgctagctctgcagaagtagcagcagttaagcaatcatat agtgctgttggcgtaaactaa	
Protein	184
MKKKSLALVLATGMAVTTFGGTGSAFADSKNVLSTKKYNETVQSPEFISG DLTEATGKKAESVVFDYLNAAKGDYKLGEKSAQDSFKVKQAKKDAVTD STVLRLQQVYEGVPVWGSTQVAHVSKDGSLKVLSGTVAPDLDKKEKLK NKNKIEGAKAIEIAQKDLGVTPKYEVEPKADLYVYQNGEETTYAYVVNL NFLEPSPGNYYYFIEADSGKVLNKYNKLDHVANEDKSPVKQEAPKQEAK PAVKPVTGTNAVGTGKGVLGDTKSLNTTLSASSYYLQDNTRGATIFTYDA KNRSTLPGTLWVDADNVFNAAYDAAAVDAHYYAGRTYDYYKATFNRN SINDAGAPLKSTVHYGSRYNNAFWNGSQMVYGDGDGVTFTSLSGGIDVI GHELTHAVTEYSSDLIYQNESGALNEAISDVFGTLVEYYDNRNPDWEIGE DIYTPGKAGDALRSMSDPTKYGDPDHYSKRYTGTGDNGGVHTNSGIINK AAYLLANGGTHYGVTVNGIGKDKVGAIYYRANTQYFTQSTTFSQARAGL VQAAADLYGASSAEVAAVKQSYSAVGVN	
2-oxo-acid dehydrogenase acelytransferase	185
gtggcatttgaatttaaactaccagatatcggtgaaggtatccacgaaggtgaaatcgtaaaatggtttattaaaccagg	

[0645]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
cgacgaagtaaacgaagacgacgtacttcttgaagtacaaaatgataaagcagtagtagaaattccttctcctgttaaa g	
gtaaagtacttgaagtacttgtagaagaaggtacggttgcagtagttggagatacattaattaaatttgatgctccagga tacgaaaaccttaaatttaaaggcgacgatcatgacgaagctcctaaagctgaagctactccagcagcaactgcaga agt	
agtaaatgagcgcgtaatcgctatgccatctgttcgtaaatatgctcgtgaaaacggcgtagacattcataaagtagct g	
gttctggtaagaacggtcgtatcgtaaaagctgacatcgatgcatttgcaaatggtggacaagcagtagcagcaactg ag	
gctccagcagcagtagaagctactccagcagcagcgaaagaagaagcaccaaaagcacaaccaatcccagctggt gaata	
tccagaaactcgtgagaaaatgagtggtatccgtaaagcaattgcgaaagcaatggttaactctaaacatacagctcct c	
acgtaacattaatggatgaagtagatgtaactgaacttgttgctcaccgtaagaagttcaaagctgtggcagctgacaa a	
ggtattaaattaacttaccttccatacgttgttaaagctttaacatctgcattacgtgaatacccaatgttaaacacttc	
tttagatgatgcttctcaagaagtagttcataaacattacttcaacatcggtatcgcagctgatacagacaaaggtctat	
tagtaccagttgttaaagatacagatcgcaagtctatcttcacaatttctaacgagatcaatgatcttgctggtaaagca	
cgtgaaggtcgtttagctcctgctgaaatgaaaggcgcttcttgcacaattacaaacattggttctgcaggtggacaatg	
gttcactccagttatcaaccacccagaagtagcaatccttggtatcggccgtatcgctgagaaaccagttgtgaaaaac g	
gtgagatcgttgcagctccagtattagcattatctctaagctttgaccatcgtttaattgacggcgcaactgctcaaaaa	
gcattaaaccaaattaaacgtctattgaatgacccacaattattagtaatggaggcgtaa	
Protein	186
VAFEFKLPDIGEGIHEGEIVKWFIKPGDEVNEDDVLLEVQNDKAVVEIPSP VKGKVLEVLVEEGTVAVVGDTLIKFDAPGYENLKFKGDDHDEAPKAEAT PAATAEVVNERVIAMPSVRKYARENGVDIHKVAGSGKNGRIVKADIDAF ANGGQAVAATEAPAAVEATPAAAKEEAPKAQPIPAGEYPETREKMSGIR KAIAKAMVNSKHTAPHVTLMDEVDVTELVAHRKKFKAVAADKGIKLTY LPYVVKALTSALREYPMLNTSLDDASQEVVHKHYFNIGIAADTDKGLLVP VVKDTDRKSIFTISNEINDLAGKAREGRLAPAEMKGASCTITNIGSAGGQW FTPVINHPEVAILGIGRIAEKPVVKNGEIVAAPVLALSLSFDHRLIDGATAQ KALNQIKRLLNDPQLLVMEA	
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	187
atggcaattcaaacaagtaacttaggttatccacgtatcggattacaacgagagtggaaaaaaacattggaagctttttg gtccaataaaatcaatgaagaacaatttttaacaacaatgaaagaaattcgccttcaacacgtaaaagtacagcaagaa a	
aagggattgaactcattccaattggcgactttacatattacgatcacgttttggatactgcttatatgctaggatttatc ccatcacgtttttctgagtttacatcttacctagatgtatatttttgcaatggcgcgtggctctaaagatcacgtagcttc cgaaatgacaaaatggtttaacacaaactatcattatatcgttcctgaatatgaagagggattacaaatctctttaaaag ataatcgtccacttcgcttatacgaagaggcaaaacaagaattgggtgtagatggaaaacctgttattttaggaccatat actttcttgaaattagctaaaggctatacacaagagcaatttgctactatttttaaaacagttagttgcaccttacgtaca actgctttcagaactacatgcagctggtgcacaaatcattcmagttgatgaaccgattttcgcttctttaacgaaagaag aagttcaacaagcaaaagaaatttatgaagctattcgtaaagaggttccaaatgcgactcttctttacaaacatacttt gatagtgtagaagaaaactatgaagaaattattacattcccagtatcaagtattggattagatttcgttcatggtaaaga aggtaatttaaatgctatttcaaaatatggattcccagctgataaaactttagctgttggttgtatagatggccgtaaca tttggagagctgaccttgatgaagttcttacgttatttacaacgttacaaaaacaagtccaaacgaaagatctcatcgtt caaccttcttgtagcttattgcatacaccaatcgataaaacagaagaaactcacttatcaactgagctatttgatgcgtt ggcatttgcaaatcaaaaattagaagagttagttcttattcattccgctctgactcaaggtacagaaagcattagtaatg aactggaaacatatcgaaacgtacatcatacaattcgttcatctgctgcacgtaaccgagaagatgtcaaagcagcac ga	
acagcactaaaagaagaagatttttcacgtcctcttccatttgaaaaacgatacgaattacaacaagttgccctaaagtt accgttgttaccaacaacgactatcggtagcttccctcaaacaactgaagttcgccaaacgcgaaaagaatggcgtaa tg	
gtattatttcaaatgaacaatatgaacaatttattgaaaaagagacagaaaaatggattcgttaccaagaagaaattggt cttgatgttcttgttcatggcgagtttgaaagaactgacatggtcgaatattttggtgagcgccttgctggcttctcatt cactaaaaacggttgggtacaatcatacggttctcgttgcgtaaaaccacctgttatttatggtgatgtagcctttatta	

[0646]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
acggcatgactattaaggaaacggtttatgcacaaagcttaacagagaaagttgtaaaaggaatgttaactggacctgt t	
acgattttaaattggtccttcgttcgaaatgacattccaagaaaagaagtttcgtatcaaattgcattagctcttcgtca tgaaattgaactacttgaatcttctggaatttcgagtgatccaagtcgatgagccagcacttcgtgaaggaatgccactg a	
aagaaaaagattgggacgcttatattacatgggcagtacaatccttccttttagcaacttcttctgtagcaaatgaaaca caaattcatacgcatatgtgttacagtaacttcgaagatattgttgacgcgattcgcgcattagatgcagatgtgatttc tatcgaaacatcaagaagtcacggagaatttattgatacattaaaacatacaacatacgaaaagggcatcggtctaggt g	
tatatgatattcatagcccacgtgtaccaagtaaagatgaaatgtataaaatcgtagaacaatctttacaagtatgcgat cctaaatatttctggattaatcctgattgtggtttaaaaacgcgaagaacagaagaagttattccagctctagaacatat ggtgcaagcagcaaaagatgctcgttccctactaaaaacaaacgcataa	
Protein MAIQTSNLGYPRIGLQREWKKTLEAFWSNKINEEQFLTTMKEIRLQHVKV QQEKGIELIPIGDFTYYDHVLDTAYMLGFIPSRFSEFTSYLDVYFAMARGS KDHVASEMTKWFNTNYHYIVPEYEEGLQISLKDNRPLRLYEEAKQELGV DGKPVILGPYTFLKLAKGYTQEQFATILKQLVAPYVQLLSELHAAGAQIIX VDEPIFASLTKEEVQQAKEIYEAIRKEVPNATLLLQTYFDSVEENYEEIITFP VSSIGLDFVHGKEGNLNAISKYGFPADKTLAVGCIDGRNIWRADLDEVLT LFTTLQKQVQTKDLIVQPSCSLLHTPIDKTEETHLSTELFDALAFANQKLEE LVLIHSALTQGTESISNELETYRNVHHTIRSSAARNREDVKAARTALKEED FSRPLPFEKRYELQQVALKLPLLPTTTIGSFPQTTEVRQTRKEWRNGIISNE QYEQFIEKETEKWIRYQEEIGLDVLVHGEFERTDMVEYFGERLAGFSFTK NGWVQSYGSRCVKPPVIYGDVAFINGMTIKETVYAQSLTEKVVKGMLTG PVTILNWSFVRNDIPRKEVSYQIALALRHEIELLESSGIRVIQVDEPALREG MPLKEKDWDAYITWAVQSFLLATSSVANETQIHTHMCYSNFEDIVDAIRA LDADVISIETSRSHGEFIDTLKHTTYEKGIGLGVYDIHSPRVPSKDEMYKIV EQSLQVCDPKYFWINPDCGLKTRRTEEVIPALEHMVQAAKDARSLLKTN A.	188
Pyruvate Dehydrogenase complex E3 component,dihydrolipoamide dehydrogenase atggtagtaggagatttcccaattgaattagatacagtcgttgttggtgcaggtcctggtggatacgttgcggcaattcg tgcagcacaattaggtcaaaaggtagcaattattgaaaaagctaaccttggtggcgtatgcttaaacgttggatgtattc cttcaaaagcgttaatcaatgcaggtcatcgttatgagaatgcaatgcattctgatgacatgggtatcactgcagagaac gtaaaagttgactttacaaaagttcaagaatggaaaaacggcgtagttaagaaattaactggcggtgttgaaggccttc t taaaggtaacaaagttgaaatcattcgcggtgaagcttacttcgtagatgctaatacattacgcgttatgactgaagagg cagctcaaacttatacgtttaaaaatgctgttcttgcaactggttctacaccaatcgaaattccaggattcaaatactct aaacgtgttatcaactctacaggcgctttaagcttacctgaaattcctaaaaaacttgttgtaatcggcggcggttacat cggtatggaattaggtactgcatatgctaacttcggtacagaagttactgtagtagaagctggcgacgaaatcttagct g gtttcgaaaaagctatgagctctgttgttaaacgtgctctacagaaaaaaggtaacgtaaatatccatacaaaagctatg gctaaaggcgttgaagaaacagaaactggcgtaaaagttagctttgaagttaaaggtgaaatccaaactgtagaagc aga ttacgtattagtaactgtaggtcgtcgtccaaacactcaagaaatcggtcttgagcaagttggagttaaaatgactgacc gcggcatcatcgaaatcgatgagcaatgtcgtacaaacgtaccaaacatctatgcaatcggtgatatcgttcctggacc a ccattagctcacaaagcttcttacgaaggtaaagtagctgtagaagcaattagtggccatgcatcagctatcgattacat cggaattcctgcagtatgcttcactgatccagaattagcatctgttggttacactaagaaacaagctgaagaagctgga a tgactgtaactgtatctaagttcccattcgctgctaacggtcgtgcattatcattaaacagcactgacggtttcttacaa cttgtaacacgtaaagaagatggtcttcttgtaggtgctcaagttgcaggtgcaggcgcttctgatattatttctgagat tggtttagctatcgaagctggaatgacagcagaagatatcgctcaaacaatccacgctcacccaacattaggtgaaat ca caatggaagcagctgaagttgctcttggaatgccaattcacattgtaaaataa	189
Protein MVVGDFPIELDTVVVGAGPGGYVAAIRAAQLGQKVAIIEKANLGGVCLN	190

[0647]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
VGCIPSKALINAGHRYENAMHSDDMGITAENVKVDFTKVQEWKNGVVK KLTGGVEGLLKGNKVEIIRGEAYFVDANTLRVMTEEAAQTYTFKNAVLA TGSTPIEIPGFKYSKRVINSTGALSLPEIPKKLVVIGGGYIGMELGTAYANF GTEVTVVEAGDEILAGFEKAMSSVVKRALQKKGNVNIHTKAMAKGVEET ETGVKVSFEVKGEIQTVEADYVLVTVGRRPNTQEIGLEQVGVKMTDRGII EIDEQCRTNVPNIYAIGDIVPGPPLAHKASYEGKVAVEAISGHASAIDYIGIP AVCFTDPELASVGYTKKQAEEAGMTVTVSKFPFAANGRALSLNSTDGFL QLVTRKEDGLLVGAQVAGAGASDIISEIGLAIEAGMTAEDIAQTIHAHPTL GEITMEAAEVALGMPIHIVK	
Brucella L7-L12	191
atggctgatctcgcaaagatcgttgaagacctttcggccctgaccgttctggaagccgctgagctgtccaagcttctcg aagagaagtggggcgtttcggctgctgctccggtcgctgttgctgctgccggtggcgctgccctgctgctgccgca gaagaaaagaccgaattcgacgtcgttctcgctgacggcggcgctaacaagatcaacgtgatcaaggaagtgcgcg cactcaccggtctcggcctcaaggaagccaaggacctggtcgaaggcgctccgaaggctgtcaaggaaggcgcct cgaaggacgaagctgagaagatcaaggcacagctcgaagctgctggcgccaaggttgaactcaagtaa	
Protein MADLAKIVEDLSALTVLEAAELSKLLEEKWGVSAAAPVAVAAAGGAAP AAAAEEKTEFDVVLADGGANKINVIKEVRALTGLGLKEAKDLVEGAPKA VKEGASKDEAEKIKAQLEAAGAKVELK	192
LSU Ribosomal Protein L9P	193
atggaagtcattcttctggaacgcattggccgcctcggccagatgggcgacaccgtcaaggtcaaggacggctatgc ccgcaacttcctgctgccgcagggcaaggctcttcgtgccaacgaagccaacaagaagaagtttgaaggccagcg cgcacagcttgaagcccagaacctggaacgcaagaacgaagcccaggctgttgccgacaagctcaatggcgaaa gcttcatcgtcgtgcgttcggcaggtgaaaccggccagctctacggttccgtttcgacccgcgacatcgccgaaatca tcacggccaacggcttcacgctgcaccgcaaccaggttgagctgaaccacccgatcaagacgatcggcctgcacg aagtttcggtttcgctgcacccggaagtccaggtcaaggtcatggtcaacatcgcgcgctcgaccgaagaagccga atgtcaggccaagggtgaagacctcacctcgatcgaagccatctacggcatcgaagagcagccgctttcggaagaa gtcttcgacgacgaagacgaagctgaagatcaggcttga	
Protein MEVILLERIGRLGQMGDTVKVKDGYARNFLLPQGKALRANEANKKKFEG QRAQLEAQNLERKNEAQAVADKLNGESFIVVRSAGETGQLYGSVSTRDIA EIITANGFTLHRNQVELNHPIKTIGLHEVSVSLHPEVQVKVMVNIARSTEE AECQAKGEDLTSIEAIYGIEEQPLSEEVFDDEDEAEDQA	194
OMIPP25	195
atgcgcactcttaagtctctcgtaatcgtctcggctgcgttgctgccgttctctgcgaccgcttttgctgccgacgccatc caggaacagcctccggttccggctccggttgaagtagctccccagtatagctgggctggtggctataccggtctttac cttggctacggctggaacaaggccaagaccagcaccgttggcagcatcaagcctgacgattggaaggctggcgcc tttgctggctggaacttccagcaggaccagatcgtatacggtgttgaaggtgatgcaggttattcctgggccaagaagt ccaaggacggcctggaagtcaagcagggctttgaaggctcgctgcgtgcccgcgttggctacgacctgaacccggt tatgccgtacctcacggctggtattgccggttcgcagatcaagcttaacaacggcttggacgacgaaagcaagttccg cgtgggttggacggctggtgccggtctcgaagccaagctgacggacaacatcctcggccgcgttgagtaccgttac acccagtacggcaacaagaactatgatctggccggtacgactgttcgcaacaagctggacacgcaggatttccgcgt cggcatcggctacaagttctaa	
Protein MRTLKSLVIVSAALLPFSATAFAADAIQEQPPVPAPVEVAPQYSWAGGYT GLYLGYGWNKAKTSTVGSIKPDDWKAGAFAGWNFQQDQIVYGVEGDA GYSWAKKSKDGLEVKQGFEGSLRARVGYDLNPVMPYLTAGIAGSQIKLN NGLDDESKFRVGWTAGAGLEAKLTDNILGRVEYRYTQYGNKNYDLAGT TVRNKLDTQDFRVGIGYKF	196
OMIPP31	197
atgtttagcttaaaagggactgttatgaaaaccgcacttcttgcatccgtcgcaatgttgttcacaagctcggctatggc tgccgacatcatcgttgctgaaccggcacccgttgcagtcgacacgttctcttggactggcggctatattggtatcaatg ctggttacgctggcggcaagttcaagcatccgttctcaggcatcgagcaggatggggcccaagatttttcaggttcgc	

[0648]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
tc gacgtcacggccagcggctttgttggcggcgttcaggccggttataactggcagcttgccaacggcctcgtgcttggt gg cgaagctgacttccagggctcgacggttaagagcaagcttgttgacaacggtgacctctccgatatcggcgttgcag gca acctcagcggcgacgaaagcttcgtcctcgagaccaaggttcagtggtttggaacggtgcgtgcgcgcctcggcttc acc ccgactgaacgcctgatggtctatggtaccggtggtttggcctatggtaaggtcaagacgtcgcttagcgcctatgac ga tggtgaatcgttcagcgccggaaactctaagaccaaggctggctggacgcttggtgcaggtgtagaatacgccgtca cca acaattggaccctgaagtcggaatacctctacaccgacctcggcaagcgttccttcaattacattgatgaagaaaacgt c aatattaacatggaaaacaaggtgaacttccacaccgtccgcctcggtctgaactacaagttctaa	
Protein MFSLKGTVMKTALLASVAMLFTSSAMAADIIVAEPAPVAVDTFSWTGGYI GINAGYAGGKFKHPFSGIEQDGAQDFSGSLDVTASGFVGGVQAGYNWQL ANGLVLGGEADFQGSTVKSKLVDNGDLSDIGVAGNLSGDESFVLETKVQ WFGTVRARLGFTPTERLMVYGTGGLAYGKVKTSLSAYDDGESFSAGNSK TKAGWTLGAGVEYAVTNNWTLKSEYLYTDLGKRSFNYIDEENVNINME NKVNFHTVRLGLNYKF	198
Omp2b Porin	199
atgcccagacccatttttaactttgactggaggtcagaaatgaacatcaagagccttctccttggctccgctgcagctct ggttgcagcttccggcgctcaggctgccgacgcaatcgtcgcgccagagcccgaagccgttgaatatgtccgcgttt gcgacgcttacggcgctggctacttctacattccgggcaccgaaatctgcctgcgcgtccatggttacgtccgttacg acgtaaagggcggcgatgacgtttactccggtaccgaccgcaatggctgggacaagggcgctcgtttcgcactccg cgtttccaccggttcggaaaccgaactcggcaccctcaagaccttcaccgaactgcgcttcaactatgctgcgaacaa ttcgggcgtagatggtaaatatggtaatgaaaccagcagcggcaccgtcatggagttcgcgtatatccagctcggtgg tctgcgcgttggtatcgatgaatcggaattccataccttcaccggttacctcggcgatgtcatcaacgatgacgtgatct cggctggctcctaccgcaccggcaagatctcgtacaccttcactggcggaaacggcttctcggctgtgatcgctctcg aacagggtggcgacaacgacggtggttacactggcacgaccaactaccacatcgacggctacatgcctgacgttgtt ggcggcctgaagtatgctggcggctggggttcgatcgctggtgttgttgcctatgactcggtcatcgaagaatgggct gccaaggttcgtggcgacgtcaacatcaccgaccagttctcggtttggttgcagggcgcatattcgtccgctgctacg ccggatcagaactacggccagtggggcggcgattgggctgtctggggtggtctgaagtatcaggctacgcagaag gctgccttcaacctgcaggctgcgcatgacgactggggcaagacggcagttacggctaacgttgcttacgaactggt tcctggcttcaccgttacgccggaagtttcctacaccaagtttggtggcgagtggaagaacactgttgctgaagacaat gcttggggcggtatcgttcgcttccagcgttcgttctaa	
Protein MPRPIFNFDWRSEMNIKSLLLGSAAALVAASGAQAADAIVAPEPEAVEYV RVCDAYGAGYFYIPGTEICLRVHGYVRYDVKGGDDVYSGTDRNGWDKG ARFALRVSTGSETELGTLKTFTELRFNYAANNSGVDGKYGNETSSGTVME FAYIQLGGLRVGIDESEFHTFTGYLGDVINDDVISAGSYRTGKISYTFTGGN GFSAVIALEQGGDNDGGYTGTTNYHIDGYMPDVVGGLKYAGGWGSIAG VVAYDSVIEEWAAKVRGDVNITDQFSVWLQGAYSSAATPDQNYGQWGG DWAVWGGLKYQATQKAAFNLQAAHDDWGKTAVTANVAYELVPGFTV TPEVSYTKFGGEWKNTVAEDNAWGGIVRFQRSF	200
OMP31b	201
atgtttagcttaaaagggactgttatgaaaaccgcacttcttgcatccgtcgcaatgttgttcacaagctcggctatggct gccgacatcatcgttgctgaaccggcacccgttgcagtcgacacgttctcttggactggcggctatattggtatcaatg ctggttacgctggcggcaagttcaagcatccgttctcaggcatcgagcaggatggggcccaagatttttcaggttcgc tcgacgtcacggccagcggctttgttggcggcgttcaggccggttataactggcagcttgccaacggcctcgtgcttg gtggcgaagctgacttccagggctcgacggttaagagcaagcttgttgacaacggtgacctctccgatatcggcgttg caggcaacctcagcggcgacgaaagcttcgtcctcgagaccaaggttcagtggtttggaacggtgcgtgcgcgcct cggcttcaccccgactgaacgcctgatggtctatggtaccggtggtttggcctatggtaaggtcaagacgtcgcttag cgcctatgacgatggtgaatcgttcagcgccggaaactctaagaccaaggctggctggacgcttggtgcaggtgtag aatacgccgtcaccaacaattggaccctgaagtcggaatacctctacaccgacctcggcaagcgttccttcaattacat	

[0649]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
tgatgaagaaaacgtcaatattaacatggaaaacaaggtgaacttccacaccgtccgcctcggtctgaactacaagttc taa	
Protein MFSLKGTVMKTALLASVAMLFTSSAMAADIIVAEPAPVAVDTFSWTGGYI GINAGYAGGKFKHPFSGIEQDGAQDFSGSLDVTASGFVGGVQAGYNWQL ANGLVLGGEADFQGSTVKSKLVDNGDLSDIGVAGNLSGDESFVLETKVQ WFGTVRARLGFTPTERLMVYGTGGLAYGKVKTSLSAYDDGESFSAGNSK TKAGWTLGAGVEYAVTNNWTLKSEYLYTDLGKRSFNYIDEENVNINME NKVNFHTVRLGLNYKF	202
Superoxide Dismutase (SOD)	203
atgaagtccttatttattgcatcgacaatggtgcttatggcttttccggctttcgcagaaagcacgacggtaaaaatgtat gaggcgctgccgaccggaccgggtaaagaagttggcaccgtggtcatttccgaagccccgggcgggctgcacttc aaggtgaatatggaaaagctgacgccgggctatcatggctttcatgttcacgaaaatccaagctgcgctccgggaga aaaagacggcaagatcgtaccggctcttgctgccggcgggcattatgatccgggtaatacccatcaccatttagggc ctgaaggtgatggacatatgggcgatttgccacgcctgagcgccaatgctgacggcaaggtgagtgaaaccgttgtc gctccacatctcaagaaattggcggaaatcaagcagcgttctttgatggtccatgtcggaggggataattattccgata agcctgagccgcttggtggcggtggtgcccgttttgcctgcggcgtgatcgaataa	
Protein MKSLFIASTMVLMAFPAFAESTTVKMYEALPTGPGKEVGTVVISEAPGGL HFKVNMEKLTPGYHGFHVHENPSCAPGEKDGKIVPALAAGGHYDPGNTH HHLGPEGDGHMGDLPRLSANADGKVSETVVAPHLKKLAEIKQRSLMVH VGGDNYSDKPEPLGGGGARFACGVIE	204
SSU Ribosomal Protein S1P	205
atggctattccggatgcaccaggagtatacatgtctcaatccaaccctacccgcgcagatttcgagtccctgctggca gaatcctttgcggaacatgatcttgctgaaggctatgtcgtcaagggccgcatcgtcgccatcgaaaaggacatggc gatcatcgacgccggtctgaaggtcgaaggtcgcgtgccgttgaaggaattttggcgcaaagggcaaagacggcac gctgaagccgggcgacgaagtggaagtttacgtcgagcgtatcgaaaacgctctgggcgaagctgtcctgtcgcgc gaaaaagcacgccgcgaagaaagctgggtcaagctcgagcagaagtttgccaatggcgagcgcgtcgatggtgtc atcttcaatcaggtcaagggtggtttcaccgtcgacctcgatggtgctgttgccttcctgccgcgcagccaggtcgata tccgtccgatccgcgacgtcaccccactcatgcacgtcccgcaaccgtttgaaatcctcaagatggacaagcgccgc ggcaacatcgttgtctcgcgccgtaccgttcttgaagaaagccgtgcggaacagcgttcggaaatcgtccagaacctt gaagaaggtcaggtcgttgaaggcgtcgtcaagaacatcaccgattacggtgcgttcgtcgacctcggcggcattga cggtctcctgcacgtgaccgacatggcatggcgccgcgtcaaccatccgtcggaaatcctcaccatcggccagacg gtcaaggtgcagatcatccgcatcaaccaggaaacccatcgtatctcgctcggcatgaagcagcttgagagcgatcc ttgggatggtatcggcgcgaagtacccgatcggcaaaaagatcaccggcaccgtcacgaacatcaccgattacggt gcgttcgtcgaaatcgagccgggcatcgaaggcctcatccacgtttccgaaatgtcgtggaccaagaagaatgtcca tccgggcaagattctgtccaccacgcaggaagtcgaagtcgttgtgctcgaagttgatccggtcaagcgccgtatctc gctcggcctcaagcagaccctcgacaatccgtggacgacctttgcccagaagtaccctgtcggtaccgtcgttgaag gcgaagtcaagaacaagaccgaattcggcctgttcatcggcctcgacggcgacgttgacggcatggttcacctctcc gacctcgactggaaccgtccgggcgaacaggtcatcgaagagtacaacaagggtgaagtggtcaaggctgtcgttc tcgacgttgatgtcgagaaggaacgcatctcgctcggcatcaagcagctttccggcgacaaggtcggcgaagcagc agcttccggcgaactgcgcaagaatgccgtcgtcacctgcgaagtgaccgccgttaccgatggtggccttgaggtcc gtctggtcgatcacgacctcgacagcttcatccgccgttcggatctgtcgcgtgaccgcgacgaacagcgtccggaa cgcttcacggtcggtcagaaggttgacgcccgcgtcatcgccttcgacaagaagacccgcaagttgcaggtctcgat caaggcgctcgaaatcgctgaagaaaaggaagcagtcgctcagtacggttcgtccgactccggcgcttcgctcggc gacattctcggcgctgccctgaagaagcaggaaaagaactga	
Protein MAIPDAPGVYMSQSNPTRADFESLLAESFAEHDLAEGYVVKGRIVAIEKD MAIIDAGLKVEGRVPLKEFGAKGKDGTLKPGDEVEVYVERIENALGEAVL SREKARREESWVKLEQKFANGERVDGVIFNQVKGGFTVDLDGAVAFLPR SQVDIRPIRDVTPLMHVPQPFEILKMDKRRGNIVVSRRTVLEESRAEQRSEI VQNLEEGQVVEGVVKNITDYGAFVDLGGIDGLLHVTDMAWRRVNHPSEI LTIGQTVKVQIIRINQETHRISLGMKQLESDPWDGIGAKYPIGKKITGTVTN ITDYGAFVEIEPGIEGLIHVSEMSWTKKNVHPGKILSTTQEVEVVVLEVDP VKRRISLGLKQTLDNPWTTFAQKYPVGTVVEGEVKNKTEFGLFIGLDGDV DGMVHLSDLDWNRPGEQVIEEYNKGEVVKAVVLDVDVEKERISLGIKQL	206

[0650]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
SGDKVGEAAASGELRKNAVVTCEVTAVTDGGLEVRLVDHDLDSFIRRSD LSRDRDEQRPERFTVGQKVDARVIAFDKKTRKLQVSIKALEIAEEKEAVA QYGSSDSGASLGDILGAALKKQEKN	
Avian Influenza	207
HA1 (from H5 Avian influenza (applies to others)) ataatggagaaaattgtactgctgttcgcgattgttagcctggtgaagtccgatcagatctgcatcggttatcatgctaac aacagcaccgaacaagttgataccatcatggagaaaaacgtaaccgtcacccacgctcaggacatcctggaaaaaa agcacaacggtaaactgtgcgatctggatggtgtgaaaccgctgatcctgcgtgactgctccgtagcaggttggctgc tgggtaacccgatgtgcgacgagttcatcaacgttccagaatggtcctacattgtcgaaaaagctaacccggttaacg acctgtgttatccgggtgatttcaacgattatgaagaactgaagcacctgctgtctcgcatcaaccactttgaaaagatc cagattatcccaaaatcctcttggtcttcccacgaagcgtctctgggtgtgagcagcgcttgtccgtaccagggtaaat cctcttttcttccgtaacgttgtttggctgatcaagaaaaattctacctacccaaccatcaaacgttcttacaacaacaccaa tcaggaggatctgctggttctgtggggtatccaccacccgaacgacgcagcagaacagactaagctgtaccagaac ccgaccacctacatcagcgttggcacttctactctgaaccagcgtctggtgccgcgcatcgcgacccgttctaaggta aatggtcagtctggtcgtatggaatttttctggaccatcctgaaaccgaacgacgcgatcaactttgagtccaacggta acttcatcgctccagaatacgcgtacaaaatcgttaaaaagggcgattctactattatgaagtctgaactggaatacggt aactgcaatactaaatgccagacgccgatgggtgctattaacagcagcatgccatttcacaacattcaccctctgactat cggcgagtgcccgaaatacgtaaaaagcaaccgtctggttctggcgaccggcctgcgtaactctccgata	
Protein IMEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE KKHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKA NPVNDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSAC PYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAA EQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPN DAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINS SMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPI	208
HA epitope (epitope sequences from various Influenza H5 proteins)DNA atggtaccggcaccagcgatggaaaaaaatgttaccgttactcatgctcaagacattctggaaaaaaagcataatggt aaagcgcctgctgacctggacggtgtaaaaccactgattctgcgtgattgttccgtagctggcgctcctgctccggtta acgatctgtgttatccaggcgatttcaacgactacgaggaactggcaccggcgattcagatcatcccgaaatcttcctg gtctagccacgaagcgtccctgggcgtttcctccgcttgcccttaccaaggcaaaagctctgcaccggcacgcaacg ttgtatggctgatcaagaaaaactccacctatccgaccatcaaacgcagctacaataacaccaaccaggaggacgct ccggctcaccatccgaatgacgccgcagaacagacgaagctgtaccagaacccgaccaccgctccagccgttaaa aagggtgacagcacgattatgaaaagcgagctggaatacggcaactgcaacactaaatgccagactccaatgggc gctattaacagctccatgccgtttgctccggccattcaaatcattccaaaatctagctggtccgaccatgaagcatccag cggcgtgtcctctgcctgcccatatcagggcacccgagcgcaccggctgttccacgcatcgctacgcgttctaagg tgaacggtcagtctggtcgtgctccggctgttaagaaaggcgatagcgccattgttaagtctgaagtggaatacggta actgtaacactaagtgtcaaactcctatcggtgccatcaactcttccatgccgttcgcaccggcaggtgttagcagcgc atgcccgtaccagggccgcagctctgcgccggctggtgttagctccgcttgtccgtatctgggttctccgagcgcacc agcgggcgttagctctgcctgtccgtacctgggtcgttccagcgctccggca	209
Protein MVPAPAMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKAPADLDGVKPLILRDCSVAGAP APVNDLCYPGDFNDYEELAPAIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSA PARNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDAPAHHPNDAAEQTKLYQNPT TAPAVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFAPAIQIIPKSSW SDHEASSGVSSACPYQGTPSAPAVPRIATRSKVNGQSGRAPAVKKGDSAI VKSEVEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFAPAGVSSACPYQGRSSAPAGVSSA CPYLGSPSAPAGVSSACPYLGRSSAPA	210
M1-M2 Matrix proteins atgtctctgctgaccgaagtagaaactccaactcgtaatgaatgggaatgccgctgctctgactctagcgaccctatcg ttgtggcggcaaacattatcggcatcctgcacctgattctgtggattctggaccgcctgtttttcaaatgtatctaccgcc gtctgaaatacggtctgaaacgcggtccggctacggcaggcgttccggagtctatgcgcgaagaataccgtcagga gcaacagtctgccgtggatgttgatgacggccacttcgtaaacattgaactggaaggtggtatgtccctgctgactgaa gtagaaacctatgtcctgtccatcattccgtctggcccgctgaaagctgagattgctcaaaaactggaagacgttttcgc tggtaaaaatacgatctggaggctctgatggagtggctgaaaacccgcccgatcctgtccccactgaccaaaggta tcctgggtttcgttttcaccctgactgtaccgtccgaacgtggtctgcaacgccgtcgctttgtgcaaaacgctctgaac	211

[0651]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
ggcaatggtgacccgaacaatatggaccgtgctgtgaaactgtataaaaagctgaagcgtgaaatcaccttccacgg cgccaaagaagttgctctgtcctacagcaccggtgcactggcttcctgcatgggtctgatctacaaccgtatgggcact gtaacgacggaagttgccttcggtctggtctgtgccacctgtgaacaaatcgcggattctcagcaccgctcccaccgt cagatggcgactatcactaacccgctgattcgtcacgaaaaccgtatggttctggcgtccactaccgcgaaagcaatg gaacagatggctggttcctccgaacaggccgcagaggctatggaaatcgctaaccaagctcgtcagatggttcagg ctatgcgcactattggtacccatccgaactcttccgccggtctgcgtgataacctgctggaaaacctgcaagcctacca gaaacgtatgggtgtgcaaatgcagcgtttcaaataa	
Protein	212
MSLLTEVETPTRNEWECRCSDSSDPIVVAANIIGILHLILWILDRLFFKCIYR RLKYGLKRGPATAGVPESMREEYRQEQQSAVDVDDGHFVNIELEGGMSL LTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPL TKGILGFVFTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKKLK REITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQI ADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEA MEIANQARQMVQAMRTIGTHPNSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQMQR FK	
Norovirus ORF2 (Major Capsid Protein) from Snow Mountain Strain DNA Sequence codon optimized for optimal expression in E. coli	213
aaaatggcttctaatgatgctgctccttctactgatggtgctgctggtctggtgccagaatccaacaacgaagtcatggc cctggagccggttgcgggtgcagcgctggcagcgccggtaaccggtcagaccaatatcatcgatccgtggattcgt gctaatttcgtgcaggccccgaacggcgagtttaccgtgtccccgcgtaacgcaccgggtgaggttctgctgaacct ggaactgggcccggaactgaacccgtatctggcacacctggcgcgtatgtacaacggttatgccggtggtatggag gttcaggttatgctggcaggtaacgcgtttaccgcgggcaagctggtatttgcggccgtgcctcctcatttcccagtgg agaacctgagcccgcagcagatcaccatgttcccacatgtgattattgatgttcgtactctggaacctgtgctgctgcc gctgccggatgttcgcaacaatttcttccactataaccagaaagacgacccgaaaatgcgcatcgtcgctatgctgtat acgccgctgcgttccaatggttctggtgatgacgttttcactgtaagctgccgtgtactgactcgtccatctccggatttc gactttacttacctggtgccgccgactgtagagtctaaaaccaaaccgttcactctgccgatcctgaccctgggtgaac tgtctaactctcgtttcccggtatctatcgaccagatgtatacctctcctaatgaagttatctccgtccagtgccagaacg gtcgctgcaccctggacggtgaactgcaaggcaccacccaactgcaagtttccggcatctgcgctttcaaaggcgaa gtaaccgctcacctgcaagataacgatcacctgtataacatcacgatcaccaacctgaacggcagcccgttcgaccc gtctgaggacattccggccccactgggtgtaccggatttccagggccgtgtgtttggtgttatcacccaacgtgacaaa cagaacgcggcaggtcagagccagccggcgaaccgtggtcatgacgcagttgttcctacttacacggcgcagtaca ccccaaaactgggccaggtacaaatcggtacttggcagactgatgatctgaaggttaaccagccagtgaaattcacc ccggttggtctgaacgacactgagcactttaaccagtgggttgtaccgcgttatgcgggtgctctgaatctgaacacca acctggcgcctagcgtggctccggtattcccgggcgaacgcctgctgttctttcgttcctacctgccgctgaaaggtg gttatggtaacccggctattgattgcctgctgccgcaggagtgggtgcagcacttctatcaggaggcggctccgtcca tgtctgaagttgcgctggttcgttacatcaacccggacaccggccgtgcgctgttcgaagcgaaactgcaccgcgca ggcttcatgaccgtgtcctctaatacttccgcaccggttgttgtacctgccaatggttacttccgcttcgattcttgggtaa accagttttactctctggcaccgatgggtactggcaacggccgtcgccgtatccagtaa	
Protein	214
KMASNDAAPSTDGAAGLVPESNNEVMALEPVAGAALAAPVTGQTNIIDP WIRANFVQAPNGEFTVSPRNAPGEVLLNLELGPELNPYLAHLARMYNGY AGGMEVQVMLAGNAFTAGKLVFAAVPPHFPVENLSPQQITMFPHVIIDVR TLEPVLLPLPDVRNNFFHYNQKDDPKMRIVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVS CRVLTRPSPDFDFTYLVPPTVESKTKPFTLPILTLGELSNSRFPVSIDQMYTS PNEVISVQCQNGRCTLDGELQGTTQLQVSGICAFKGEVTAHLQDNDHLY NITITNLNGSPFDPSEDIPAPLGVPDFQGRVFGVITQRDKQNAAGQSQPAN RGHDAVVPTYTAQYTPKLGQVQIGTWQTDDLKVNQPVKFTPVGLNDTE HFNQWVVPRYAGALNLNTNLAPSVAPVFPGERLLFFRSYLPLKGGYGNP AIDCLLPQEWVQHFYQEAAPSMSEVALVRYINPDTGRALFEAKLHRAGF MTVSSNTSAPVVVPANGYFRFDSWVNQFYSLAPMGTGNGRRRIQ	
Salmonella fliC gi:16765297 product="flagellin 1 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa	215

[0652]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
61 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 121 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt 181 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 241 gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct 301 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 361 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 421 gacaacaccc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 481 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgctga atgtgcaaca aaaatataag 541 gtcagcgata cggctgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc tttagacaat 601 agtacttttа aagcctcggc tactggtctt ggtggtactg accagaaaat tgatggcgat 661 ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgccaaag ttaccgttac ggggggaact 721 ggtaaagatg gctattatga agtttccgtt gataagacga acggtgaggt gactcttgct 781 ggcggtgcga cttccccgct tacaggtgga ctacctgcga cagcaactga ggatgtgaaa 841 aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt 901 gttaccggca cagcatctgt tgttaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt 961 gatggtggtt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat 1021 ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca 1081 ctaaacaaac tgggtggcgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact 1141 tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg 1201 gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac 1261 acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg 1321 ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg 1381 accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgcag attctgcagc aggccggtac ctccgttctg 1441 gcgcaggcga accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa	
Protein	216
1 maqvintnsl slltqnnlnk sqsalgtaie rlssglrins akddaagqai anrftanikg 61 ltqasrnand gisiaqtteg alneinnnlq rvrelavqsa nstnsqsdld siqaeitqrl 121 neidrvsgqt qfngvkvlaq dntltiqvga ndgetididl kqinsqtlgl dtlnvqqkyk 181 vsdtaatvtg yadttialdn stfkasatgl ggtdqkidgd lkfddttgky yakvtvtggt 241 gkdgyyevsv dktngevtla ggatspltgg lpatatedvk nvqvanadlt eakaaltaag 301 vtgtasvvkm sytdnngkti dgglavkvgd dyysatqnkd gsisinttky taddgtskta 361 lnklggadgk tevvsiggkt yaaskaeghn fkaqpdlaea aatttenplq kidaalaqvd 421 tlrsdlgavq nrfnsaitnl gntvnnltsa rsriedsdya tevsnmsraq ilqqagtsvl 481 aqanqvpqnv lsllr	
Sef14 fimbrial subunit precursor gene="sefA gi:1405814	217
1 atgcgtaaat cagcatctgc agtagcagtt cttgctttaa ttgcatgtgg cagtgcccac 61 gcagctggct ttgttggtaa caaagcagag gttcaggcag cggttactat tgcagctcag 121 aatacaacat cagccaactg gagtcaggat cctggcttta cagggcctgc tgttgctgct 181 ggtcagaaag ttggtactct cagcattact gctactggtc cacataactc agtatctatt 241 gcaggtaaag gggcttcggt atctggtggt gtagccactg tcccgttcgt tgatggacaa 301 ggacagcctg ttttccgtgg gcgtattcag ggagccaata ttaatgacca agcaaatact 361 ggaattgacg ggcttgcagg ttggcgagtt gccagctctc aagaaacgct aaatgtccct 421 gtcacaacct ttggtaaatc gaccctgcca gcagggactt tcactgcgac cttctacgtt 481 cagcagtatc aaaactaa	
Protein	218
MRKSASAVAVLALIACGSAHAAGFVGNKAEVQAAVTIAAQNTTSANWS QDPGFTGPAVAAGQKVGTLSITATGPHNSVSIAGKGASVSGGVATVPFVD GQGQPVFRGRIQGANINDQANTGIDGLAGWRVASSQETLNVPVTTFGKST LPAGTF TATFYVQQYQN	
Fimbrin / fimA	219

[0653]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
1 atgacctcta ctattgcgag tctgatgttt gtcgctggcg cagcggttgc ggctgatcct 61 actccggtga gcgtgagtgg cggtactatt catttcgaag gtaaactggt taatgcagcc 121 tgtgccgtca gcactaaatc cgccgatcaa acggtgacgc tgggtcaata ccgtaccgcc 181 agctttacgg cgattggtaa tacgactgcg caggtgcctt tctccatcgt cctgaatgac 241 tgcgatccga aagtggcggc caacgctgcc gtggctttct ctggtcaggc agataacacc 301 aaccctaatt tgctggctgt ctcctctgcg gacaatagca ctaccgcaac cggcgtcggg 361 attgagattc ttgataatac ctcttcaccg ttgaagccgg acggcgcgac cttctcggcg 421 aagcagtcgc tggttgaagg caccaatacg ctgcgtttta ccgcacgcta taaggcaacc 481 gccgccgcca cgacgccagg ccaggctaat gccgacgcca cctttatcat gaaatacgaa 541 taa	
Protein	220
1 MTSTIASLMFVAGAAVAADPTPVSVSGGTIHFEGKLVNAACAVSTKSADQ TVTLGQYRTA 61 SFTAIGNTTAQVPFSIVLNDCDPKVAANAAVAFSGQADNTNPNLLAVSSA DNSTTATGVG 121 IEILDNTSSPLKPDGATFSAKQSLVEGTNTLRFTARYKATAAATTPGQAN ADATFIMKYE	
prgI / needle complex major subunit gi:16766179	221
1 atggcaacac cttggtcagg ctatctggat gacgtctcag caaaatttga tacgggcgtt 61 gataatctac aaacgcaggt aacagaggcg ctggataaat tagcagcaaa accctccgat 121 ccggcgctac tggcggcgta tcagagtaag ctctcggaat ataacttgta ccgtaacgcg 181 caatcgaaca cggtaaaagt ctttaaggat attgatgctg ccattattca gaacttccgt 241 taa	
Protein 1 MATPWSGYLDDVSAKFDTGVDNLQTQVTEALDKLAAKPSDPALLAAYQ SKLSEYNLYRNA 61 QSNTVKVFKD IDAAIIQNFR	222
Shigella IpaB	223
cataatgtaagcaccacaaccactggttttcctcttgccaaaatattggcttccactgagcttggagacaatactatcca agctgcaaatgatgcagctaacaaattattttctcttacaattgctgatcttactgctaaccaaaatattaatacaacta atgcacactcaacttcaaatatattaatccctgaacttaaagcaccaaagtcattaaatgcaagttcccaactaacgctt ttaattggaaaccttattcaaatactcggtgaaaaatctttaactgcattaacaaataaaattactgcttggaagtccca gcaacaggcaagacagcaaaaaaacctagaattctccgataaaattaacactcttctatctgaaactgaaggactaac ca gagactatgaaaaacaaattaataaactaaaaaacgcagattctaaaataaaagacctagaaaataaaattaaccaaat t caaacaagattatccgaactcgacccagagtcaccagaaaagaaaaaattaagccgggaagaaatacaactcactat caa aaaagacgcagcagttaaagacaggacattgattgagcagaaaaccctgtcaattcatagcaaacttacagataaatc aa tgcaactcgaaaaagaaatagactctttttctgcattttcaaacacagcatctgctgaacagctatcaacccagcagaaa tcattaaccggacttgccagtgttactcaattgatggcaacctttattcaactagttggaaaaaataatgaagaatcttt aaaaaatgatctggctctattccagtctctccaagaatcaagaaaaactgaaatggagagaaaatctgatgagtatgct g ctgaagtacgtaaagcagaagaactcaacagagtaatgggttgtgttgggaaaatacttggggcacttttaactatcgtt agtgttgttgcagcagctttttctggaggagcctctctagcactggcagctgttggtttagctcttatggttacggatgc tatagtacaagcagcgaccggcaattccttcatggaacaagccctgaatccgatcatgaaagcagtcattgaaccctta a tcaaactcctttcagatgcatttacaaaaatgctcgaaggcttgggcgtcgactcgaaaaaagccaaaatgattggctc	

[0654]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
t attctgggggcaatcgcaggcgctcttgtcctagttgcagcagtcgttctcgtagccactgttggtaaacaggcagca gc aaaacttgcagaaaatattggcaaaataataggtaaaaccctcacagaccttataccaaagtttctcaagaatttttctt ctcaactggacgatttaatcactaatgctgttgccagattaaataaatttcttggtgcagcgggtgatgaagtaatatcc aaacaaattatttccacccatttaaaccaagcagttttattaggagaaagtgttaactctgccacacaagcgggaggaa g tgtcgcttctgctgttttccagaacagcgcgtcgacaaatctagcagacctgacattatcgaaatatcaagttgaacaac tgtcaaaatatatcagtgaagcaatagaaaaattcggccaattgcaggaagtaattgcagatctattagcctcaatgtcc aactctcaggctaatagaactgatgttgcaaaagcaattttgcaacaaactactgcttga	
Protein HNVSTTTTGFPLAKILASTELGDNTIQAANDAANKLFSLTIADLTANQNIN TTNAHSTSNILIPELKAPKSLNASSQLTL LIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGL TRDYEKQINKLKNADSKIKDLENKINQI QTRLSELDPESPEKKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSIHSKLTDK SMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQQK SLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERKSD EYAAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAFSGGASLALAAVG LALMVTDAIVQAATGNSFMEQALNPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLG VDSKKAKMIGSILGAIAGALVLVAAVVLVATVGKQAAAKLAENIGKIIGK TLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVARLNKFLGAAGDEVISKQIISTHLNQA VLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAI EKFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQTTA	224
IpaC	225
gaaattcaaaacacaaaaccaacccagactttatatacagatatatccacaaaacaaactcaaagttcttccgaaacac a aaaatcacaaaattatcagcagattgcagcgcatattccacttaatgtcggtaaaaatcccgtattaacaaccacattaa atgatgatcaacttttaaagttatcagagcaggttcagcatgattcagaaatcattgctcgccttactgacaaaaagatg aaagatctttcagagatgagtcacacccttactccagagaacactctggatatttccagtctttcttctaatgctgtttc tttaattattagtgtagccgttctactttctgctctccgcactgcagaaactaaattgggctctcaattgtcattgattg cgttcgatgctacaaaatcagctgcagagaacattgttcggcaaggcctggcagccctatcatcaagcattactggag ca gtcacacaagtaggtataacgggtatcggtgccaaaaaaacgcattcagggattagcgaccaaaaaggagccttaa gaaa gaaccttgccactgctcaatctcttgaaaaagagcttgcaggttctaaattagggttaaataaacaaatagatacaaata tcacctcaccacaaactaactctagcacaaaatttttaggtaaaaataaactggcgccagataatatatccctgtcaact gaacataaaacttctcttagttctcccgatatttctttgcaggataaaattgacacccagagaagaacttacgagctcaa tacccttttctgcgcagcaaaaacaaaacattggccgtgcaacaatggaaacatcagccgttgctggtaatatatccaca t caggagggcgttatgcatctgctcttgaagaagaagaacaactaatcagtcaggccagcagtaaacaagcagagga agca tcccaagtatctaaagaagcatcccaagcgacaaatcaattaatacaaaaattattgaatataattgacagcatcaacca atcaaagaattcgacagccagtcagattgctggtaacattcgagcttaa	226
Protein EIQNTKPTQTLYTDISTKQTQSSSETQKSQNYQQIAAHIPLNVGKNPVLTTT LNDDQLLKLSEQVQHDSEIIARLTDKKM KDLSEMSHTLTPENTLDISSLSSNAVSLIISVAVLLSALRTAETKLGSQLSLI AFDATKSAAENIVRQGLAALSSSITGA VTQVGITGIGAKKTHSGISDQKGALRKNLATAQSLEKELAGSKLGLNKQI DTNITSPQTNSSTKFLGKNKLAPDNISLST EHKTSLSSPDISLQDKIDTQRRTYELNTLSAQQKQNIGRATMETSAVAGNI STSGGRYASALEEEEQLISQASSKQAEEA SQVSKEASQATNQLIQKLLNIIDSINQSKNSTASQIAGNIRA.	227
MxiH	

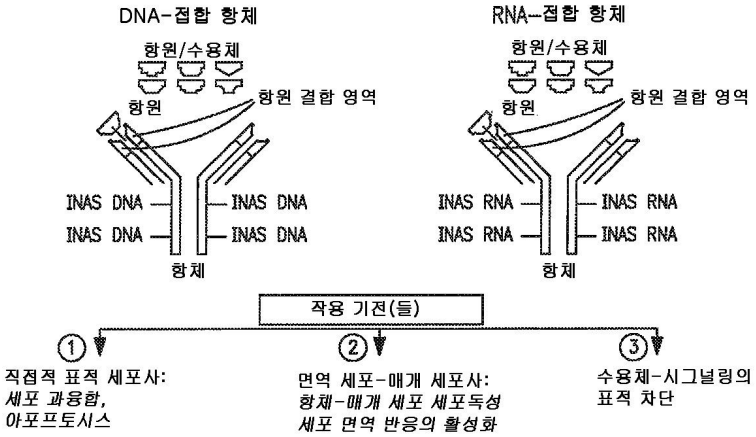
[0655]

SEQUENCE	SEQ ID NO:
agtgttacagtaccgaatgatgattggacattgagttcattatctgaaacttttgatgatggaactcaaacattacaagg tgaactaacattggcactagataaaattagctaaaaatccttcgaatccacagttgctggctgaataccaaagtaaattat ctgaatatacattatataggaacgcgcaatccaatacagtgaaagtgattaaggatgttgatgctgcaattattcaaaac ttcagataa	
Protein SVTVPNDDWTLSSLSETFDDGTQTLQGELTLALDKLAKNPSNPQLLAEYQ SKLSEYTLYRNAQSNTVKVIKDVDAAIIQNFR	228

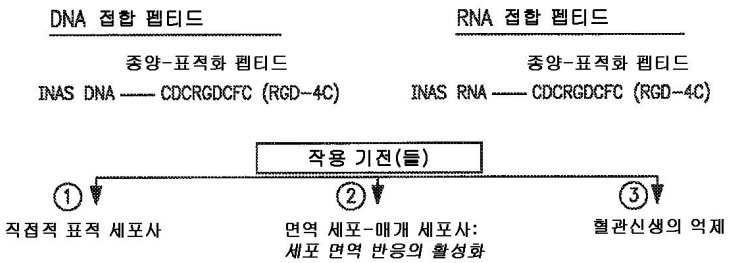
[0656]

도면

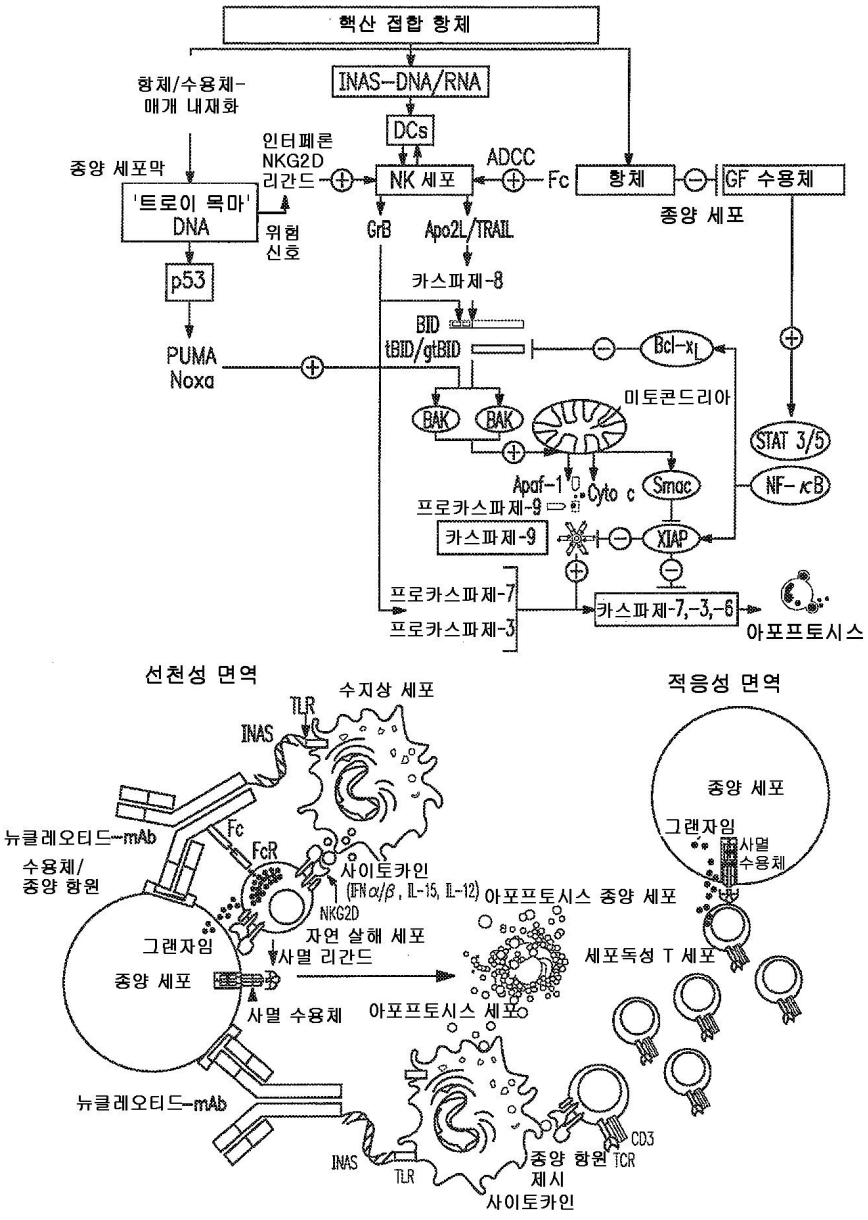
도면1


DNA-접합 항체
항원/수용체
항원
항원 결합 영역
INAS DNA
INAS DNA
INAS DNA
INAS DNA
항체
RNA-접합 항체
항원/수용체
항원
항원 결합 영역
INAS RNA
INAS RNA
INAS RNA
INAS RNA
항체
작용 기전(들)
①
직접적 표적 세포사:
세포 과응함,
아포프토시스
②
면역 세포-매개 세포사:
항체-매개 세포 세포독성
세포 면역 반응의 활성화
③
수용체-시그널링의
표적 차단

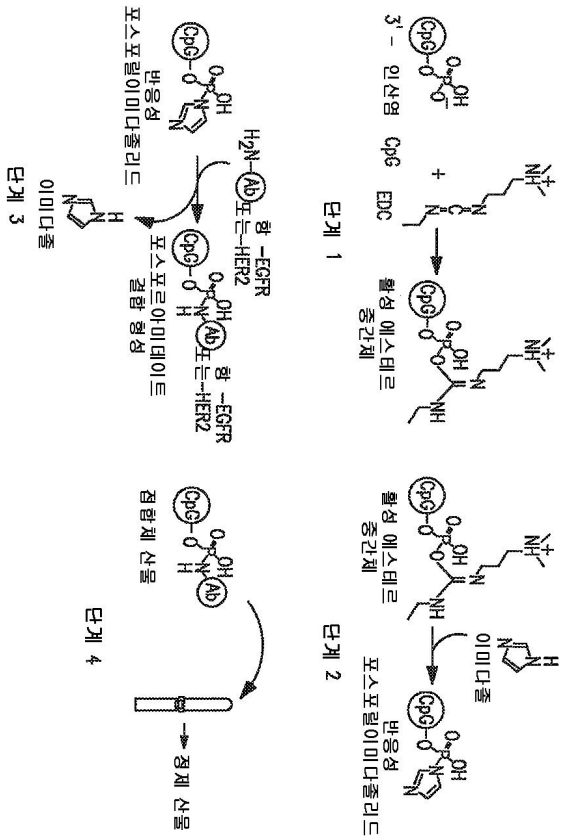
도면2


DNA 접합 펩티드
종양-표적화 펩티드
INAS DNA —— CDCRGDCFC (RGD-4C)
RNA 접합 펩티드
종양-표적화 펩티드
INAS RNA —— CDCRGDCFC (RGD-4C)
작용 기전(들)
①
직접적 표적 세포사
②
면역 세포-매개 세포사:
세포 면역 반응의 활성화
③
혈관신생의 억제

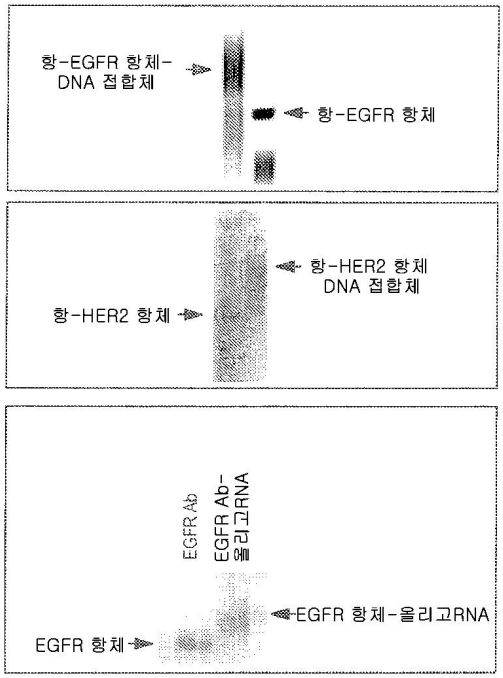
도면3


핵산 접합 항체
INAS-DNA/RNA
항체/수용체-
매개 내재화
DCs
종양 세포막
인터페론
NKG2D
리간드
NK 세포
ADCC
Fc
항체
GF 수용체
'트로이 목마'
DNA
위험
신호
GrB
Apo2L/TRAIL
종양 세포
p53
카스파제-8
BID
tBID/gtBID
Bcl-xL
PUMA
Noxa
미토콘드리아
BAK
BAK
STAT 3/5
NF-κB
Apaf-1
Cyto c
Smac
프로카스파제-9
카스파제-9
XIAP
프로카스파제-7
프로카스파제-3
카스파제-7,-3,-6
아포프토시스
선천성 면역
수지상 세포
TLR
INAS
적응성 면역
종양 세포
그랜자임
사멸
수용체
뉴클레오티드-mAb
수용체/
종양 항원
Fc
FcR
사이토카인
(IFNα/β, IL-15, IL-12)
아포프토시스 종양 세포
NKG2D
그랜자임
자연 살해 세포
사멸 리간드
종양 세포
세포독성 T 세포
사멸 수용체
아포프토시스 세포
뉴클레오티드-mAb
INAS
TLR
CD3
종양 항원 TCR
제시
사이토카인

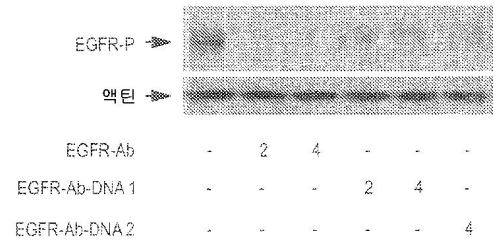
도면4


단계 1
단계 2
단계 3
단계 4
3' - 인산염 CpG
EDC
활성 에스테르 중간체
이미다졸
반응성 포스포릴이미다졸리드
항 -EGFR 또는-HER2
포스포르아미데이트 결합 형성
정제 산물

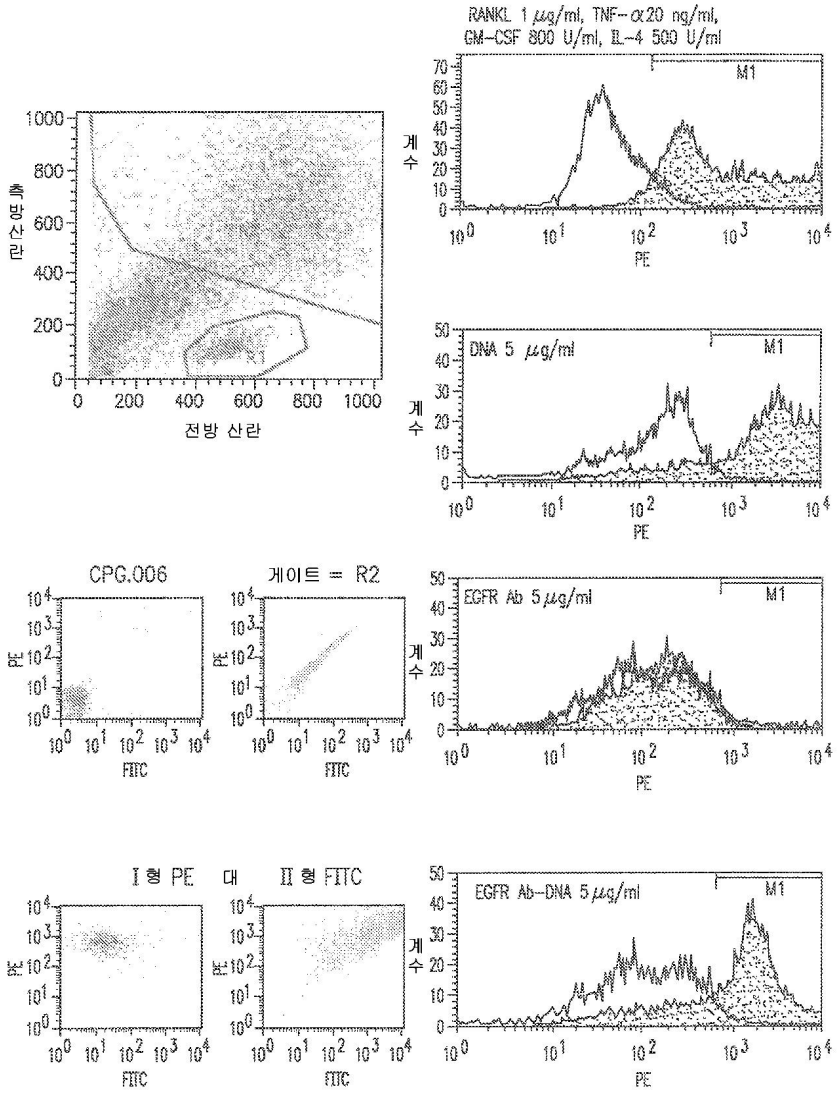
도면5


항-EGFR 항체-DNA 접합체
항-EGFR 항체
항-HER2 항체
항-HER2 항체 DNA 접합체
EGFR Ab
EGFR Ab-올리고RNA
EGFR 항체-올리고RNA
EGFR 항체

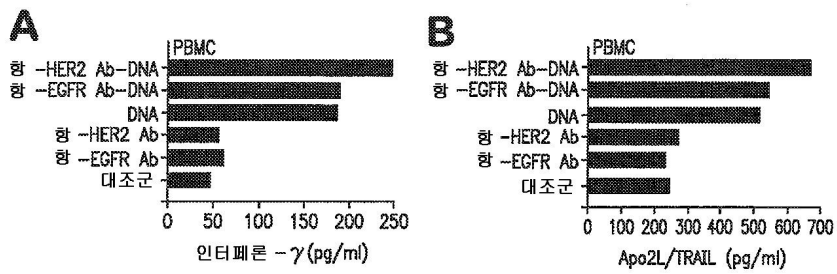
도면6


EGFR-P
액틴
EGFR-Ab - 2 4 - - -
EGFR-Ab-DNA 1 - - - 2 4 -
EGFR-Ab-DNA 2 - - - - - 4

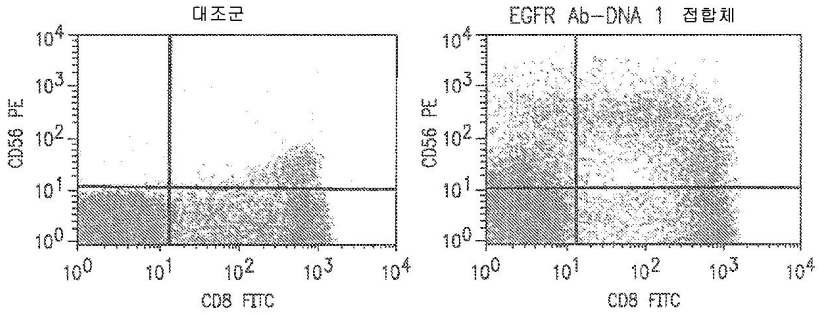
도면7


RANKL 1 μg/ml, TNF-α 20 ng/ml,
GM-CSF 800 U/ml, IL-4 500 U/ml
M1
DNA 5 μg/ml
EGFR Ab 5 μg/ml
EGFR Ab-DNA 5 μg/ml
R1
R2
CPG.006
게이트 = R2
I형 PE 대 II형 FITC
측방산란
전방 산란
계수
PE
FITC

도면8



도면9



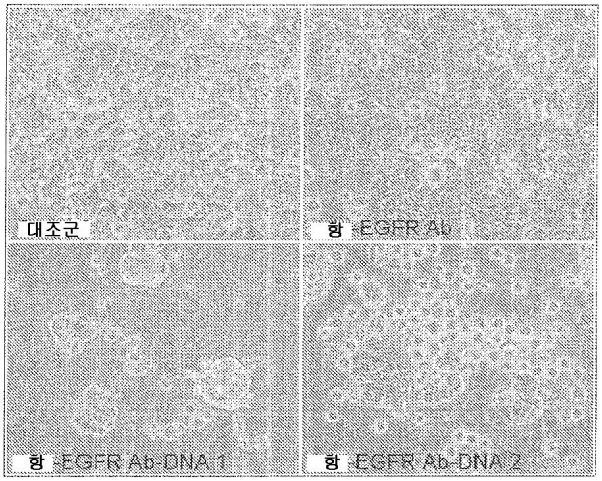
도면10

HLA II 형 (MHC) (%)	
대조군	12.2
EGFR Ab-DNA	31.5
EGFR Ab-RNA	21.0
PMA	39.6

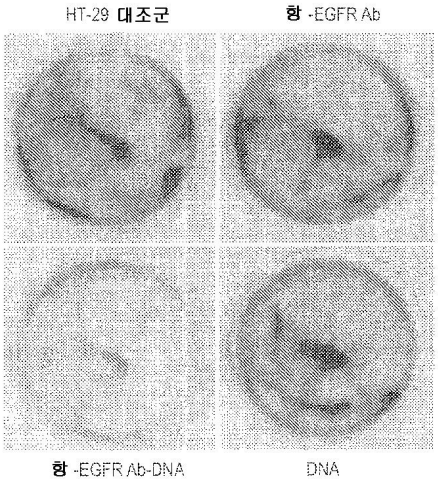
도면11

MDA-MB468 (EGFR+ 인간 유방암)			SKBr3 (HER2+ 인간 유방암)		
Apo2L/TRAIL 발현	시간	차이 배수 (X 대조군)	Apo2L/TRAIL 발현	시간	차이 배수 (X 대조군)
EGFR Ab-DNA 1	24h 48h 72h	1.5 2.7 3.8	HER2 Ab-DNA 1	48h	4.3
EGFR Ab-DNA 2	24h 48h 72h	1.5 2.7 3.8	HER2 Ab-DNA 2	48h	4.8

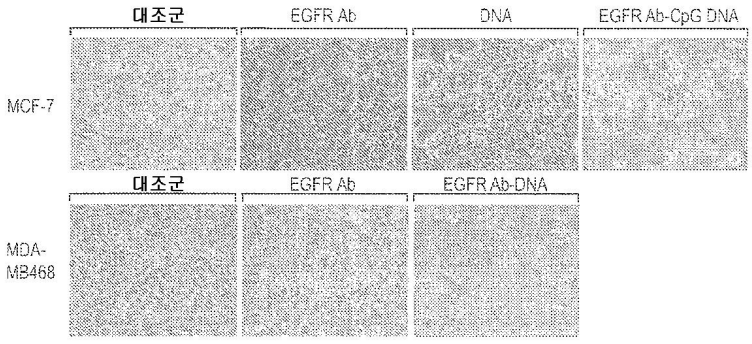
도면12



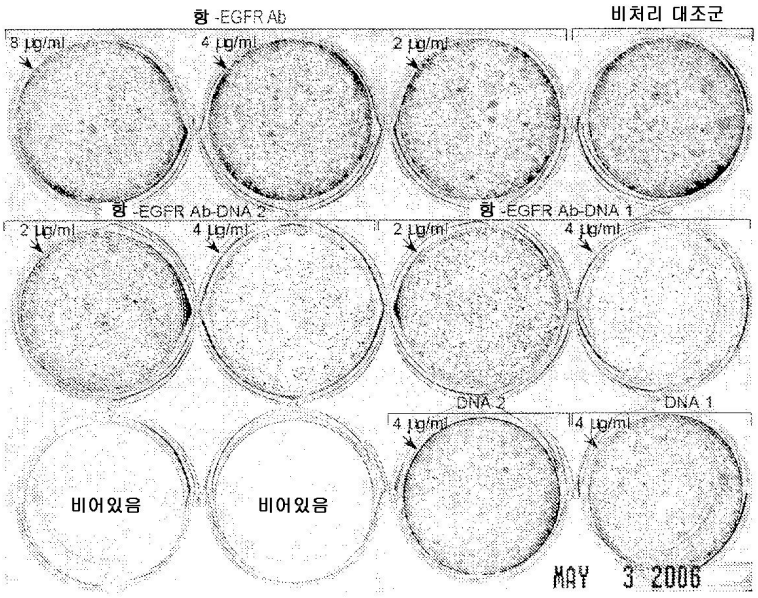
도면13



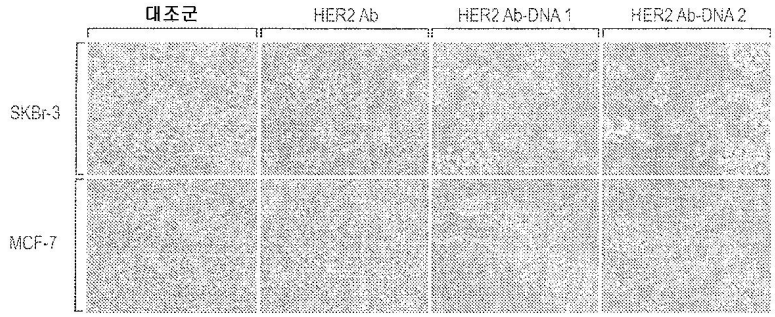
도면14



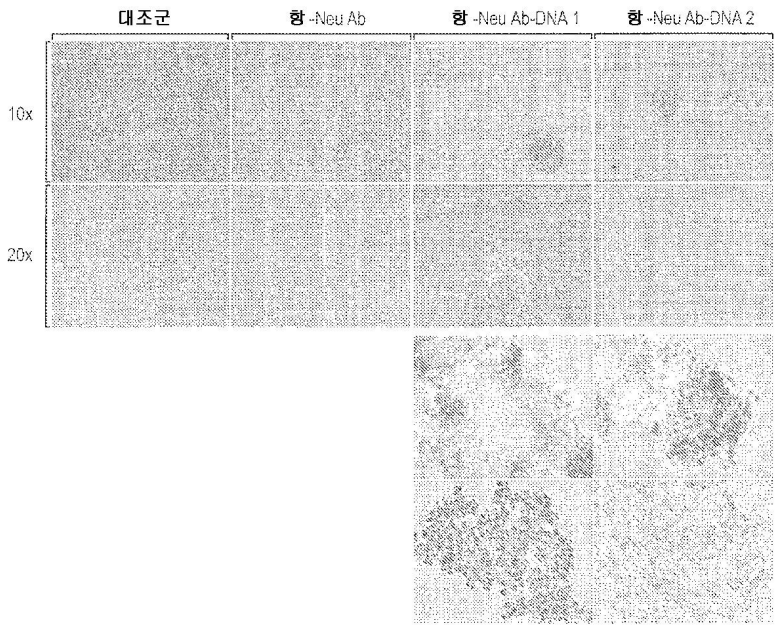
도면15



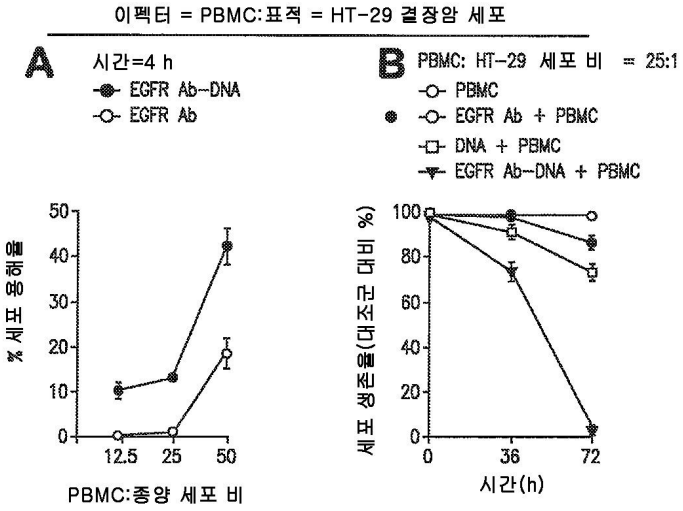
도면16



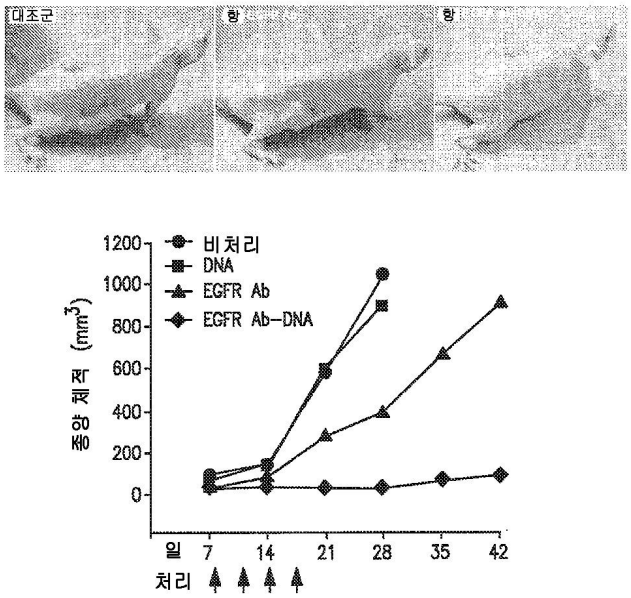
도면17



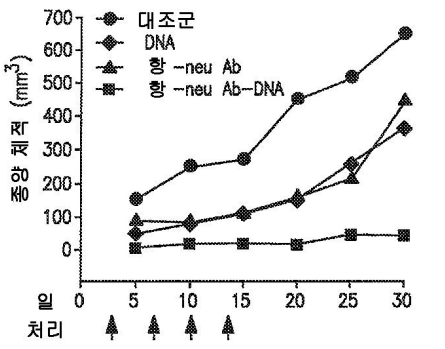
도면18



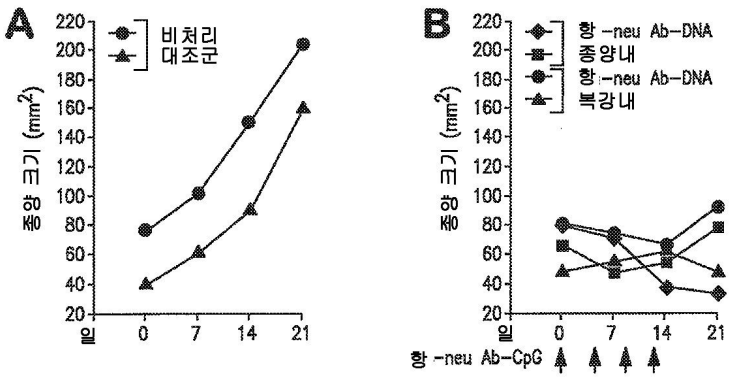
도면19



도면20

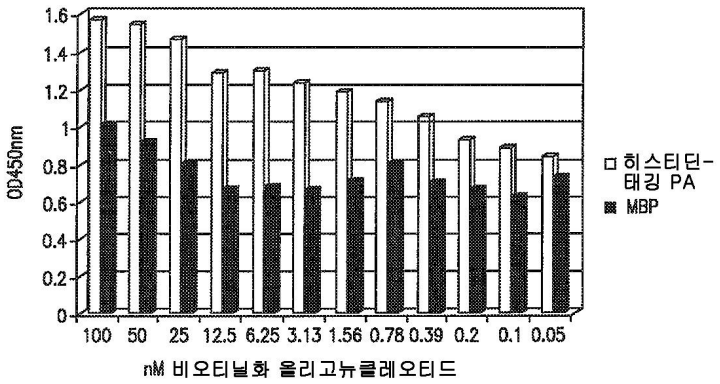


도면21

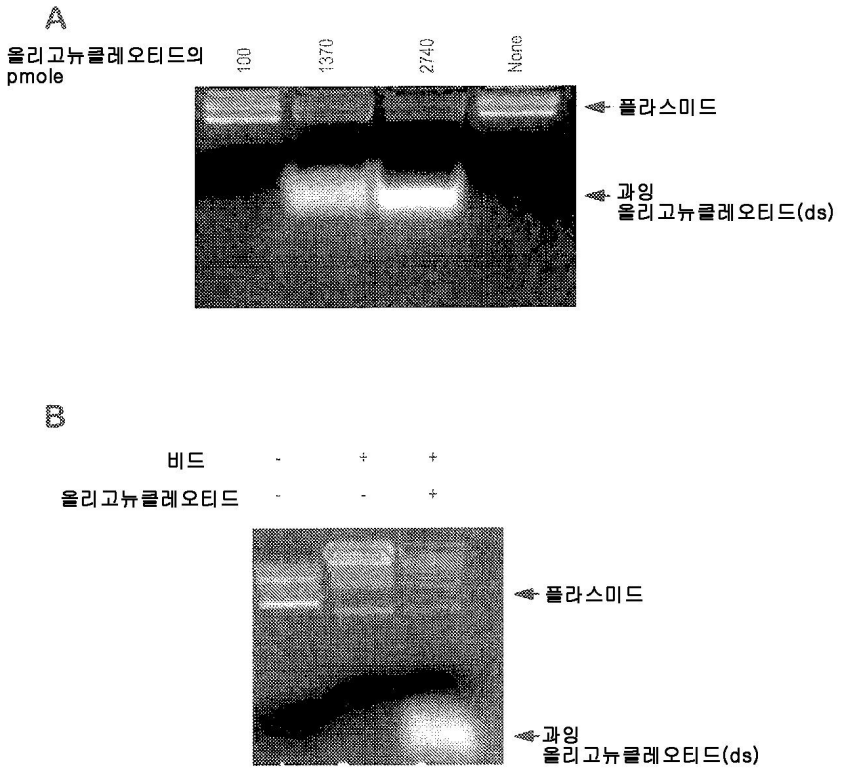


도면22

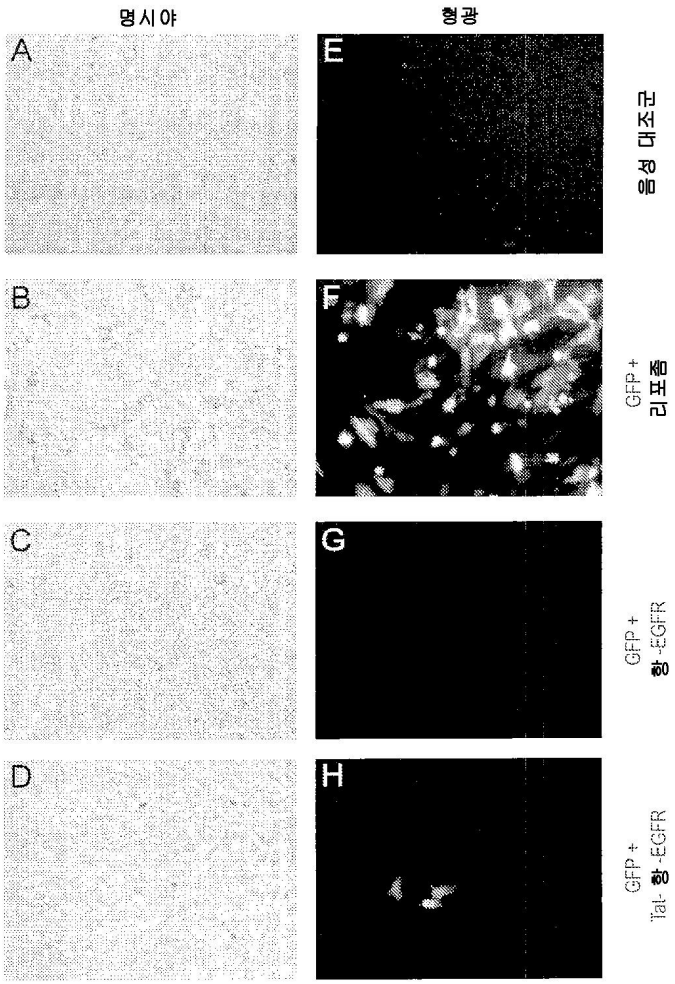
pH 5.5에서의 올리고뉴클레오티드의 헥사-히스티딘 태그에 대한 결합



도면23


A
올리고뉴클레오티드의 pmole
100
1370
2740
None
플라스미드
과잉 올리고뉴클레오티드(ds)
B
비드 - + +
올리고뉴클레오티드 - - +
플라스미드
과잉 올리고뉴클레오티드(ds)

도면24



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

BEDI, Atul

RAVI, Rajani

LI, Shulin

<120> POLYPEPTIDE-NUCLEIC ACID CONJUGATE FOR IMMUNOPROPHYLAXIS OR

IMMUNOTHERAPY FOR NEOPLASTIC OR INFECTIOUS DISORDERS

<130> JHU2180-4WO

<140> PCT/US2008/071858

<141> 2008-07-31

<150> US 61/022,173

<151> 2008-01-18

<150> US 61/007,895

<151> 2007-07-31

<160> 270

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

gggggagcat gctgggggg 20

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(12)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

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

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 4

Gly Gly Cys Asp Gly Arg Cys Gly

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 5

Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 6

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 7

Arg Gly Asp Trp Xaa Glu

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<

220><223> Synthetic construct

<400> 8

Thr Arg Gly Asp Thr Phe

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 9

Arg Gly Asp Leu Xaa Xaa Leu

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223

> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 10

Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Leu

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 11

Ser Arg Gly Asp Met

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 12

Val Val Ile Ser Tyr Ser Met Pro Asp

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 13

Ile Glu Leu Leu Gln Ala Arg

1 5

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 14

Cys Asn Gly Arg Cys Gly Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys

20

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 15

Cys Val Ser Asn Pro Arg Trp Lys Cys

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 16

Cys His Val Leu Trp Ser Thr Arg Cys

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 17

Cys Trp Asp Asp Gly Trp Leu Cys

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 18

Cys Pro Cys Phe Leu Leu Gly Cys Cys

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 19

Asp Phe Lys Leu Phe Ala Val Tyr

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 20

Glu Trp Val Asp Val

1 5

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is G or L

<400> 21

Xaa Xaa Xaa Trp

1

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

Cys Thr Thr His Trp Gly Phe Thr Leu Cys

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(16)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 23

Asn Xaa Xaa Glu Ile Glu Xaa Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Tyr

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 24

His Thr Met Tyr Tyr His His Tyr Gln His His Leu

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 25

Ala Thr Trp Leu Pro Pro Arg

1 5

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 26

Trp His Ser Asp Met Glu Trp Trp Tyr Leu Leu Gly

1 5 10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 27

Arg Arg Lys Arg Arg Arg

1 5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 28

Thr Ala Ala Ser Gly Val Arg Ser Met His

1 5 10

<210>

29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 29

Leu Thr Leu Arg Trp Val Gly Leu Met Ser

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 30

Leu Met Leu Pro Arg Ala Asp

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 31

Cys Lys Gly Gly Arg Ala Lys Asp Cys

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 32

Cys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Ala Cys

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 33

Val Gly Leu Pro Glu His Thr Gln

1 5

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 34

Val Pro Trp Met Glu Pro Ala Tyr Gln Arg Phe Leu

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

Leu Thr Val Xaa Pro Trp Xaa

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 36

Leu Thr Val Xaa Pro Trp Tyr

1 5

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 37

Leu Leu Gly Pro Tyr Glu Leu Trp Glu Leu Ser His

1 5 10

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic construct

<400> 38

Arg Pro Met Cys

1

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 39

Tyr Ser Gly Lys Trp Gly Trp

1 5

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 40

Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 41

Cys Gly Phe Glu Leu Glu Thr Cys

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is G or S

<400> 42

Asn Ser Val Arg Asp Leu Xaa

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is S or A

<400> 43

Asn Ser Val Ser Ser Xaa Xaa

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 44

Cys Gly Asn Lys Arg Thr Arg Gly Cys

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 45

Gly Val Leu Glu Gly Arg Xaa

1 5

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is G or V

<400> 46

Xaa Phe Gly Xaa

1

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 47

Cys Val Ser Ser Asn Pro Arg Trp Lys Cys

1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 48

Cys His Val Leu Trp Ser Thr Arg Cys

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 49

Ser Trp Cys Glu Pro Gly Trp Cys Arg

1 5

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 50

Ala Gly Gly Asp Pro Arg Ala Thr Pro Gly Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 51

Ser Met Ser Ile Ala Arg Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 52

Cys Gly Arg Arg Ala Gly Gly Ser Cys

1 5

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 53

Arg Asp Val Cys Ser Cys Phe Arg Asp Val Cys Cys

1 5 10

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 54

Thr Pro Lys Thr Ser Val Thr

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 55

Gly Leu Ser Gly Gly Arg Ser

1 5

<210> 56

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 56

uggauccggc uuugagaucu u 21

<210> 57

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 57

gggagacagg gguguccgcc auuuccaggu u 31

<210> 58

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 58

gggagacagg cuauaacuca cauaauguau u 31

<210> 59

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 59

uuuuuuuuuu uuuuuuuu 18

<210> 60

<211> 5

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 60

ugugu 5

<210> 61

<211> 3

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 61

ugu 3

<210> 62

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 62

cuacacaaau cagcgauuu 19

<210> 63

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 63

aaaucgcuga uuuguguag 19

<210> 64

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 64

uugauguguu uagucgcua 19

<210> 65

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 65

uagcgacuaa acacaucaa 19

<210> 66

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 66

gauuaugucc gguuaugua 19

<210> 67

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 67

uacauaaccg gacauaauc 19

<210> 68

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 68

auguauuggc cuguauuag 19

<210> 69

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 69

cuaauacagg ccaauacau 19

<210> 70

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 70

ggucggaauc gaagguuua 19

<210> 71

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 71

uaaaccuucg auuccgacc 19

<210> 72

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 72

ggucggagcu aaagguuua 19

<210> 73

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 73

uaaaccuuua gcuccgacc 19

<210> 74

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 74

cagcuuugug ugagcguau 19

<210> 75

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 75

auacgcucac acaaagcug 19

<210> 76

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 76

guccuucaa 9

<210> 77

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 77

guccuucaa 9

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 78

agcuuaaccu guccuucaat t 21

<210> 79

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 79

uugaaggaca gguuaagcut t 21

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 80

accuguccuu caauuaccat t 21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 81

ugguaauuga aggacaggut t 21

<210> 82

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 82

aaaaaaaacu guccuucaa 19

<210> 83

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 83

aaaaaaaaau guccuucaa 19

<210> 84

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 84

aaaaaaaaaa guccuucaa 19

<210> 85

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 85

uguccuucaa uguccuucaa 20

<210> 86

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 86

agcuuaaccu guccuucaa 19

<210> 87

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 87

agcuuaaccu guccuucaac uacacaaauu gaaggacagg uuaagcu 47

<210> 88

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 88

ggacugcguu cgcgcuuucc 20

<210> 89

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 89

ggcuuaucca uugcacuccg ga 22

<210> 90

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 90

acgaaggugg uuuucccag 19

<210> 91

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 91

uuugugguag ugggggacug 20

<210> 92

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 92

guaguguuug ugggggacug 20

<210> 93

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 93

guagugggg acuguuugug 20

<210> 94

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 94

ggacugcguu guggcuuucc 20

<210> 95

<211> 12

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 95

gauacuuacc ug 12

<210> 96

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 96

aauuugugg 9

<210> 97

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 97

aauuuuuga 9

<210> 98

<211> 11

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> x is any nucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 98

raunnnnnng r 11

<210> 99

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 99

gacuagcuug cuguuu 16

<210> 100

<211> 11

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 100

gacuagccuu u 11

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 101

ggtgcatcga tgcagggggg 20

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 102

tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 103

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 103

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 104

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 104

tcgncgn 7

<210> 105

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 105

tcgntcg 7

<210> 106

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 106

tcgacgt 7

<210> 107

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 107

tcgatcg 7

<210> 108

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 108

tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24

<210> 109

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 109

tcctcctttt gtccttttgt cctt 24

<210> 110

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 110

agcuuaaccu guccuucaa 19

<210> 111

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 111

ggggcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 112

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 112

ggggaugaac uucaggguca gcuu 24

<210> 113

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 113

ggggcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 114

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 114

ggggaugaac uucaggguca gcuu 24

<210> 115

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 115

ggugcaucga ugcagggggg 20

<210> 116

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 116

ggugcuucgu ugcagggggg 20

<210> 117

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 117

ggugcuucga ugcagggggg 20

<210> 118

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 118

ggugcuacgu ugcagggggg 20

<210> 119

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 119

tcatcatttt gtcattttgt catt 24

<210> 120

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 120

tcattatttt gttattttgt catt 24

<210> 121

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 121

tcatcctttt gtcctttgt catt 24

<210> 122

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 122

tcatcttttt gtcttttgt catt 24

<210> 123

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 123

tcatcaattt gtcaatttgt catt 24

<210> 124

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 124

tcatcatctt gtcatcttgt catt 24

<210> 125

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 125

tcatcatgtt gtcatgttgt catt 24

<210> 126

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 126

tcatcattct gtcattctgt catt 24

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 127

tcatcattgt gtcattgtgt catt 24

<210> 128

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 128

tcatcatttg gtcatttggt catt 24

<210> 129

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 129

tcatttttt gtttttttgt catt 24

<210> 130

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 130

tcattgtttt gttgttttgt catt 24

<210> 131

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 131

tcattctttt gttcttttgt catt 24

<210> 132

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 132

aagaggtggt ggaggaggtg gtggaggagg tggagg 36

<210> 133

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 133

ttgaattcct agtttcccag atacagt 27

<210> 134

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 134

tcggtaacgg g 11

<210> 135

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 135

ttagggttag ggttaggg 18

<210> 136

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 136

cgtta 5

<210> 137

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 137

gccactgc 8

<210> 138

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 138

gcagtggc 8

<210> 139

<211> 2295

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 139

atgaaaaaac gaaaagtgtt aataccatta atggcattgt ctacgatatt agtttcaagc 60

acaggtaatt tagaggtgat tcaggcagaa gttaaacagg agaaccggtt attaaatgaa 120

tcagaatcaa gttcccaggg gttactagga tactatttta gtgatttgaa ttttcaagca 180

cccatggtgg ttacctcttc tactacaggg gatttatcta ttcctagttc tgagttagaa 240

aatattccat cggaaaacca atattttcaa tctgctattt ggtcaggatt tatcaaagtt 300

aagaagagtg atgaatatac atttgctact tccgctgata atcatgtaac aatgtgggta 360

gatgaccaag aagtgattaa taaagcttct aattctaaca aaatcagatt agaaaaagga 420

agattatatc aaataaaaat tcaatatcaa cgagaaaatc ctactgaaaa aggattggat 480

ttcaagttgt actggaccga ttctcaaaat aaaaaagaag tgatttctag tgataactta 540

caattgccag aattaaaaca aaaatcttcg aactcaagaa aaaagcgaag tacaagtgct 600

ggacctacgg ttccagaccg tgacaatgat ggaatccctg attcattaga ggtagaagga 660

tatacggttg atgtcaaaaa taaaagaact tttctttcac catggatttc taatattcat 720

gaaaagaaag gattaaccaa atataaatca tctcctgaaa aatggagcac ggcttctgat 780

ccgtacagtg atttcgaaaa ggttacagga cggattgata agaatgtatc accagaggca 840

agacaccccc ttgtggcagc ttatccgatt gtacatgtag atatggagaa tattattctc 900

tcaaaaaatg aggatcaatc cacacagaat actgatagtc aaacgagaac aataagtaaa 960

aatacttcta caagtaggac acatactagt gaagtacatg gaaatgcaga agtgcatgcg 1020

tcgttctttg atattggtgg gagtgtatct gcaggattta gtaattcgaa ttcaagtacg 1080

gtcgcaattg atcattcact atctctagca ggggaaagaa cttgggctga aacaatgggt 1140

ttaaataccg ctgatacagc aagattaaat gccaatatta gatatgtaaa tactgggacg 1200

gctccaatct acaacgtgtt accaacgact tcgttagtgt taggaaaaaa tcaaacactc 1260

gcgacaatta aagctaagga aaaccaatta agtcaaatac ttgcacctaa taattattat 1320

ccttctaaaa acttggcgcc aatcgcatta aatgcacaag acgatttcag ttctactcca 1380

attacaatga attacaatca atttcttgag ttagaaaaaa cgaaacaatt aagattagat 1440

acggatcaag tatatgggaa tatagcaaca tacaattttg aaaatggaag agtgagggtg 1500

gatacaggct cgaactggag tgaagtgtta ccgcaaattc aagaaacaac tgcacgtatc 1560

atttttaatg gaaaagattt aaatctggta gaaaggcgga tagcggcggt taatcctagt 1620

gatccattag aaacgactaa accggatatg acattaaaag aagcccttaa aatagcattt 1680

ggatttaacg aaccgaatgg aaacttacaa tatcaaggga aagacataac cgaatttgat 1740

tttaatttcg atcaacaaac atctcaaaat atcaagaatc agttagcgga attaaacgca 1800

actaacatat atactgtatt agataaaatc aaattaaatg caaaaatgaa tattttaata 1860

agagataaac gttttcatta tgatagaaat aacatagcag ttggggcgga tgagtcagta 1920

gttaaggagg ctcatagaga agtaattaat tcgtcaacag agggattatt gttaaatatt 1980

gataaggata taagaaaaat attatcaggt tatattgtag aaattgaaga tactgaaggg 2040

cttaaagaag ttataaatga cagatatgat atgttgaata tttctagttt acggcaagat 2100

ggaaaaacat ttatagattt taaaaaatat aatgataaat taccgttata tataagtaat 2160

cccaattata aggtaaatgt atatgctgtt actaaagaaa acactattat taatcctagt 2220

gagaatgggg atactagtac caacgggatc aagaaaattt taatcttttc taaaaaaggc 2280

tatgagatag gataa 2295

<210> 140

<211> 764

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 140

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys
20 25 30

Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu
35 40 45

Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val
50 55 60

Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu
65 70 75 80

Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly
85 90 95

Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala
100 105 110
Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys
115 120 125
Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln
130 135 140
Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp
145 150 155 160

Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser
165 170 175
Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser
180 185 190
Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp
195 200 205
Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp
210 215 220

Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His
225 230 235 240
Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser
245 250 255
Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile
260 265 270
Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr
275 280 285

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

340 345 350

Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser
355 360 365
Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala
370 375 380
Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr
385 390 395 400
Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys
405 410 415

Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln
420 425 430
Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile
435 440 445
Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn
450 455 460
Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp
465 470 475 480

Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly
485 490 495
Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln
500 505 510
Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn
515 520 525
Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu
530 535 540

Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe
545 550 555 560
Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile
565 570 575
Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys
580 585 590

Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp
595 600 605

Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg
610 615 620
Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
625 630 635 640
Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
645 650 655
Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
660 665 670

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
675 680 685
Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
690 695 700
Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
705 710 715 720
Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
725 730 735

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
740 745 750
Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
755 760

<210> 141
<211> 564
<212> DNA
<213> Bacillus anthracis
<400> 141
atgttattaa tcggcacaga agtaaaaccg tttaaagcta atgcttacca taatggagaa 60
tttatccaag ttactgacga aagtttaaaa ggaaaatgga gtgtagtttg tttctaccca 120
gctgacttca cattcgtttg cccaactgaa cttgaagact tacaaaacca atatgcaact 180

cttaaagagt taggcgttga agtatactct gtatctacag acactcactt cactcacaaa 240

gcatggcatg atagctcaga aactatcggt aaaatcgagt acatcatgat tggtgaccca 300

actcgcacaa tcactacaaa cttcaacgtt ttaatggaag aagaaggtct tgctgctcgt 360

ggtacattca tcatcgatcc agacggtgtt atccaatcta tggaaatcaa tgctgacggt 420

atcggccgtg acgcaagcat tcttgttaac aaaattaaag cagctcaata cgtacgtaac 480

aacccaggtg aagtttgccc agctaaatgg caagagggtt ctgctacact taaaccaagc 540

cttgaccttg taggcaaaat ctaa 564

<210> 142

<211> 187

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 142

Met Leu Leu Ile Gly Thr Glu Val Lys Pro Phe Lys Ala Asn Ala Tyr
1 5 10 15

His Asn Gly Glu Phe Ile Gln Val Thr Asp Glu Ser Leu Lys Gly Lys
20 25 30

Trp Ser Val Val Cys Phe Tyr Pro Ala Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro
35 40 45

Thr Glu Leu Glu Asp Leu Gln Asn Gln Tyr Ala Thr Leu Lys Glu Leu

50 55 60

Gly Val Glu Val Tyr Ser Val Ser Thr Asp Thr His Phe Thr His Lys
65 70 75 80

Ala Trp His Asp Ser Ser Glu Thr Ile Gly Lys Ile Glu Tyr Ile Met
85 90 95

Ile Gly Asp Pro Thr Arg Thr Ile Thr Thr Asn Phe Asn Val Leu Met
100 105 110

Glu Glu Glu Gly Leu Ala Ala Arg Gly Thr Phe Ile Ile Asp Pro Asp

115 120 125

Gly Val Ile Gln Ser Met Glu Ile Asn Ala Asp Gly Ile Gly Arg Asp
130 135 140

Ala Ser Ile Leu Val Asn Lys Ile Lys Ala Ala Gln Tyr Val Arg Asn
145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Lys Pro Ser Leu Asp Leu Val Gly Lys Ile

180 185

<210> 143

<211> 1170

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 143

atggaagaag caccatttta tcgtgacact tgggtggaag tggatttaga tgccatttat 60

aacaacgtta cacatattaa agaatttatc ccgagtgatg tagaaatttt tgccgttgtt 120

aaagggaatg catatgggca cgattatgta ccggtggcta aaatagcatt agaagcgggg 180

gcgacaaggt tagcagttgc gttcttagat gaagctttag tgcttcgaag agctggtatt 240

actgcgccaa ttttggtgtt aggtccttct cctcctcgtg atataaatgt agctgctgaa 300

aatgatgtag cattaactgt ttttcaaaag gaatgggtag atgaagcaat caaactttgg 360

gatggttcgt ctacgatgaa ataccatatt aatttcgata gtggtatggg gagaattgga 420

atacgtgaac gtaaagaatt aaaaggattt ttaaaaagct tagaaggtgc accattctta 480

gagttggaag gagtttatac gcattttgca acagcagatg aggtggagac ttcttacttt 540

gataagcaat ataacacatt tttggagcag ttaagttggt tgaaagaatt cggagtggat 600

cctaagtttg ttcatacagc taatagtgct gcaacgctac gttttcaagg gattacattt 660

aatgcagtac gaattggcat tgcgatgtat gggttatctc catctgtaga aatacgccct 720

tttttaccgt ttaaattaga accagcgcta tcattgcata cgaaagttgc tcatattaaa 780

caggtgatta aaggggatgg aattagttat aacgtcactt atcgaacgaa aactgaagaa 840

tggattgcga ccgttgcaat tggttatgca gatggctggc ttagaagatt acaaggattt 900

gaagtacttg taaatggtaa aagggtaccg attgtagggc gagtaacgat ggatcaattc 960

atgattcacc ttccttgtga agtgcctctt ggtacgaaag ttacactcat tggaaggcaa 1020

ggagatgaat atattagcgc tacagaggtt gcggaatatt cagggactat taattatgaa 1080

attattacga cgatcagttt tcgtgtgccg agaatattta tacggaatgg aaaagttgtg 1140

gaagtaatta attatttgaa cgatatatag 1170

<210> 144

<211> 389

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 144

Met Glu Glu Ala Pro Phe Tyr Arg Asp Thr Trp Val Glu Val Asp Leu
1 5 10 15

Asp Ala Ile Tyr Asn Asn Val Thr His Ile Lys Glu Phe Ile Pro Ser
20 25 30

Asp Val Glu Ile Phe Ala Val Val Lys Gly Asn Ala Tyr Gly His Asp
35 40 45

Tyr Val Pro Val Ala Lys Ile Ala Leu Glu Ala Gly Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Ala Val Ala Phe Leu Asp Glu Ala Leu Val Leu Arg Arg Ala Gly Ile
65 70 75 80

Thr Ala Pro Ile Leu Val Leu Gly Pro Ser Pro Pro Arg Asp Ile Asn
85 90 95

Val Ala Ala Glu Asn Asp Val Ala Leu Thr Val Phe Gln Lys Glu Trp
100 105 110

Val Asp Glu Ala Ile Lys Leu Trp Asp Gly Ser Ser Thr Met Lys Tyr

115 120 125

His Ile Asn Phe Asp Ser Gly Met Gly Arg Ile Gly Ile Arg Glu Arg
130 135 140

Lys Glu Leu Lys Gly Phe Leu Lys Ser Leu Glu Gly Ala Pro Phe Leu
145 150 155 160

Glu Leu Glu Gly Val Tyr Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Glu Val Glu
165 170 175

Thr Ser Tyr Phe Asp Lys Gln Tyr Asn Thr Phe Leu Glu Gln Leu Ser

180 185 190

Trp Leu Lys Glu Phe Gly Val Asp Pro Lys Phe Val His Thr Ala Asn
195 200 205

Ser Ala Ala Thr Leu Arg Phe Gln Gly Ile Thr Phe Asn Ala Val Arg
210 215 220

Ile Gly Ile Ala Met Tyr Gly Leu Ser Pro Ser Val Glu Ile Arg Pro
225 230 235 240

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

245 250 255

Ala His Ile Lys Gln Val Ile Lys Gly Asp Gly Ile Ser Tyr Asn Val

260 265 270

Thr Tyr Arg Thr Lys Thr Glu Glu Trp Ile Ala Thr Val Ala Ile Gly

275 280 285

Tyr Ala Asp Gly Trp Leu Arg Arg Leu Gln Gly Phe Glu Val Leu Val

290 295 300

Asn Gly Lys Arg Val Pro Ile Val Gly Arg Val Thr Met Asp Gln Phe

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Glu Ile Ile Thr Thr Ile Ser Phe Arg

355 360 365

Val Pro Arg Ile Phe Ile Arg Asn Gly Lys Val Val Glu Val Ile Asn

370 375 380

Tyr Leu Asn Asp Ile

385

<210> 145

<211> 360

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 145

atgactaaag aacaaatcat tgaagcagtt aaatctatga ctgtattaga acttaacgac 60

ttagtaaaag ctatcgagga agaattcggc gtaactgctg ctgctcctgt agctgttgct 120

ggtggcgctg gagaagctgc tgctgagaaa actgaatttg atgtggaact aactagcgct 180

ggtgcacaaa aaatcaaagt tatcaaagtt gttcgtgaaa tcactggtct tggcttaaaa 240

gaagctaaag aattagttga caacactcca aaagtaatca aagaagctgc tgctaaagaa 300

gaagctgaag aaatcaaagc taaacttgaa gaagttggcg ctgctgtaga agttaagtaa 360

<210> 146

<211> 119

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 146

Met Thr Lys Glu Gln Ile Ile Glu Ala Val Lys Ser Met Thr Val Leu
1 5 10 15

Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly Val Thr
20 25 30

Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Gly Gly Ala Gly Glu Ala Ala Ala
35 40 45

Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Glu Leu Thr Ser Ala Gly Ala Gln Lys
50 55 60

Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu Gly Leu Lys
65 70 75 80

Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Asn Thr Pro Lys Val Ile Lys Glu Ala
85 90 95

Ala Ala Lys Glu Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu Glu Glu Val
100 105 110

Gly Ala Ala Val Glu Val Lys
115

<210> 147

<211> 1707

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 147

atgaagaaaa agatgaagaa gttcacggca gttgtagcgc ctgttttagc gatgagtgtg 60

gcgttgacag cttgttctgg atctggtggg gagaagaaat caactacgac gtctagtggt 120

ggtggggaag agaaaaagtc tgaaattaaa tacgcagcga aacaagtgtt aaatcgtaca 180

gagaatcaag agattccgac gatggatgtt tcaaaatcta ccgatacatt aggttctcaa 240

attttaggga acacgatgga aggtttatat cgattagata aagataataa gccaatccca 300

gctgcagcag aatctagtac gaaaagcgag gatggcaaaa aatatacatt taaattacgt 360

aaagatgcaa aatggtcaaa tggtgatcct gtaacagcga aagatttcgt atatgcatgg 420

cagcgcttac ttgataaaaa tacagcggca gaatatgcat ttattgctta ctatattaaa 480

aacgcagagg caattaataa aggtgaaaaa ccactaacag atttaggagc aaaagcggta 540

gatgattata cgctagaagt agaattagag aaaccagtac catatttctt gaatttaatg 600

gcattcccat cttactatcc tttaaatgaa aagttcgtaa aagaaaaagg agataaattc 660

ggtttagaag cagatacaac gttgtataac ggaccgttcg ttatggcttc atggaaacat 720

gaacaaggat ggcagctaaa gaaaaatgat aagtactggg ataataagac tgtaaaatta 780

gaagaaatta actatagtgt agtaaaagaa gttgcgacga aagtaaactt atatgataca 840

ggatcaattg atttcacgtt attatcagga gaattcgttg ataaatataa atcgaacaaa 900

gaagagtacg gcgagtattc ggaagcaagt acattcttct tacgtttaaa tcaaaagcgt 960

aacggacaag atacaccgtt aaagagcaaa aaacttcgtg aagcgatcgc attatcaatt 1020

gataaaaaag gattagcaac cgttatttta aataacggtt caaaagcaac agatcaatta 1080

gtaccaaaag ggcttgcgac aggaccagac ggtaaagact accaagatac gtttaaaaat 1140

ggtctaaaat atgatccgaa aaaaggtgca gcagcttggg aagaagcgaa aaaagaactt 1200

ggaaaagatc aagtgacaat tgaattacta agctatgatg atggaactgc gaaaaaaatt 1260

gctgactact ttaaagatca aattgagaaa aacttaaaag gtgtaacggt taacacgaaa 1320

attcaaccgt tcaaacaaaa actaaaatta gagtcagcac aagattatga agtttcgttt 1380

gcaggttgga gtccagatta ttcggatcca atgacattta ttgatatgtt tgaatcgaag 1440

agcccatata accaaatgag ttattcgaat ccaaaatatg atgaaatggt agcgaaagca 1500

ggtaatgaat tactgtctga tccgaagaag cgttgggaaa cgttaggaaa agcagagaaa 1560

ttattccttg aagaagatgc aggattagtt cctttatatc aaacaggaag agcgtatgta 1620

atgaaaccga atgtaaaagg aattgtgaaa cataacatta gtccagaata tagctttaag 1680

tgggcttatg taacggaagg taaataa 1707

<210> 148

<211> 568

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 148

Met Lys Lys Lys Met Lys Lys Phe Thr Ala Val Val Ala Pro Val Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Ser Thr Thr Thr Ser Ser Gly Gly Gly Glu Glu Lys Lys Ser Glu
35 40 45
Ile Lys Tyr Ala Ala Lys Gln Val Leu Asn Arg Thr Glu Asn Gln Glu
50 55 60
Ile Pro Thr Met Asp Val Ser Lys Ser Thr Asp Thr Leu Gly Ser Gln
65 70 75 80
Ile Leu Gly Asn Thr Met Glu Gly Leu Tyr Arg Leu Asp Lys Asp Asn
85 90 95

Lys Pro Ile Pro Ala Ala Ala Glu Ser Ser Thr Lys Ser Glu Asp Gly
100 105 110
Lys Lys Tyr Thr Phe Lys Leu Arg Lys Asp Ala Lys Trp Ser Asn Gly
115 120 125
Asp Pro Val Thr Ala Lys Asp Phe Val Tyr Ala Trp Gln Arg Leu Leu
130 135 140
Asp Lys Asn Thr Ala Ala Glu Tyr Ala Phe Ile Ala Tyr Tyr Ile Lys
145 150 155 160

Asn Ala Glu Ala Ile Asn Lys Gly Glu Lys Pro Leu Thr Asp Leu Gly
165 170 175
Ala Lys Ala Val Asp Asp Tyr Thr Leu Glu Val Glu Leu Glu Lys Pro
180 185 190
Val Pro Tyr Phe Leu Asn Leu Met Ala Phe Pro Ser Tyr Tyr Pro Leu
195 200 205
Asn Glu Lys Phe Val Lys Glu Lys Gly Asp Lys Phe Gly Leu Glu Ala
210 215 220

Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Gly Pro Phe Val Met Ala Ser Trp Lys His
225 230 235 240
Glu Gln Gly Trp Gln Leu Lys Lys Asn Asp Lys Tyr Trp Asp Asn Lys
245 250 255
Thr Val Lys Leu Glu Glu Ile Asn Tyr Ser Val Val Lys Glu Val Ala
260 265 270

Thr Lys Val Asn Leu Tyr Asp Thr Gly Ser Ile Asp Phe Thr Leu Leu
275 280 285

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

Gly Ser Lys Ala Thr Asp Gln Leu Val Pro Lys Gly Leu Ala Thr Gly
355 360 365
Pro Asp Gly Lys Asp Tyr Gln Asp Thr Phe Lys Asn Gly Leu Lys Tyr
370 375 380
Asp Pro Lys Lys Gly Ala Ala Ala Trp Glu Glu Ala Lys Lys Glu Leu
385 390 395 400
Gly Lys Asp Gln Val Thr Ile Glu Leu Leu Ser Tyr Asp Asp Gly Thr
405 410 415

Ala Lys Lys Ile Ala Asp Tyr Phe Lys Asp Gln Ile Glu Lys Asn Leu
420 425 430
Lys Gly Val Thr Val Asn Thr Lys Ile Gln Pro Phe Lys Gln Lys Leu
435 440 445
Lys Leu Glu Ser Ala Gln Asp Tyr Glu Val Ser Phe Ala Gly Trp Ser
450 455 460
Pro Asp Tyr Ser Asp Pro Met Thr Phe Ile Asp Met Phe Glu Ser Lys
465 470 475 480

Ser Pro Tyr Asn Gln Met Ser Tyr Ser Asn Pro Lys Tyr Asp Glu Met
485 490 495
Val Ala Lys Ala Gly Asn Glu Leu Leu Ser Asp Pro Lys Lys Arg Trp
500 505 510
Glu Thr Leu Gly Lys Ala Glu Lys Leu Phe Leu Glu Glu Asp Ala Gly

515 520 525

Leu Val Pro Leu Tyr Gln Thr Gly Arg Ala Tyr Val Met Lys Pro Asn

530 535 540

Val Lys Gly Ile Val Lys His Asn Ile Ser Pro Glu Tyr Ser Phe Lys

545 550 555 560

Trp Ala Tyr Val Thr Glu Gly Lys

565

<210> 149

<211> 1485

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 149

atgagtcaac tagctgtaaa tcttcatgaa aaggtagaaa agtttcttca aggtacgaaa 60

aagttatatg tgaatggatc attcattgaa agcgcttccg gtaagacgtt taatacacct 120

aatccagcaa ctggcgaaac acttgccgtc gtttctgaag ccggtcgcga agatattcat 180

aaagctgtag ttgcagctcg catggctttt gacgaaggtc cttggtctcg catgagcact 240

gcggagcgaa gccgtcttat gtacaagtta gctgatttaa tggaagaaca taaagaagag 300

cttgcacagc tcgagacgtt agataacgga aagccaatcc gtgaaacaat ggcagcagac 360

ataccacttg caattgagca catgcgctat tatgctggct gggcgacgaa aatcgttggt 420

caaacaatcc ctgtttccgg tgatttcttt aactatacac gccatgaagc tgttggtgtc 480

gttggtcaaa ttatcccttg gaacttcccg cttcttatgg ccatgtggaa aatgggagca 540

gcgcttgcta caggatgtac aatcgtttta aaacctgcag aacaaactcc actatctgct 600

ctatacttag ctgaattaat tgaagaagct ggattcccga aaggcgttat taatatcgtt 660

cctggattcg gtgaatcagc tggacaagct ctcgttaatc atccactcgt tgataaaatt 720

gcatttaccg gttctactcc agtcggtaaa caaattatgc gacaagcatc tgaatccttg 780

aaacgtgtta ctttagagct tggtggtaaa tcaccgaaca ttattttacc agacgctgat 840

ttatctcgcg caattcctgg tgcactttct ggtgttatgt ttaaccaagg gcaagtatgc 900

tctgctggat cacgcctatt tgttccgaag aaaatgtatg ataatgtcat ggctgatctc 960

gtcctctatt ctaaaaaact aaatcaaggt gtcggtcttg accctgaaac gacaattggt 1020

cctctcgttt ccgaagaaca acaaaaacgt gtaatgggct acattgaaaa agggattgaa 1080

gaaggcgctg aagtactttg cggaggaaat aatccattcg atcaaggcta cttcatttct 1140

cctacagtat tcgctgacgt aaatgacgaa atgacaatcg caaaagaaga aattttcggt 1200

ccagttattt ctgcaatacc ttttaacgat attgatgaag taattgaacg agcaaataaa 1260

tcacaattcg gcttagcggc tggtgtgtgg acagaaaatg ttaaaacagc acactatgtt 1320

gcaagtaaag tacgtgcagg tacagtatgg gttaactgtt acaacgtctt tgatgcagca 1380

tctccatttg gaggatttaa acaatctggt ctcggccgtg aaatgggatc ttacgcatta 1440

aataactata cagaagtgaa gagcgtttgg cttaacttaa attaa 1485

<210> 150

<211> 494

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 150

Met Ser Gln Leu Ala Val Asn Leu His Glu Lys Val Glu Lys Phe Leu

1 5 10 15

Gln Gly Thr Lys Lys Leu Tyr Val Asn Gly Ser Phe Ile Glu Ser Ala

20 25 30

Ser Gly Lys Thr Phe Asn Thr Pro Asn Pro Ala Thr Gly Glu Thr Leu

35 40 45

Ala Val Val Ser Glu Ala Gly Arg Glu Asp Ile His Lys Ala Val Val

50 55 60

Ala Ala Arg Met Ala Phe Asp Glu Gly Pro Trp Ser Arg Met Ser Thr

65 70 75 80

Ala Glu Arg Ser Arg Leu Met Tyr Lys Leu Ala Asp Leu Met Glu Glu

85 90 95

His Lys Glu Glu Leu Ala Gln Leu Glu Thr Leu Asp Asn Gly Lys Pro

100 105 110

Ile Arg Glu Thr Met Ala Ala Asp Ile Pro Leu Ala Ile Glu His Met

115 120 125

Arg Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Thr Lys Ile Val Gly Gln Thr Ile Pro

130 135 140

Val Ser Gly Asp Phe Phe Asn Tyr Thr Arg His Glu Ala Val Gly Val

145 150 155 160

Val Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Leu Met Ala Met Trp

165 170 175

Lys Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr Gly Cys Thr Ile Val Leu Lys Pro

180 185 190

Ala Glu Gln Thr Pro Leu Ser Ala Leu Tyr Leu Ala Glu Leu Ile Glu

195 200 205

Glu Ala Gly Phe Pro Lys Gly Val Ile Asn Ile Val Pro Gly Phe Gly

210 215 220

Glu Ser Ala Gly Gln Ala Leu Val Asn His Pro Leu Val Asp Lys Ile

225 230 235 240

Ala Phe Thr Gly Ser Thr Pro Val Gly Lys Gln Ile Met Arg Gln Ala

245 250 255

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

260 265 270

Asn Ile Ile Leu Pro Asp Ala Asp Leu Ser Arg Ala Ile Pro Gly Ala

275 280 285

Leu Ser Gly Val Met Phe Asn Gln Gly Gln Val Cys Ser Ala Gly Ser

290 295 300

Arg Leu Phe Val Pro Lys Lys Met Tyr Asp Asn Val Met Ala Asp Leu

305 310 315 320

Val Leu Tyr Ser Lys Lys Leu Asn Gln Gly Val Gly Leu Asp Pro Glu

325 330 335

Thr Thr Ile Gly Pro Leu Val Ser Glu Glu Gln Gln Lys Arg Val Met

340 345 350

Gly Tyr Ile Glu Lys Gly Ile Glu Glu Gly Ala Glu Val Leu Cys Gly

355 360 365

Gly Asn Asn Pro Phe Asp Gln Gly Tyr Phe Ile Ser Pro Thr Val Phe

370 375 380

Ala Asp Val Asn Asp Glu Met Thr Ile Ala Lys Glu Glu Ile Phe Gly

385 390 395 400

Pro Val Ile Ser Ala Ile Pro Phe Asn Asp Ile Asp Glu Val Ile Glu

405 410 415

Arg Ala Asn Lys Ser Gln Phe Gly Leu Ala Ala Gly Val Trp Thr Glu

420 425 430

Asn Val Lys Thr Ala His Tyr Val Ala Ser Lys Val Arg Ala Gly Thr

435 440 445

Val Trp Val Asn Cys Tyr Asn Val Phe Asp Ala Ala Ser Pro Phe Gly

450 455 460

Gly Phe Lys Gln Ser Gly Leu Gly Arg Glu Met Gly Ser Tyr Ala Leu

465 470 475 480

Asn Asn Tyr Thr Glu Val Lys Ser Val Trp Leu Asn Leu Asn

485 490

<210> 151

<211> 1410

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 151

atgaataaag ggcgcgttac gcaaatcatg ggtccggttg tagacgttaa gtttgatggc 60

ggaaagctac cagaaatcta caacgccctt acggtaaaac agagcaacga aaacggaaca 120

agcattaact taacatttga agttgcactt catttaggtg atgacacagt tcgtacagtt 180

gcaatgtctt ccacagatgg acttgttcgt ggcacagaag tagaagatac tggtaaagca 240

atctctgtac cagttggtga tgcaacactt ggtcgtgtat ttaacgtatt aggtgatgca 300

attgacttag atggtgaggt tcctgcggat gtacgtcgtg atccaattca ccgtcaagca 360

cctgcattcg aagaattatc tactaaagta gaaattcttg aaactggtat taaagtagta 420

gacttacttg ctccttacat taagggtggt aagatcggtc tattcggtgg tgccggtgta 480

ggtaaaacgg tattaattca ggaattaatc aataacatcg cacaagaaca cggtggtatc 540

tctgtattcg ctggtgtagg tgagcgtact cgtgagggta atgacttata ccacgaaatg 600

agcgattctg gcgtaattaa gaaaactgcg atggtattcg gacaaatgaa cgagccacct 660

ggagcacgtc aacgtgttgc gttaacaggt ttaacaatgg ctgagcattt ccgtgatgag 720

caaggacaag atgtacttct gttcatcgat aatatcttcc gtttcacgca agcaggttct 780

gaagtatctg cccttcttgg ccgtatgcca tctgcggtag gttaccaacc aacacttgca 840

acagaaatgg gtcaattaca agagcgtatt acatctacaa ataaagggtc tatcacgtct 900

atccaagcgg tatatgtacc agccgatgac tatactgacc cagcaccagc tacaacgttc 960

gctcacttag atgcaacaac aaacttagag cgtcgtttaa cacaaatggg tatttaccca 1020

gccgtagatc cattagcatc tacatctcgt gcactttctc cagaaatcgt aggagaagag 1080

cattatgaag tggctcgtca agtacagcaa actttacaac gctacaaaga gcttcaagat 1140

atcatcgcta tcttaggtat ggatgagtta tctgaagaag ataagttagt tgtacatcgt 1200

gctcgtcgta ttcaattctt cttatctcaa aacttccacg tagcggagca gtttacaggt 1260

caaaaaggtt cttatgtacc tgtaaaagaa acagttcgtg gtttcaaaga aattctagaa 1320

ggaaaatatg atgaccttcc agaagatgca ttccgcttag ttggtggcat tgaagaagtt 1380

attgaaaacg cgaagaaaat gatggcgtaa 1410

<210> 152

<211> 469

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 152

Met Asn Lys Gly Arg Val Thr Gln Ile Met Gly Pro Val Val Asp Val
1 5 10 15

Lys Phe Asp Gly Gly Lys Leu Pro Glu Ile Tyr Asn Ala Leu Thr Val
20 25 30

Lys Gln Ser Asn Glu Asn Gly Thr Ser Ile Asn Leu Thr Phe Glu Val
35 40 45

Ala Leu His Leu Gly Asp Asp Thr Val Arg Thr Val Ala Met Ser Ser
50 55 60

Thr Asp Gly Leu Val Arg Gly Thr Glu Val Glu Asp Thr Gly Lys Ala
65 70 75 80

Ile Ser Val Pro Val Gly Asp Ala Thr Leu Gly Arg Val Phe Asn Val
85 90 95

Leu Gly Asp Ala Ile Asp Leu Asp Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Arg
100 105 110

Arg Asp Pro Ile His Arg Gln Ala Pro Ala Phe Glu Glu Leu Ser Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Leu Glu Thr Gly Ile Lys Val Val Asp Leu Leu Ala
130 135 140

Pro Tyr Ile Lys Gly Gly Lys Ile Gly Leu Phe Gly Gly Ala Gly Val

145 150 155 160

Gly Lys Thr Val Leu Ile Gln Glu Leu Ile Asn Asn Ile Ala Gln Glu
165 170 175
His Gly Gly Ile Ser Val Phe Ala Gly Val Gly Glu Arg Thr Arg Glu
180 185 190
Gly Asn Asp Leu Tyr His Glu Met Ser Asp Ser Gly Val Ile Lys Lys
195 200 205
Thr Ala Met Val Phe Gly Gln Met Asn Glu Pro Pro Gly Ala Arg Gln
210 215 220

Arg Val Ala Leu Thr Gly Leu Thr Met Ala Glu His Phe Arg Asp Glu
225 230 235 240
Gln Gly Gln Asp Val Leu Leu Phe Ile Asp Asn Ile Phe Arg Phe Thr
245 250 255
Gln Ala Gly Ser Glu Val Ser Ala Leu Leu Gly Arg Met Pro Ser Ala
260 265 270
Val Gly Tyr Gln Pro Thr Leu Ala Thr Glu Met Gly Gln Leu Gln Glu
275 280 285

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

Ser Pro Glu Ile Val Gly Glu Glu His Tyr Glu Val Ala Arg Gln Val
355 360 365
Gln Gln Thr Leu Gln Arg Tyr Lys Glu Leu Gln Asp Ile Ile Ala Ile
370 375 380
Leu Gly Met Asp Glu Leu Ser Glu Glu Asp Lys Leu Val Val His Arg
385 390 395 400

Ala Arg Arg Ile Gln Phe Phe Leu Ser Gln Asn Phe His Val Ala Glu
405 410 415

Gln Phe Thr Gly Gln Lys Gly Ser Tyr Val Pro Val Lys Glu Thr Val
420 425 430
Arg Gly Phe Lys Glu Ile Leu Glu Gly Lys Tyr Asp Asp Leu Pro Glu
435 440 445
Asp Ala Phe Arg Leu Val Gly Gly Ile Glu Glu Val Ile Glu Asn Ala
450 455 460
Lys Lys Met Met Ala
465

<210> 153
<211> 582
<212> DNA
<213> Bacillus anthracis
<400
> 153

atgaatttaa ttcctacagt aattgaacaa acaaatcgtg gagaacgcgc ttacgatatt 60
tactctcgac tattaaaaga ccgtatcatt atgcttggta gtgcaattga tgacaacgta 120
gctaactcaa tcgtttccca gcttttattc ttggaatctc aagatcctga aaaagatatt 180
catatctaca tcaacagccc tggtggttct atcacagcag gtatggcaat ttacgataca 240
atgcagttta ttaaaccgca agtatcaaca atctgtatcg gtatggctgc atctatgggt 300
gcattcttac ttgcagcagg tgaaaaagga aaacgttatg cacttccaaa cagtgaagca 360
atgattcacc aaccacttgg tggggcacaa ggtcaagcga ctgaaatcga aatcgctgct 420

aaacgtatcc tattcttacg tgaaaaacta aaccaaattc ttgctgaccg cacaggtcaa 480
ccacttgaag tactacaacg cgacacagac cgcgacaact tcatgacagc agaaaaagct 540
ttagaatacg gtttaatcga taagatcttt acaaatcgtt aa 582

<210> 154
<211> 193
<212> PRT
<213> Bacillus anthracis
<400> 154

Met Asn Leu Ile Pro Thr Val Ile Glu Gln Thr Asn Arg Gly Glu Arg
1 5 10 15

Ala Tyr Asp Ile Tyr Ser Arg Leu Leu Lys Asp Arg Ile Ile Met Leu
20 25 30

Gly Ser Ala Ile Asp Asp Asn Val Ala Asn Ser Ile Val Ser Gln Leu
35 40 45
Leu Phe Leu Glu Ser Gln Asp Pro Glu Lys Asp Ile His Ile Tyr Ile
50 55 60
Asn Ser Pro Gly Gly Ser Ile Thr Ala Gly Met Ala Ile Tyr Asp Thr
65 70 75 80
Met Gln Phe Ile Lys Pro Gln Val Ser Thr Ile Cys Ile Gly Met Ala
85 90 95

Ala Ser Met Gly Ala Phe Leu Leu Ala Ala Gly Glu Lys Gly Lys Arg
100 105 110
Tyr Ala Leu Pro Asn Ser Glu Ala Met Ile His Gln Pro Leu Gly Gly
115 120 125
Ala Gln Gly Gln Ala Thr Glu Ile Glu Ile Ala Ala Lys Arg Ile Leu
130 135 140
Phe Leu Arg Glu Lys Leu Asn Gln Ile Leu Ala Asp Arg Thr Gly Gln
145 150 155 160

Pro Leu Glu Val Leu Gln Arg Asp Thr Asp Arg Asp Asn Phe Met Thr
165 170 175
Ala Glu Lys Ala Leu Glu Tyr Gly Leu Ile Asp Lys Ile Phe Thr Asn
180 185 190
Arg

<210> 155
<211> 570
<212> DNA
<213> Bacillus anthracis
<400> 155
atgtggattt atgaaaaaaa attacaatac cctgttaaag taggaacttg taatccagca 60
cttgcaaaat tattaattga gcaatacggt ggtgcagatg gagaattagc tgctgcacta 120

cgttacttaa atcagcgtta tacaatcccg gataaagtca ttggcctcct taccgatatt 180

ggtacagaag aatttgcgca tcttgaaatg attgctacga tggtttataa gctgacaaaa 240
gatgcgactc ctgaacagat gaaggcagct ggtctcgacc ctcattacgt cgatcatgac 300
agcgcacttc attaccataa cgcagctggt gttccattta ctgcaaccta tatacaagct 360
aaaggtgatc caattgccga cctatacgaa gatattgcgg ctgaagaaaa agcgcgtgcc 420
acatatcaat ggcttatcaa ccaatctgac gatcccgaca taaatgacag tttacgcttt 480
ttacgcgaac gagaaattgt ccattcacaa cgtttccgag aagcggttga aattttaaaa 540
gaagaacgcg atagaaaaat atatttttaa 570

<210> 156
<211> 189
<212> PRT
<213> Bacillus anthracis
<400> 156

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

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

115 120 125
Tyr Glu Asp Ile Ala Ala Glu Glu Lys Ala Arg Ala Thr Tyr Gln Trp
130 135 140

Leu Ile Asn Gln Ser Asp Asp Pro Asp Ile Asn Asp Ser Leu Arg Phe
145 150 155 160

Leu Arg Glu Arg Glu Ile Val His Ser Gln Arg Phe Arg Glu Ala Val
165 170 175

Glu Ile Leu Lys Glu Glu Arg Asp Arg Lys Ile Tyr Phe
180 185

<210> 157

<211> 1077

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 157

atggcaaatc atgaattaga tcaattacgt aaacaggtag atgaaattaa cttacaacta 60

ttacaccttt taaacaaacg cggtgaaatc gttcaaaaaa ttggggaaca aaagcaagta 120

caaggtacaa aacgttttga tccagtacgt gagcgtgaag tgcttgatat gattgcagag 180

aataacgaag gaccattcga aacatcaaca gttcaacata ttttcaaaac aatcttcaaa 240

gctagcttag aattacaaga agatgataac cgtaaagcat tactagtatc acgtaaaaag 300

aaacaagaaa acacaatcgt tgatgtaaaa ggtgaattga ttggtaacgg cacacaaacg 360

ttcatcatgg gaccttgcgc ggtagaaagc ttagagcaag ttcgccaagt agggcaagcg 420

atgaaagacc aaggcttaaa attaatgcgc ggtggtgctt tcaaaccgag aacatctcca 480

tacgatttcc aaggtttagg agtagaaggg ctacaaattt tacgtcaagt agcagatgag 540

ttcgacttag cgatcattag tgagatttta aatccaaacg atgttgaaat ggcattagac 600

tacgttgatg taattcaagt tggtgcacgt aacatgcaaa acttcgattt actacgagct 660

gtaggtaaag ttaacaagcc agtattatta aaacgtggat tagcagcaac aattgatgag 720

ttcattaatg cagcggaata catcattgca caaggtaatg accaaattat tctatgtgag 780

cgcggtattc gcacatacga aagagcaaca cgtaacacat tagacatttc agcagtaccg 840

atcttaaaga aagaaacaca tttaccagtt gttgttgacg taacgcattc aactggacgt 900

agagatttat tattaccaac agcgaaagcg gctcttgcaa ttggtgcaga tgcagtaatg 960

gctgaagtac atccagaccc agcagttgca ttatcagatt ctgcacaaca aatggatatt 1020

ccggaattcc atagattcat ggaagagtta aaaggtttca aaaataaatt atcttaa 1077

<210> 158

<211> 358

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 158

Met Ala Asn His Glu Leu Asp Gln Leu Arg Lys Gln Val Asp Glu Ile

1 5 10 15

Asn Leu Gln Leu Leu His Leu Leu Asn Lys Arg Gly Glu Ile Val Gln

20 25 30

Lys Ile Gly Glu Gln Lys Gln Val Gln Gly Thr Lys Arg Phe Asp Pro

35 40 45

Val Arg Glu Arg Glu Val Leu Asp Met Ile Ala Glu Asn Asn Glu Gly

50 55 60

Pro Phe Glu Thr Ser Thr Val Gln His Ile Phe Lys Thr Ile Phe Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Ile Gly Asn Gly Thr Gln Thr Phe Ile Met Gly Pro Cys Ala Val

115 120 125

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

130 135 140

Gly Leu Lys Leu Met Arg Gly Gly Ala Phe Lys Pro Arg Thr Ser Pro

145 150 155 160

Tyr Asp Phe Gln Gly Leu Gly Val Glu Gly Leu Gln Ile Leu Arg Gln

165 170 175

Val Ala Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Ile Ser Glu Ile Leu Asn Pro

180 185 190

Asn Asp Val Glu Met Ala Leu Asp Tyr Val Asp Val Ile Gln Val Gly

195 200 205

Ala Arg Asn Met Gln Asn Phe Asp Leu Leu Arg Ala Val Gly Lys Val

210 215 220

Asn Lys Pro Val Leu Leu Lys Arg Gly Leu Ala Ala Thr Ile Asp Glu

225 230 235 240

Phe Ile Asn Ala Ala Glu Tyr Ile Ile Ala Gln Gly Asn Asp Gln Ile

245 250 255

Ile Leu Cys Glu Arg Gly Ile Arg Thr Tyr Glu Arg Ala Thr Arg Asn

260 265 270

Thr Leu Asp Ile Ser Ala Val Pro Ile Leu Lys Lys Glu Thr His Leu

275 280 285

Pro Val Val Val Asp Val Thr His Ser Thr Gly Arg Arg Asp Leu Leu

290 295 300

Leu Pro Thr Ala Lys Ala Ala Leu Ala Ile Gly Ala Asp Ala Val Met

305 310 315 320

Ala Glu Val His Pro Asp Pro Ala Val Ala Leu Ser Asp Ser Ala Gln

325 330 335

Gln Met Asp Ile Pro Glu Phe His Arg Phe Met Glu Glu Leu Lys Gly

340 345 350

Phe Lys Asn Lys Leu Ser

355

<210> 159

<211> 504

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 159

atgttctctt ctgattgcga atttactaaa attgattgcg aggcaaaacc agctagtaca 60

ctacctgcct tcggttttgc tttcaacgcg tctgcacctc agttcgcttc attatttaca 120

ccactactat tacctagcgt aagtccaaac ccaaatatta ctgttcctgt aataaatgat 180

acagtaagtg tcggagatgg cattcgaatt ctacgagctg gtatttatca aatcagttat 240

acattaacaa ttagtcttga taactcacct gttgcaccag aagctggtcg tttcttctta 300

tcattaggta caccagctaa cattattcct ggatcaggta cagcggttcg ttctaacgtt 360

attggtactg gtgaagtaga cgtatccagc ggtgttattc ttattaactt aaaccctggt 420

gacttaatca gaatcgtacc agttgaattg attggaactg tagacatccg tgcagcagca 480

ttaacagttg cacaaattag ctag 504

<210> 160

<211> 167

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 160

Met Phe Ser Ser Asp Cys Glu Phe Thr Lys Ile Asp Cys Glu Ala Lys
1 5 10 15

Pro Ala Ser Thr Leu Pro Ala Phe Gly Phe Ala Phe Asn Ala Ser Ala
20 25 30

Pro Gln Phe Ala Ser Leu Phe Thr Pro Leu Leu Leu Pro Ser Val Ser
35 40 45

Pro Asn Pro Asn Ile Thr Val Pro Val Ile Asn Asp Thr Val Ser Val
50 55 60

Gly Asp Gly Ile Arg Ile Leu Arg Ala Gly Ile Tyr Gln Ile Ser Tyr
65 70 75 80

Thr Leu Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Pro Val Ala Pro Glu Ala Gly
85 90 95

Arg Phe Phe Leu Ser Leu Gly Thr Pro Ala Asn Ile Ile Pro Gly Ser
100 105 110

Gly Thr Ala Val Arg Ser Asn Val Ile Gly Thr Gly Glu Val Asp Val
115 120 125

Ser Ser Gly Val Ile Leu Ile Asn Leu Asn Pro Gly Asp Leu Ile Arg
130 135 140

Ile Val Pro Val Glu Leu Ile Gly Thr Val Asp Ile Arg Ala Ala Ala
145 150 155 160

Leu Thr Val Ala Gln Ile Ser
165

<210> 161

<211> 504

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 161

atgcgatcat ctagtcgtaa gctcacaaac tttaattgta gagcacaagc ccccagtaca 60

ctaccagctc tcggttttgc ttttaatgct acttcacctc aatttgcaac actatttaca 120

ccactactac tacctagtac aggcccaaat ccaaacatta ctgtccctgt aatcaatgat 180

acaattagta caggaactgg tattagaatt caagtagctg gtatttatca aatcagttat 240

acattaacaa tcagcctcga taatgttcca gtaaccccgg aagcagcgcg ctttttctta 300

acactaaact catcaactaa tattattgca ggatctggaa ccgcagtccg ttctaatatc 360

attggcactg gtgaagtaga tgtatccagc ggtgtcattc taataaactt aaaccctggt 420

gatttaattc aaattgtacc cgttgaagta attggtacag tagatattcg ttctgccgct 480

ttaacagttg cacaaattcg ttaa 504

<210> 162

<211> 167

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 162

Met Arg Ser Ser Ser Arg Lys Leu Thr Asn Phe Asn Cys Arg Ala Gln
1 5 10 15

Ala Pro Ser Thr Leu Pro Ala Leu Gly Phe Ala Phe Asn Ala Thr Ser
20 25 30

Pro Gln Phe Ala Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Leu Pro Ser Thr Gly
35 40 45

Pro Asn Pro Asn Ile Thr Val Pro Val Ile Asn Asp Thr Ile Ser Thr

50 55 60

Gly Thr Gly Ile Arg Ile Gln Val Ala Gly Ile Tyr Gln Ile Ser Tyr
65 70 75 80

Thr Leu Thr Ile Ser Leu Asp Asn Val Pro Val Thr Pro Glu Ala Ala
85 90 95

Arg Phe Phe Leu Thr Leu Asn Ser Ser Thr Asn Ile Ile Ala Gly Ser
100 105 110

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

115 120 125

Ser Ser Gly Val Ile Leu Ile Asn Leu Asn Pro Gly Asp Leu Ile Gln
130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Thr Val Ala Gln Ile Arg

165

<210> 163

<211> 966

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 163

gtggaaagaa gtttatctat ggagttagta cgtgtaacag aggctgcagc tttatcatca 60

gcgcgttgga tgggacgcgg gaaaaaggat gaggcagacg gtgcagcaac atcagctatg 120

cgtgatgtat ttgatacaat tccgatgaaa ggtacagttg taattggtga aggtgaaatg 180

gatgaagcac caatgctata tatcggagaa aaattaggta caggatatgg tccacgtgta 240

gacgttgcag ttgatccttt agaagggaca aacattgtag cagctggtgg atggaatgct 300

cttgctgtta ttgcaattgc agatcacggt aatttgttac atgctcctga catgtacatg 360

gataaaatcg cggttggccc agaagcggtt ggggcggtcg atattgatgc gcctattatc 420

gataacttac gtgcagttgc gaaagcgaaa aacaaggata ttgaagatgt tgtagcgaca 480

gttttaaacc gtccacgtca tcaagcgatt attgaagaaa ttcgtaaagc tggtgctcgt 540

attaaattga ttaatgatgg agacgtagca ggtgcaatta atactgcatt tgatcgtaca 600

ggtgtagata ttttattcgg atctggtggt gcgcctgagg gtgtattagc agcagttgca 660

ttaaaatgtt taggtggcga aattcacgga aagctattac cacaaaacga agctgaattg 720

gcgcgttgca aaaagatggg catagaagac atcaaccgca tccttcgcat ggaggactta 780

gtaaaaggtg acgatgcaat ctttgcagca acaggtgtaa cagacggaga actattacgc 840

ggcgttcaat ttaaaggtag cgtaggaaca acacaatctc ttgttatgcg tgcaaaatca 900

ggcacagtac gcttcgtaga cggacgtcat agcttaaata aaaaaccgaa cttggttatt 960

aaataa 966

<210> 164

<211> 321

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 164

Val Glu Arg Ser Leu Ser Met Glu Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Leu Ser Ser Ala Arg Trp Met Gly Arg Gly Lys Lys Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Gly Ala Ala Thr Ser Ala Met Arg Asp Val Phe Asp Thr Ile Pro

35 40 45

Met Lys Gly Thr Val Val Ile Gly Glu Gly Glu Met Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Met Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Leu Gly Thr Gly Tyr Gly Pro Arg Val

65 70 75 80

Asp Val Ala Val Asp Pro Leu Glu Gly Thr Asn Ile Val Ala Ala Gly

85 90 95

Gly Trp Asn Ala Leu Ala Val Ile Ala Ile Ala Asp His Gly Asn Leu

100 105 110

Leu His Ala Pro Asp Met Tyr Met Asp Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu

115 120 125

Ala Val Gly Ala Val Asp Ile Asp Ala Pro Ile Ile Asp Asn Leu Arg

130 135 140

Ala Val Ala Lys Ala Lys Asn Lys Asp Ile Glu Asp Val Val Ala Thr

145 150 155 160

Val Leu Asn Arg Pro Arg His Gln Ala Ile Ile Glu Glu Ile Arg Lys

165 170 175

Ala Gly Ala Arg Ile Lys Leu Ile Asn Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala

180 185 190

Ile Asn Thr Ala Phe Asp Arg Thr Gly Val Asp Ile Leu Phe Gly Ser

195 200 205

Gly Gly Ala Pro Glu Gly Val Leu Ala Ala Val Ala Leu Lys Cys Leu

210 215 220

Gly Gly Glu Ile His Gly Lys Leu Leu Pro Gln Asn Glu Ala Glu Leu

225 230 235 240

Ala Arg Cys Lys Lys Met Gly Ile Glu Asp Ile Asn Arg Ile Leu Arg

245 250 255

Met Glu Asp Leu Val Lys Gly Asp Asp Ala Ile Phe Ala Ala Thr Gly

260 265 270

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

275 280 285

Gly Thr Thr Gln Ser Leu Val Met Arg Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg

290 295 300

Phe Val Asp Gly Arg His Ser Leu Asn Lys Lys Pro Asn Leu Val Ile

305 310 315 320

Lys

<210> 165

<211> 786

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 165

atgtttagct taaaagggac tgttatgaaa accgcacttc ttgcatccgt cgcaatgttg 60

ttcacaagct cggctatggc tgccgacatc atcgttgctg aaccggcacc cgttgcagtc 120

gacacgttct cttggactgg cggctatatt ggtatcaatg ctggttacgc tggcggcaag 180

ttcaagcatc cgttctcagg catcgagcag gatggggccc aagatttttc aggttcgctc 240

gacgtcacgg ccagcggctt tgttggcggc gttcaggccg gttataactg gcagcttgcc 300

aacggcctcg tgcttggtgg cgaagctgac ttccagggct cgacggttaa gagcaagctt 360

gttgacaacg gtgacctctc cgatatcggc gttgcaggca acctcagcgg cgacgaaagc 420

ttcgtcctcg agaccaaggt tcagtggttt ggaacggtgc gtgcgcgcct cggcttcacc 480

ccgactgaac gcctgatggt ctatggtacc ggtggtttgg cctatggtaa ggtcaagacg 540

tcgcttagcg cctatgacga tggtgaatcg ttcagcgccg gaaactctaa gaccaaggct 600

ggctggacgc ttggtgcagg tgtagaatac gccgtcacca acaattggac cctgaagtcg 660

gaatacctct acaccgacct cggcaagcgt tccttcaatt acattgatga agaaaacgtc 720

aatattaaca tggaaaacaa ggtgaacttc cacaccgtcc gcctcggtct gaactacaag 780

ttctaa 786

<210> 166

<211> 261

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 166

Met Phe Ser Leu Lys Gly Thr Val Met Lys Thr Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Val Ala Met Leu Phe Thr Ser Ser Ala Met Ala Ala Asp Ile Ile Val
20 25 30

Ala Glu Pro Ala Pro Val Ala Val Asp Thr Phe Ser Trp Thr Gly Gly
35 40 45

Tyr Ile Gly Ile Asn Ala Gly Tyr Ala Gly Gly Lys Phe Lys His Pro
50 55 60

Phe Ser Gly Ile Glu Gln Asp Gly Ala Gln Asp Phe Ser Gly Ser Leu
65 70 75 80

Asp Val Thr Ala Ser Gly Phe Val Gly Gly Val Gln Ala Gly Tyr Asn
85 90 95

Trp Gln Leu Ala Asn Gly Leu Val Leu Gly Gly Glu Ala Asp Phe Gln
100 105 110

Gly Ser Thr Val Lys Ser Lys Leu Val Asp Asn Gly Asp Leu Ser Asp
115 120 125

Ile Gly Val Ala Gly Asn Leu Ser Gly Asp Glu Ser Phe Val Leu Glu
130 135 140

Thr Lys Val Gln Trp Phe Gly Thr Val Arg Ala Arg Leu Gly Phe Thr
145 150 155 160

Pro Thr Glu Arg Leu Met Val Tyr Gly Thr Gly Gly Leu Ala Tyr Gly
165 170 175

Lys Val Lys Thr Ser Leu Ser Ala Tyr Asp Asp Gly Glu Ser Phe Ser
180 185 190

Ala Gly Asn Ser Lys Thr Lys Ala Gly Trp Thr Leu Gly Ala Gly Val
195 200 205

Glu Tyr Ala Val Thr Asn Asn Trp Thr Leu Lys Ser Glu Tyr Leu Tyr
210 215 220

Thr Asp Leu Gly Lys Arg Ser Phe Asn Tyr Ile Asp Glu Glu Asn Val

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Asn Tyr Lys Phe

260

<210> 167

<211> 1371

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400

> 167

gtcgttcttg gtttaccagt tgatccaaaa gcaaagccat catttaaaga tgcacaaaac 60

cattgggcag ctccgtacat tgctgcagtg gaaaaagcag gtgtaattaa tggggatggt 120

actggtaaat tcaatccatc aagccaaatt aaccgtgcat ctatggcatc tatgttagta 180

caagcatact cattagataa gaaaattatt ggagaacttc caacacagtt taaagatttg 240

gaacctcatt ggggtaagaa acaagctaat attttagtag ctttagagat ttctaaaggt 300

acgggaaatg gctggaatcc tgaaggaact gtaactcgtg cagaagcagc tcagtttatt 360

gcgatggctg atcaaaataa aacaagtaca tcaaaaagaa tgtatatgaa cagaaacgtt 420

attacatatc atcaaccatc attatcctct ggtattactg atgttcaaca taagccacaa 480

atggttgaag tgacagagca aagagcagac ggctggttga aaattgtaac aagtaaaggt 540

gagaagtgga cacctctaac agaaaaaaca gaaacgatta atgaagaatt tactacttat 600

gaaacagctt cacatagttc taaagtgcta ggtacatata atgcacaaac agtaacggtt 660

atggaagaga gtggtagctg gattcgtatc cgcgtaggcg ctggtttcca gtgggttgat 720

aaaaatcaat taaatccagt aaaacaagag aacttttag aaggtaaagc aattattatt 780

gatccaggtc atggtggaat tgactcaggt aatgttggtt attacgagaa agaaagtgaa 840

actgtattag atgtatcatt acgattaaag aaaatatttg agcaaaaagc accatttact 900

gttatgttca ctcgtacaga taatacacgt ccaggagtaa actcaacaga ttcattgaaa 960

aaacgagtag agtttgctca ggaacataat ggagatatct ttgtaagtat ccatgctaat 1020

ggttctgcag agaaaaatgg acaaggtaca gaaacattat attatcagtc agcaagagca 1080

aaagtaacga atccgcatgt agaagacagt aagttattag cacaaaaaat tcaagaccgt 1140

cttgtagcag cacttggaac aaaagatcgt ggtgtgaaac atcaggactt atacgttact 1200

agagaaaata caatgccagc tgtattaaca gaattagcat ttgtagataa taaaagtgat 1260

gcagataaaa ttgctacacc aaaacagaga caagctgcag cagaagcgat ttatcaaggt 1320

attttagatt attacgaagc aaagggtaat aacgtatctt ctttccgtta a 1371

<210> 168

<211> 456

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 168

Val Val Leu Gly Leu Pro Val Asp Pro Lys Ala Lys Pro Ser Phe Lys
1 5 10 15

Asp Ala Gln Asn His Trp Ala Ala Pro Tyr Ile Ala Ala Val Glu Lys
20 25 30

Ala Gly Val Ile Asn Gly Asp Gly Thr Gly Lys Phe Asn Pro Ser Ser
35 40 45

Gln Ile Asn Arg Ala Ser Met Ala Ser Met Leu Val Gln Ala Tyr Ser
50 55 60

Leu Asp Lys Lys Ile Ile Gly Glu Leu Pro Thr Gln Phe Lys Asp Leu
65 70 75 80

Glu Pro His Trp Gly Lys Lys Gln Ala Asn Ile Leu Val Ala Leu Glu
85 90 95

Ile Ser Lys Gly Thr Gly Asn Gly Trp Asn Pro Glu Gly Thr Val Thr
100 105 110

Arg Ala Glu Ala Ala Gln Phe Ile Ala Met Ala Asp Gln Asn Lys Thr
115 120 125

Ser Thr Ser Lys Arg Met Tyr Met Asn Arg Asn Val Ile Thr Tyr His
130 135 140

Gln Pro Ser Leu Ser Ser Gly Ile Thr Asp Val Gln His Lys Pro Gln
145 150 155 160

Met Val Glu Val Thr Glu Gln Arg Ala Asp Gly Trp Leu Lys Ile Val
165 170 175

Thr Ser Lys Gly Glu Lys Trp Thr Pro Leu Thr Glu Lys Thr Glu Thr
180 185 190

Ile Asn Glu Glu Phe Thr Thr Tyr Glu Thr Ala Ser His Ser Ser Lys

195 200 205

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

210 215 220

Gly Ser Trp Ile Arg Ile Arg Val Gly Ala Gly Phe Gln Trp Val Asp

225 230 235 240

Lys Asn Gln Leu Asn Pro Val Lys Gln Glu Asn Phe Leu Glu Gly Lys

245 250 255

Ala Ile Ile Ile Asp Pro Gly His Gly Gly Ile Asp Ser Gly Asn Val

260 265 270

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

275 280 285

Leu Lys Lys Ile Phe Glu Gln Lys Ala Pro Phe Thr Val Met Phe Thr

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Arg Val Glu Phe Ala Gln Glu His Asn Gly Asp Ile Phe Val Ser

325 330 335

Ile His Ala Asn Gly Ser Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Thr Glu Thr

340 345 350

Leu Tyr Tyr Gln Ser Ala Arg Ala Lys Val Thr Asn Pro His Val Glu

355 360 365

Asp Ser Lys Leu Leu Ala Gln Lys Ile Gln Asp Arg Leu Val Ala Ala

370 375 380

Leu Gly Thr Lys Asp Arg Gly Val Lys His Gln Asp Leu Tyr Val Thr

385 390 395 400

Arg Glu Asn Thr Met Pro Ala Val Leu Thr Glu Leu Ala Phe Val Asp

405 410 415

Asn Lys Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ala Thr Pro Lys Gln Arg Gln Ala

420 425 430

Ala Ala Glu Ala Ile Tyr Gln Gly Ile Leu Asp Tyr Tyr Glu Ala Lys

435 440 445

Gly Asn Asn Val Ser Ser Phe Arg

450 455

<210> 169

<211> 660

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 169

atgaagaaga acatgttacg tataatggca acggtaacta ttatgggcgg cttgtttgta 60

agtacgaatg ttccaaacgt aaaagcagaa gaatatccag aaatgattgt atttgatgat 120

gttccagtaa accactgggc atatgacgat ataatggacg tagtatacaa taaagtaatg 180

ttaggctatg gaaatggtaa gtttggtgta ggagataatg taacacgaga acaagtagct 240

gcagtactct atcgtacatt gaatttgaaa aaagaaggac ctttaaaaaa tccatacaaa 300

gatatttcag agagggctac attcttttta gatgaaattt tagtattaac aaagcatggt 360

atttttgaag gcgatgaaaa aggaaatttt agaccagccg caccagtaac acgtgcagaa 420

acggcgcaaa ttcttacgaa ggcatttaca tttgaagtga agaagaacca tacatttaaa 480

gatgtaccaa ataatcattg ggcaaaaaat gcgattagtg cactgcagtc taatcatgtc 540

atagtaggaa cagggaatgg gaaatttgaa ccgaataaag ttgtaacacg tgagcaatat 600

gcaacgtttt taaataaagc tgtttttttat tttccagtaa aagatgagaa ttatgaatga 660

<210> 170

<211> 219

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 170

Met Lys Lys Asn Met Leu Arg Ile Met Ala Thr Val Thr Ile Met Gly

1 5 10 15

Gly Leu Phe Val Ser Thr Asn Val Pro Asn Val Lys Ala Glu Glu Tyr

20 25 30

Pro Glu Met Ile Val Phe Asp Asp Val Pro Val Asn His Trp Ala Tyr

35 40 45

Asp Asp Ile Met Asp Val Val Tyr Asn Lys Val Met Leu Gly Tyr Gly

50 55 60

Asn Gly Lys Phe Gly Val Gly Asp Asn Val Thr Arg Glu Gln Val Ala

65 70 75 80

Ala Val Leu Tyr Arg Thr Leu Asn Leu Lys Lys Glu Gly Pro Leu Lys

85 90 95

Asn Pro Tyr Lys Asp Ile Ser Glu Arg Ala Thr Phe Phe Leu Asp Glu

100 105 110

Ile Leu Val Leu Thr Lys His Gly Ile Phe Glu Gly Asp Glu Lys Gly

115 120 125

Asn Phe Arg Pro Ala Ala Pro Val Thr Arg Ala Glu Thr Ala Gln Ile

130 135 140

Leu Thr Lys Ala Phe Thr Phe Glu Val Lys Lys Asn His Thr Phe Lys

145 150 155 160

Asp Val Pro Asn Asn His Trp Ala Lys Asn Ala Ile Ser Ala Leu Gln

165 170 175

Ser Asn His Val Ile Val Gly Thr Gly Asn Gly Lys Phe Glu Pro Asn

180 185 190

Lys Val Val Thr Arg Glu Gln Tyr Ala Thr Phe Leu Asn Lys Ala Val

195 200 205

Phe Tyr Phe Pro Val Lys Asp Glu Asn Tyr Glu

210 215

<210> 171

<211> 1437

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 171

atgattaaaa caaatgaaat taaacaaaaa gatgcaatat tagaagagat tacggattat 60

gtattaaata aagaggtaac aagtgcagaa gcattcagta ctgctcgtta cgtattattt 120

gatacacttg gatgcggaat tttagcatta caatatccag agtgtacgaa attattagga 180

ccagttgtac caggaacaat cgtgccaaat ggaacacgag tgccaggtac gtcttatgta 240

ttagatccag tgaaaggtgc atttaatatc ggatgtatga tccgttggtt agactataac 300

gatacttggc ttgcagcaga atggggacat ccatctgata accttggcgg cattttagca 360

gttgcagatt atattagccg tgttcgtata tcagaaggaa aagaaccgtt aaaagtacgt 420

gaagtattag aaatgatgat taaagcacat gaaattcaag gtgtattagc tttagaaaac 480

agcttaaacc gggttggtct tgaccacgta ttatacgtaa aagtagcaac aactgctgta 540
gttgcgaaaa tgcttggcgg aacacgtgaa gaaatcttta atgcattatc acatgcatgg 600
attgataatt ctagtcttcg tacatatcgt cacgctccaa atactggatc acgtaaatca 660
tgggcagcag gtgatgcaac aagtcgcggt gttcaccttg caatgactgc tttaaaaggt 720
gaaatgggtt atccaacagc attatctgca ccgggttggg gattccaaga tgtattattt 780
aataaacaag aattaaagtt agctagacca ttagagtctt atgtaatgga aaatgtatta 840
tttaaagttt catatccagc agaattccat gcacaaacag ctgcagaatg tgctgtaaaa 900

ttacatccgg aaattaaaga aagattagat gaaattgacc gtattacaat tacaactcat 960
gaatcagcaa ttcgtattat tgataaagaa ggtccattaa ataacccagc tgatcgtgat 1020
cattgtttac aatatattac ggcaattggt ttattaaagg gagatatcgt tgcggatgat 1080
tatgaggatg cagtagcaaa tgatccacgt gtagatgaat tacgtaataa gatggttgtt 1140
gttgaaaaca aacagtacag tttagattac cttgacccga acaagcgctc aatcgccaac 1200
gctgttcaag ttcatttcaa ggatggaact gtaacagaaa acgtggaatg tgaatatcca 1260
cttggtcacc gtttccgtag agacgaagca attccaaaag ttgttcaaaa attcactgca 1320

agtatggcag gtcattattc tagtaaacag caagaacaaa ttcatgaagt ttgtttaaat 1380
gaagagaaac tagaaaatat gaatgtaaac gaatttgtag atctattctt aatttaa 1437

<210> 172
<211> 478
<212> PRT
<213> Bacillus anthracis
<400> 172

Met Ile Lys Thr Asn Glu Ile Lys Gln Lys Asp Ala Ile Leu Glu Glu
1 5 10 15
Ile Thr Asp Tyr Val Leu Asn Lys Glu Val Thr Ser Ala Glu Ala Phe
20 25 30
Ser Thr Ala Arg Tyr Val Leu Phe Asp Thr Leu Gly Cys Gly Ile Leu
35 40 45
Ala Leu Gln Tyr Pro Glu Cys Thr Lys Leu Leu Gly Pro Val Val Pro
50 55 60
Gly Thr Ile Val Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Gly Thr Ser Tyr Val

65 70 75 80

Leu Asp Pro Val Lys Gly Ala Phe Asn Ile Gly Cys Met Ile Arg Trp

85 90 95

Leu Asp Tyr Asn Asp Thr Trp Leu Ala Ala Glu Trp Gly His Pro Ser

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ile Ser Glu Gly Lys Glu Pro Leu Lys Val Arg Glu Val Leu Glu

130 135 140

Met Met Ile Lys Ala His Glu Ile Gln Gly Val Leu Ala Leu Glu Asn

145 150 155 160

Ser Leu Asn Arg Val Gly Leu Asp His Val Leu Tyr Val Lys Val Ala

165 170 175

Thr Thr Ala Val Val Ala Lys Met Leu Gly Gly Thr Arg Glu Glu Ile

180 185 190

Phe Asn Ala Leu Ser His Ala Trp Ile Asp Asn Ser Ser Leu Arg Thr

195 200 205

Tyr Arg His Ala Pro Asn Thr Gly Ser Arg Lys Ser Trp Ala Ala Gly

210 215 220

Asp Ala Thr Ser Arg Gly Val His Leu Ala Met Thr Ala Leu Lys Gly

225 230 235 240

Glu Met Gly Tyr Pro Thr Ala Leu Ser Ala Pro Gly Trp Gly Phe Gln

245 250 255

Asp Val Leu Phe Asn Lys Gln Glu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Leu Glu

260 265 270

Ser Tyr Val Met Glu Asn Val Leu Phe Lys Val Ser Tyr Pro Ala Glu

275 280 285

Phe His Ala Gln Thr Ala Ala Glu Cys Ala Val Lys Leu His Pro Glu

290 295 300

Ile Lys Glu Arg Leu Asp Glu Ile Asp Arg Ile Thr Ile Thr Thr His

305 310 315 320

Glu Ser Ala Ile Arg Ile Ile Asp Lys Glu Gly Pro Leu Asn Asn Pro
325 330 335
Ala Asp Arg Asp His Cys Leu Gln Tyr Ile Thr Ala Ile Gly Leu Leu
340 345 350
Lys Gly Asp Ile Val Ala Asp Asp Tyr Glu Asp Ala Val Ala Asn Asp

355 360 365
Pro Arg Val Asp Glu Leu Arg Asn Lys Met Val Val Val Glu Asn Lys
370 375 380
Gln Tyr Ser Leu Asp Tyr Leu Asp Pro Asn Lys Arg Ser Ile Ala Asn
385 390 395 400
Ala Val Gln Val His Phe Lys Asp Gly Thr Val Thr Glu Asn Val Glu
405 410 415
Cys Glu Tyr Pro Leu Gly His Arg Phe Arg Arg Asp Glu Ala Ile Pro

420 425 430
Lys Val Val Gln Lys Phe Thr Ala Ser Met Ala Gly His Tyr Ser Ser
435 440 445
Lys Gln Gln Glu Gln Ile His Glu Val Cys Leu Asn Glu Glu Lys Leu
450 455 460
Glu Asn Met Asn Val Asn Glu Phe Val Asp Leu Phe Leu Ile
465 470 475

<210> 173
<211> 1278
<212> DNA
<213> Bacillus anthracis

<400> 173
atggctgcaa aatgggaaaa attagaaggt aacgtaggcg ttttaacaat cgaagttgat 60
gctaaagaag taaacaactc tatcgacgct gcgttcaaaa aagtagtaaa aacaatcaac 120
gtaccaggtt tccgtaaagg aaaaatgcct cgtccgttat tcgaacaacg ctttggtatc 180
gaatctttat accaagatgc tttagatatc atcttaccaa aagcatacgg tgaagcgatc 240
gatgaagctg gtatcttccc agttgctcat cctgaaatcg acatcgagaa gttcgaaaaa 300
aatgctaacc ttatcttcac tgcaaaagtt acagtgaaac ctgaagttaa attaggtgag 360

tacaaaggtt tagcagtaga aaaagttgaa acaactgtaa ctgacgaaga tgtagagaac 420

gaattaaaat ctttacaaga gcgtcaagct gaactagttg ttaaagaaga aggaactgtt 480

gaaaacggtg atacagctgt aatcgacttc gaaggtttcg ttgatggcga agcatttgaa 540

ggcggaaaag gcgaaaacta ctctctagca atcggttctg gtacattcat cccaggtttc 600

gaagagcaag taattggtct taaatctggt gagtctaaag acgttgaagt atcattccca 660

gaagagtacc atgctgctga attagctggc aaaccagcaa cattcaaagt aacagttcac 720

gaaatcaaaa caaaagaact tcctgagtta aacgacgagt tcgctaaaga agctgacgaa 780

gcggttgcaa ctcttgatga attaaaagca aaacttcgca caaacttaga agaaggcaaa 840

aagcacgaag ctgagcacaa agtacgtgat gaagtagtag aattagctgc tgctaacgct 900

gaaatcgaca ttccagaagc tatgatcgac actgagttag atcgtatggt tcgtgaattc 960

gagcaacgtt taagccaaca aggtatgaac cttgagcttt actaccaatt cacaggtact 1020

gatgctgaca agttaaaaga gcaaatgaaa gaagacgctc aaaaacgcgt aagaatcaac 1080

cttgttcttg aagctatcat tgaagctgaa aacatcgaag ttactgaaga agaagtaact 1140

gcagaagttg aaaaaatggc tgaaatgtac ggtatgccag tagacgctat caagcaagct 1200

cttggaagcg tagacgcttt agctgaagat cttaaagttc gtaaagctgt agacttctta 1260

gtagaaaacg ctgcataa 1278

<210> 174

<211> 425

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 174

Met Ala Ala Lys Trp Glu Lys Leu Glu Gly Asn Val Gly Val Leu Thr
1 5 10 15

Ile Glu Val Asp Ala Lys Glu Val Asn Asn Ser Ile Asp Ala Ala Phe
20 25 30

Lys Lys Val Val Lys Thr Ile Asn Val Pro Gly Phe Arg Lys Gly Lys
35 40 45

Met Pro Arg Pro Leu Phe Glu Gln Arg Phe Gly Ile Glu Ser Leu Tyr
50 55 60

Gln Asp Ala Leu Asp Ile Ile Leu Pro Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Ile
65 70 75 80

Asp Glu Ala Gly Ile Phe Pro Val Ala His Pro Glu Ile Asp Ile Glu
85 90 95
Lys Phe Glu Lys Asn Ala Asn Leu Ile Phe Thr Ala Lys Val Thr Val
100 105 110

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

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

Glu Ile Lys Thr Lys Glu Leu Pro Glu Leu Asn Asp Glu Phe Ala Lys
245 250 255
Glu Ala Asp Glu Ala Val Ala Thr Leu Asp Glu Leu Lys Ala Lys Leu
260 265 270
Arg Thr Asn Leu Glu Glu Gly Lys Lys His Glu Ala Glu His Lys Val
275 280 285
Arg Asp Glu Val Val Glu Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Ile Asp Ile
290 295 300

Pro Glu Ala Met Ile Asp Thr Glu Leu Asp Arg Met Val Arg Glu Phe
305 310 315 320
Glu Gln Arg Leu Ser Gln Gln Gly Met Asn Leu Glu Leu Tyr Tyr Gln

325 330 335

Phe Thr Gly Thr Asp Ala Asp Lys Leu Lys Glu Gln Met Lys Glu Asp

340 345 350

Ala Gln Lys Arg Val Arg Ile Asn Leu Val Leu Glu Ala Ile Ile Glu

355 360 365

Ala Glu Asn Ile Glu Val Thr Glu Glu Glu Val Thr Ala Glu Val Glu

370 375 380

Lys Met Ala Glu Met Tyr Gly Met Pro Val Asp Ala Ile Lys Gln Ala

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Asp Phe Leu Val Glu Asn Ala Ala

420 425

<210> 175

<211> 714

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 175

atgaaaattg catttacaaa gatggtaggt atattaacta ttagttcaat gttagtgtta 60

gtaggctgtc agacttcagg ttcatctaaa aagcaagagc aaacatctga aagtcataca 120

cacgaaaatg aacacgatca cagtcatgat catagtcatg ctcatgatga atcaacagaa 180

aaaatttatg aagggtattt cgaagacaac caagtgaagg atcgatcact ctccgattgg 240

aaaggagact ggcaatcggt atatccatat ttacaagatg gaacgcttga tgaggtattt 300

gcttacaaag cgaaacataa aggtaaaatg tcagccaaag aatataagga gtattataat 360

gaaggatatc aaacagatgt caaccgtatc gtgattcaag gagatactgt aacattctac 420

aaaaacaaag aagaatattc tggtaaatat atctatgatg ggtacaaaat tttgacatat 480

gatgcaggga atagaggtgt aagatacata tttaaactag cagaaaaaac agaaggagtt 540

cctcagtata ttcaatttag tgatcatggt atttatccga ataaagctaa tcactaccac 600

ttgtattggg gtgacaatcg tgaagcttta ttcgatgaag tcatacactg gcctacctac 660

tacccatcgg atatgaatgg acatgatatt gcgcacgaga tgatggcgca ttaa 714

<210> 176

<211> 237

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 176

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

1 5 10 15

Met Leu Val Leu Val Gly Cys Gln Thr Ser Gly Ser Ser Lys Lys Gln

20 25 30

Glu Gln Thr Ser Glu Ser His Thr His Glu Asn Glu His Asp His Ser

35 40 45

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

50 55 60

Gly Tyr Phe Glu Asp Asn Gln Val Lys Asp Arg Ser Leu Ser Asp Trp

65 70 75 80

Lys Gly Asp Trp Gln Ser Val Tyr Pro Tyr Leu Gln Asp Gly Thr Leu

85 90 95

Asp Glu Val Phe Ala Tyr Lys Ala Lys His Lys Gly Lys Met Ser Ala

100 105 110

Lys Glu Tyr Lys Glu Tyr Tyr Asn Glu Gly Tyr Gln Thr Asp Val Asn

115 120 125

Arg Ile Val Ile Gln Gly Asp Thr Val Thr Phe Tyr Lys Asn Lys Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Ala Gly Asn Arg Gly Val Arg Tyr Ile Phe Lys Leu Ala Glu Lys

165 170 175

Thr Glu Gly Val Pro Gln Tyr Ile Gln Phe Ser Asp His Gly Ile Tyr

180 185 190

Pro Asn Lys Ala Asn His Tyr His Leu Tyr Trp Gly Asp Asn Arg Glu

195 200 205

Ala Leu Phe Asp Glu Val Ile His Trp Pro Thr Tyr Tyr Pro Ser Asp

210 215 220

Met Asn Gly His Asp Ile Ala His Glu Met Met Ala His

225 230 235

<210> 177

<211> 1548

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 177

atggtagtag catacaaaca tgagccattt acagattttt cagtagaggc taacaaatta 60

gcgtttgaag aaggtttaaa gaaagtagaa tcttatcttg gacaagacta tccattaatt 120

attgggggag aaaaaatcac tacagaagac aaaattgttt ctgtaaaccc tgcaaataaa 180

gaggaacttg ttggtcgcgt ttcaaaagca agccgtgagt tagctgaaaa agcaatgcaa 240

gtagcggatg aaacattcca aacttggaga aagtcaaaac cagaaatgcg tgcagacatt 300

ttattccgtg ctgcagcgat cgttcgtcgt agaaaacatg aattctctgc tattcttgta 360

aaagaagcag gtaaaccgtg gaatgaggca gatgctgata cagcagaagc aatcgacttt 420

atggaatatt atggtcgcca aatgttgaaa ttaaaagacg gaattccagt agaaagccgt 480

ccaattgaat ataatcgttt ctcttacatt ccattaggag taggtgttat catttctcct 540

tggaacttcc cattcgcaat tatggcaggt atgacaacag ctgctttagt ttctggtaac 600

acagtattac taaaaccagc tagtacaact cctgtagtag cagcgaaatt catggaagta 660

ttagaagaag ctggcttacc agctggcgta gtaaacttcg taccaggtaa tggttctgaa 720

gttggtgact acttagtaga tcaccctcgt acacgcttca ttagcttcac tggatctcgt 780

gatgtaggta tccgtattta tgagcgcgca gcgaaagtaa acccaggcca aatctggtta 840

aaacgcgtta tcgctgaaat gggtggtaaa gatacaattg ttgttgataa agaagcagat 900

cttgaattag cagctaaatc tatcgttgca tcagcattcg gattctcagg acaaaaatgt 960

tctgcatgtt ctcgtgcagt aatccacgaa gatgtatacg atcacgtatt aaatcgtgct 1020

gttgaattaa cgaaagaatt aacagttgct aacccagctg tattaggtac aaacatgggt 1080

cctgttaatg accaagctgc attcgataaa gtaatgagct atgttgcaat tggtaaagaa 1140

gaaggtagaa ttttagcagg tggcgaagga gacgactcta aaggctggtt catccaacca 1200

acaatcgttg ctgacgttgc agaagatgct cgcctaatga aagaagaaat cttcggacca 1260

gtagtagcat tctgtaaagc aaaagacttt gatcatgcac ttgcaattgc aaacaataca 1320

gaatacggtt taacaggagc agttatctct aacaaccgtg atcatattga aaaagcacgt 1380

gaagacttcc acgtaggtaa cttatacttc aaccgtggat gtactggtgc aatcgtagga 1440

taccaaccat tcggtggctt taacatgtct ggtacagact ctaaagctgg tggtcctgac 1500

tacttagcgc ttcacatgca agcaaaaact acttctgaaa ctttataa 1548

<210> 178

<211> 515

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 178

Met Val Val Ala Tyr Lys His Glu Pro Phe Thr Asp Phe Ser Val Glu
1 5 10 15

Ala Asn Lys Leu Ala Phe Glu Glu Gly Leu Lys Lys Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Leu Gly Gln Asp Tyr Pro Leu Ile Ile Gly Gly Glu Lys Ile Thr Thr
35 40 45

Glu Asp Lys Ile Val Ser Val Asn Pro Ala Asn Lys Glu Glu Leu Val
50 55 60

Gly Arg Val Ser Lys Ala Ser Arg Glu Leu Ala Glu Lys Ala Met Gln
65 70 75 80

Val Ala Asp Glu Thr Phe Gln Thr Trp Arg Lys Ser Lys Pro Glu Met
85 90 95

Arg Ala Asp Ile Leu Phe Arg Ala Ala Ala Ile Val Arg Arg Arg Lys
100 105 110

His Glu Phe Ser Ala Ile Leu Val Lys Glu Ala Gly Lys Pro Trp Asn
115 120 125

Glu Ala Asp Ala Asp Thr Ala Glu Ala Ile Asp Phe Met Glu Tyr Tyr
130 135 140

Gly Arg Gln Met Leu Lys Leu Lys Asp Gly Ile Pro Val Glu Ser Arg
145 150 155 160

Pro Ile Glu Tyr Asn Arg Phe Ser Tyr Ile Pro Leu Gly Val Gly Val
165 170 175

Ile Ile Ser Pro Trp Asn Phe Pro Phe Ala Ile Met Ala Gly Met Thr
180 185 190

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

195 200 205

Thr Thr Pro Val Val Ala Ala Lys Phe Met Glu Val Leu Glu Glu Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Gly Asp Tyr Leu Val Asp His Pro Arg Thr Arg Phe Ile Ser Phe

245 250 255

Thr Gly Ser Arg Asp Val Gly Ile Arg Ile Tyr Glu Arg Ala Ala Lys

260 265 270

Val Asn Pro Gly Gln Ile Trp Leu Lys Arg Val Ile Ala Glu Met Gly

275 280 285

Gly Lys Asp Thr Ile Val Val Asp Lys Glu Ala Asp Leu Glu Leu Ala

290 295 300

Ala Lys Ser Ile Val Ala Ser Ala Phe Gly Phe Ser Gly Gln Lys Cys

305 310 315 320

Ser Ala Cys Ser Arg Ala Val Ile His Glu Asp Val Tyr Asp His Val

325 330 335

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

340 345 350

Ala Val Leu Gly Thr Asn Met Gly Pro Val Asn Asp Gln Ala Ala Phe

355 360 365

Asp Lys Val Met Ser Tyr Val Ala Ile Gly Lys Glu Glu Gly Arg Ile

370 375 380

Leu Ala Gly Gly Glu Gly Asp Asp Ser Lys Gly Trp Phe Ile Gln Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Ile Phe Gly Pro Val Val Ala Phe Cys Lys Ala Lys Asp Phe Asp His

420 425 430

Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asn Thr Glu Tyr Gly Leu Thr Gly Ala Val

435 440 445

Ile Ser Asn Asn Arg Asp His Ile Glu Lys Ala Arg Glu Asp Phe His
450 455 460

Val Gly Asn Leu Tyr Phe Asn Arg Gly Cys Thr Gly Ala Ile Val Gly
465 470 475 480

Tyr Gln Pro Phe Gly Gly Phe Asn Met Ser Gly Thr Asp Ser Lys Ala
485 490 495

Gly Gly Pro Asp Tyr Leu Ala Leu His Met Gln Ala Lys Thr Thr Ser
500 505 510

Glu Thr Leu
515

<210> 179

<211> 2445

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 179

atggcaaaga ctaactctta caaaaaagta atcgctggta caatgacagc agcaatggta 60

gcaggtgttg tttctccagt agcagcagca ggtaaaacat tcccagacgt tcctgctgat 120

cactggggaa ttgattctat taactactta gtagaaaaag gcgcagttaa aggtaacgac 180

aaaggaatgt tcgagcctgg aaaagaatta actcgtgcag aagcagctac aatgatggct 240

caaatcttaa acttaccaat cgataaagat gctaaaccat ctttcgctga ctctcaaggc 300

caatggtaca ctccattcat cgcagctgta gaaaaagctg gcgttattaa aggtacagga 360

aacggctttg agccaaacgg aaaaatcgac cgcgtttcta tggcatctct tcttgtagaa 420

gcttacaaat tagatactaa agtaaacggt actccagcaa ctaaattcaa agatttagaa 480

acattaaact ggggtaaaga aaaagctaac atcttagttg aattaggaat ctctgttggt 540

actggtgatc aatgggagcc taagaaaact gtaactaaag cagaagctgc tcaattcatt 600

gctaagactg acaagcagtt cggtacagaa gcagcaaaag ttgaatctgc aaaagctgtt 660

acaactcaaa aagtagaagt taaattcagc aaagctgttg aaaaattaac taaagaagat 720

atcaaagtaa ctaacaaagc taacaacgat aaagtactag ttaaagaggt aactttatca 780

gaagataaaa aatctgctac agttgaatta tatagtaact tagcagctaa acaaacttac 840

actgtagatg taaacaaagt tggtaaaaca gaagtagctg taggttcttt agaagcaaaa 900

acaatcgaaa tggctgacca aacagttgta gctgatgagc caacagcatt acaattcaca 960

gttaaagatg aaaacggtac tgaagttgtt tcaccagagg gtattgaatt tgtaacgcca 1020

gctgcagaaa aaattaatgc aaaaggtgaa atcactttag caaaaggtac ttcaactact 1080

gtaaaagctg tttataaaaa agacggtaaa gtagtagctg aaagtaaaga agtaaaagtt 1140

tctgctgaag gtgctgcagt agcttcaatc tctaactgga cagttgcaga acaaaataaa 1200

gctgacttta cttctaaaga tttcaaacaa aacaataaag tttacgaagg cgacaacgct 1260

tacgttcaag tagaattgaa agatcaattt aacgcagtaa caactggaaa agttgaatat 1320

gagtcgttaa acacagaagt tgctgtagta gataaagcta ctggtaaagt aactgtatta 1380

tctgcaggaa aagcaccagt aaaagtaact gtaaaagatt caaaaggtaa agaacttgtt 1440

tcaaaaacag ttgaaattga agctttcgct caaaaagcaa tgaaagaaat taaattagaa 1500

aaaactaacg tagcgctttc tacaaaagat gtaacagatt taaaagtaaa agctccagta 1560

ctagatcaat acggtaaaga gtttacagct cctgtaacag tgaaagtact tgataaagat 1620

ggtaaagaat taaaagaaca aaaattagaa gctaaatatg tgaacaaaga attagttctg 1680

aatgcagcag gtcaagaagc tggtaattat acagttgtat taactgcaaa atctggtgaa 1740

aaagaagcaa aagctacatt agctctagaa ttaaaagctc caggtgcatt ctctaaattt 1800

gaagttcgtg gtttagaaaa agaattagat aaatatgtta ctgaggaaaa ccaaaagaat 1860

gcaatgactg tttcagttct tcctgtagat gcaaatggat tagtattaaa aggtgcagaa 1920

gcagctgaac taaaagtaac aacaacaaac aaagaaggta aagaagtaga cgcaactgat 1980

gcacaagtta ctgtacaaaa taacagtgta attactgttg gtcaaggtgc aaaagctggt 2040

gaaacttata aagtaacagt tgtactagat ggtaaattaa tcacaactca ttcattcaaa 2100

gttgttgata cagcaccaac tgctaaagga ttagcagtag aatttacaag cacatctctt 2160

aaagaagtag ctccaaatgc tgatttaaaa gctgcacttt taaatatctt atctgttgat 2220

ggtgtacctg cgactacagc aaaagcaaca gtttctaatg tagaatttgt ttctgctgac 2280

acaaatgttg tagctgaaaa tggtacagtt ggtgcaaaag gtgcaacatc tatctatgtg 2340

aaaaacctga cagttgtaaa agatggaaaa gagcaaaaag tagaatttga taaagctgta 2400

caagttgcag tttctattaa agaagcaaaa cctgcaacaa aataa 2445

<210> 180

<211> 814

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 180

Met Ala Lys Thr Asn Ser Tyr Lys Lys Val Ile Ala Gly Thr Met Thr

1 5 10 15

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

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

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

Thr Glu Ala Ala Lys Val Glu Ser Ala Lys Ala Val Thr Thr Gln Lys
210 215 220
Val Glu Val Lys Phe Ser Lys Ala Val Glu Lys Leu Thr Lys Glu Asp
225 230 235 240
Ile Lys Val Thr Asn Lys Ala Asn Asn Asp Lys Val Leu Val Lys Glu
245 250 255

Val Thr Leu Ser Glu Asp Lys Lys Ser Ala Thr Val Glu Leu Tyr Ser
260 265 270

Asn Leu Ala Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Val Asp Val Asn Lys Val Gly
275 280 285

Lys Thr Glu Val Ala Val Gly Ser Leu Glu Ala Lys Thr Ile Glu Met
290 295 300

Ala Asp Gln Thr Val Val Ala Asp Glu Pro Thr Ala Leu Gln Phe Thr
305 310 315 320

Val Lys Asp Glu Asn Gly Thr Glu Val Val Ser Pro Glu Gly Ile Glu
325 330 335

Phe Val Thr Pro Ala Ala Glu Lys Ile Asn Ala Lys Gly Glu Ile Thr
340 345 350

Leu Ala Lys Gly Thr Ser Thr Thr Val Lys Ala Val Tyr Lys Lys Asp
355 360 365

Gly Lys Val Val Ala Glu Ser Lys Glu Val Lys Val Ser Ala Glu Gly
370 375 380

Ala Ala Val Ala Ser Ile Ser Asn Trp Thr Val Ala Glu Gln Asn Lys
385 390 395 400

Ala Asp Phe Thr Ser Lys Asp Phe Lys Gln Asn Asn Lys Val Tyr Glu
405 410 415

Gly Asp Asn Ala Tyr Val Gln Val Glu Leu Lys Asp Gln Phe Asn Ala
420 425 430

Val Thr Thr Gly Lys Val Glu Tyr Glu Ser Leu Asn Thr Glu Val Ala
435 440 445

Val Val Asp Lys Ala Thr Gly Lys Val Thr Val Leu Ser Ala Gly Lys
450 455 460

Ala Pro Val Lys Val Thr Val Lys Asp Ser Lys Gly Lys Glu Leu Val
465 470 475 480

Ser Lys Thr Val Glu Ile Glu Ala Phe Ala Gln Lys Ala Met Lys Glu
485 490 495

Ile Lys Leu Glu Lys Thr Asn Val Ala Leu Ser Thr Lys Asp Val Thr

500 505 510

Asp Leu Lys Val Lys Ala Pro Val Leu Asp Gln Tyr Gly Lys Glu Phe

515 520 525

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

530 535 540

Lys Glu Gln Lys Leu Glu Ala Lys Tyr Val Asn Lys Glu Leu Val Leu

545 550 555 560

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

565 570 575

Lys Ser Gly Glu Lys Glu Ala Lys Ala Thr Leu Ala Leu Glu Leu Lys

580 585 590

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

595 600 605

Leu Asp Lys Tyr Val Thr Glu Glu Asn Gln Lys Asn Ala Met Thr Val

610 615 620

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

625 630 635 640

Ala Ala Glu Leu Lys Val Thr Thr Thr Asn Lys Glu Gly Lys Glu Val

645 650 655

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

660 665 670

Val Gly Gln Gly Ala Lys Ala Gly Glu Thr Tyr Lys Val Thr Val Val

675 680 685

Leu Asp Gly Lys Leu Ile Thr Thr His Ser Phe Lys Val Val Asp Thr

690 695 700

Ala Pro Thr Ala Lys Gly Leu Ala Val Glu Phe Thr Ser Thr Ser Leu

705 710 715 720

Lys Glu Val Ala Pro Asn Ala Asp Leu Lys Ala Ala Leu Leu Asn Ile

725 730 735

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

740 745 750

Asn Val Glu Phe Val Ser Ala Asp Thr Asn Val Val Ala Glu Asn Gly
755 760 765

Thr Val Gly Ala Lys Gly Ala Thr Ser Ile Tyr Val Lys Asn Leu Thr
770 775 780

Val Val Lys Asp Gly Lys Glu Gln Lys Val Glu Phe Asp Lys Ala Val
785 790 795 800

Gln Val Ala Val Ser Ile Lys Glu Ala Lys Pro Ala Thr Lys
805 810

<210> 181

<211> 537

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 181

atgaaagcaa ctggaatcgt acgtcgaatt gatgatttag gtagggtagt aatcccaaag 60

gaaattcgta gaactttacg tattcgagaa ggggacccat tagaaatatt tgttgatcgc 120

gatggagaag taattttaaa gaaatattct ccaattagcg aactaggtga ttttgcaaaa 180

gaatatgcag aggctttata tgatagctta ggacataatg tgcttgtatg cgatcgagat 240

tctattatcg cagtatcagg cgtatcaaaa aaagaatact taaataaaag cgttggcgat 300

ttaattgaaa aaacgatgga agaaagaaag tctgttatta tgacggacga aagtgatgtt 360

tccattattg atggtgtaac agaaaaggtt cattcttata cagttggacc gattgttgca 420

aatggagacc caattggggc tgtcattatt ttttcaaaag aagcgattat aagcgaaata 480

gagcacaaag cggtcaatac tgctgccagt ttcttagcga aacaaatgga acagtaa 537

<210> 182

<211> 178

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 182

Met Lys Ala Thr Gly Ile Val Arg Arg Ile Asp Asp Leu Gly Arg Val
1 5 10 15

Val Ile Pro Lys Glu Ile Arg Arg Thr Leu Arg Ile Arg Glu Gly Asp
20 25 30

Pro Leu Glu Ile Phe Val Asp Arg Asp Gly Glu Val Ile Leu Lys Lys

35 40 45

Tyr Ser Pro Ile Ser Glu Leu Gly Asp Phe Ala Lys Glu Tyr Ala Glu

50 55 60

Ala Leu Tyr Asp Ser Leu Gly His Asn Val Leu Val Cys Asp Arg Asp

65 70 75 80

Ser Ile Ile Ala Val Ser Gly Val Ser Lys Lys Glu Tyr Leu Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

Ile Met Thr Asp Glu Ser Asp Val Ser Ile Ile Asp Gly Val Thr Glu

115 120 125

Lys Val His Ser Tyr Thr Val Gly Pro Ile Val Ala Asn Gly Asp Pro

130 135 140

Ile Gly Ala Val Ile Ile Phe Ser Lys Glu Ala Ile Ile Ser Glu Ile

145 150 155 160

Glu His Lys Ala Val Asn Thr Ala Ala Ser Phe Leu Ala Lys Gln Met

165 170 175

Glu Gln

<210> 183

<211> 1701

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 183

atgaaaaaga aaagtttagc gttagtgtta gcgacaggaa tggcagttac aacgtttgga 60

gggacaggct ctgcttttgc agattctaaa aatgtgctct ctacgaagaa gtacaatgag 120

acagtacagt caccggagtt tatttctggg gatttaactg aagcaactgg taagaaagca 180

gaatctgttg tgtttgatta cttaaatgca gcaaaaggtg attataagtt aggggaaaag 240

agtgcgcaag attctttcaa agtgaaacaa gcgaagaaag atgctgtaac tgattcaaca 300

gtattacgtt tgcaacaagt ttacgaagga gtacctgtat ggggttctac gcaagtagct 360

cacgtaagta aagatggttc attaaaagta ttgtctggaa cagttgcacc tgatttagac 420

aaaaaagaaa agttgaaaaa taaaaataag atcgaaggcg caaaagcaat tgaaattgcg 480

caaaaagatt taggtgttac acctaaatat gaggtagaac caaaagcgga cttatatgta 540

tatcaaaatg gtgaagaaac aacatatgca tacgttgtaa atttaaactt cttagagcca 600

agcccaggaa actactacta tttcattgaa gcggacagcg gtaaagtatt aaataaatat 660

aataaattgg atcatgtagc aaatgaagat aagtcaccag ttaagcaaga ggcacctaaa 720

caagaagcga aaccggctgt aaagcctgta acaggcacaa atgcagtggg tactggtaaa 780

ggtgtattag gagatacgaa gtcacttaat acaacgttat ctgcatcatc ttactattta 840

caagataata cgcgcggagc aacgattttc acatatgatg cgaaaaaccg ctcaacatta 900

ccaggaacgt tatgggtaga tgcggataat gttttcaatg cagcgtatga tgcagcggca 960

gtagatgctc actactatgc tggtagaaca tatgattact ataaagcgac atttaataga 1020

aactctatta atgatgcagg agcaccatta aaatcaacag ttcattatgg aagtagatat 1080

aataatgcgt tctggaatgg ctctcaaatg gtatacggag atggtgatgg tgtaacattc 1140

acttcattgt ctggtggaat tgatgtaatt ggccatgaat taacgcatgc tgttacagag 1200

tatagctcag atttaattta tcaaaatgaa tcaggagcat taaatgaagc tatttcagat 1260

gtatttggta cattagtaga gtattatgat aaccgtaacc ctgattggga aattggtgaa 1320

gatatttaca cgcctggtaa agctggagat gcacttcgct ctatgagtga tccaacgaaa 1380

tatggtgatc cagatcatta ttctaagcgt tacacaggta ctggtgataa cggtggcgtt 1440

catacaaata gcggtattat taacaaagcg gcttacttac tagcgaatgg tggtacgcat 1500

tacggtgtta ctgtaaacgg tattggtaaa gataaagtag gagcgattta ttaccgtgca 1560

aatacgcaat atttcacaca atctactacg tttagtcaag ctcgtgctgg attagtacaa 1620

gctgcagctg acttatatgg tgctagctct gcagaagtag cagcagttaa gcaatcatat 1680

agtgctgttg gcgtaaacta a 1701

<210> 184

<211> 566

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 184

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

1 5 10 15

Thr Thr Phe Gly Gly Thr Gly Ser Ala Phe Ala Asp Ser Lys Asn Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Asp Tyr Leu Asn Ala Ala Lys Gly Asp Tyr Lys Leu Gly Glu Lys

65 70 75 80

Ser Ala Gln Asp Ser Phe Lys Val Lys Gln Ala Lys Lys Asp Ala Val

85 90 95

Thr Asp Ser Thr Val Leu Arg Leu Gln Gln Val Tyr Glu Gly Val Pro

100 105 110

Val Trp Gly Ser Thr Gln Val Ala His Val Ser Lys Asp Gly Ser Leu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Lys Asn Lys Asn Lys Ile Glu Gly Ala Lys Ala Ile Glu Ile Ala

145 150 155 160

Gln Lys Asp Leu Gly Val Thr Pro Lys Tyr Glu Val Glu Pro Lys Ala

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Leu Asn Phe Leu Glu Pro Ser Pro Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe

195 200 205

Ile Glu Ala Asp Ser Gly Lys Val Leu Asn Lys Tyr Asn Lys Leu Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Glu Ala Lys Pro Ala Val Lys Pro Val Thr Gly Thr Asn Ala Val

245 250 255

Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Asn Thr Thr

260 265 270

Leu Ser Ala Ser Ser Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Ala Thr

275 280 285

Ile Phe Thr Tyr Asp Ala Lys Asn Arg Ser Thr Leu Pro Gly Thr Leu

290 295 300

Trp Val Asp Ala Asp Asn Val Phe Asn Ala Ala Tyr Asp Ala Ala Ala

305 310 315 320

Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Arg Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ala

325 330 335

Thr Phe Asn Arg Asn Ser Ile Asn Asp Ala Gly Ala Pro Leu Lys Ser

340 345 350

Thr Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser

355 360 365

Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Val Thr Phe Thr Ser Leu Ser

370 375 380

Gly Gly Ile Asp Val Ile Gly His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Glu

385 390 395 400

Tyr Ser Ser Asp Leu Ile Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu

405 410 415

Ala Ile Ser Asp Val Phe Gly Thr Leu Val Glu Tyr Tyr Asp Asn Arg

420 425 430

Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Ala

435 440 445

Gly Asp Ala Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro Thr Lys Tyr Gly Asp Pro

450 455 460

Asp His Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr Gly Asp Asn Gly Gly Val

465 470 475 480

His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Leu Ala Asn

485 490 495

Gly Gly Thr His Tyr Gly Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Lys Asp Lys

500 505 510

Val Gly Ala Ile Tyr Tyr Arg Ala Asn Thr Gln Tyr Phe Thr Gln Ser

515 520 525

Thr Thr Phe Ser Gln Ala Arg Ala Gly Leu Val Gln Ala Ala Ala Asp
530 535 540

Leu Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Val Ala Ala Val Lys Gln Ser Tyr
545 550 555 560

Ser Ala Val Gly Val Asn
565

<210> 185

<211> 1260

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 185

gtggcatttg aatttaaact accagatatc ggtgaaggta tccacgaagg tgaaatcgta 60

aaatggttta ttaaaccagg cgacgaagta aacgaagacg acgtacttct tgaagtacaa 120

aatgataaag cagtagtaga aattccttct cctgttaaag gtaaagtact tgaagtactt 180

gtagaagaag gtacggttgc agtagttgga gatacattaa ttaaatttga tgctccagga 240

tacgaaaacc ttaaatttaa aggcgacgat catgacgaag ctcctaaagc tgaagctact 300

ccagcagcaa ctgcagaagt agtaaatgag cgcgtaatcg ctatgccatc tgttcgtaaa 360

tatgctcgtg aaaacggcgt agacattcat aaagtagctg gttctggtaa gaacggtcgt 420

atcgtaaaag ctgacatcga tgcatttgca aatggtggac aagcagtagc agcaactgag 480

gctccagcag cagtagaagc tactccagca gcagcgaaag aagaagcacc aaaagcacaa 540

ccaatcccag ctggtgaata tccagaaact cgtgagaaaa tgagtggtat ccgtaaagca 600

attgcgaaag caatggttaa ctctaaacat acagctcctc acgtaacatt aatggatgaa 660

gtagatgtaa ctgaacttgt tgctcaccgt aagaagttca aagctgtggc agctgacaaa 720

ggtattaaat taacttacct tccatacgtt gttaaagctt taacatctgc attacgtgaa 780

tacccaatgt taaacacttc tttagatgat gcttctcaag aagtagttca taaacattac 840

ttcaacatcg gtatcgcagc tgatacagac aaaggtctat tagtaccagt tgttaaagat 900

acagatcgca agtctatctt cacaatttct aacgagatca atgatcttgc tggtaaagca 960

cgtgaaggtc gtttagctcc tgctgaaatg aaaggcgctt cttgcacaat tacaaacatt 1020

ggttctgcag gtggacaatg gttcactcca gttatcaacc acccagaagt agcaatcctt 1080

ggtatcggcc gtatcgctga gaaaccagtt gtgaaaaacg gtgagatcgt tgcagctcca 1140

gtattagcat tatctctaag ctttgaccat cgtttaattg acggcgcaac tgctcaaaaa 1200

gcattaaacc aaattaaacg tctattgaat gacccacaat tattagtaat ggaggcgtaa 1260

<210> 186

<211> 419

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 186

Val Ala Phe Glu Phe Lys Leu Pro Asp Ile Gly Glu Gly Ile His Glu
1 5 10 15

Gly Glu Ile Val Lys Trp Phe Ile Lys Pro Gly Asp Glu Val Asn Glu
20 25 30

Asp Asp Val Leu Leu Glu Val Gln Asn Asp Lys Ala Val Val Glu Ile
35 40 45

Pro Ser Pro Val Lys Gly Lys Val Leu Glu Val Leu Val Glu Glu Gly
50 55 60

Thr Val Ala Val Val Gly Asp Thr Leu Ile Lys Phe Asp Ala Pro Gly
65 70 75 80

Tyr Glu Asn Leu Lys Phe Lys Gly Asp Asp His Asp Glu Ala Pro Lys
85 90 95

Ala Glu Ala Thr Pro Ala Ala Thr Ala Glu Val Val Asn Glu Arg Val
100 105 110

Ile Ala Met Pro Ser Val Arg Lys Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Val Asp
115 120 125

Ile His Lys Val Ala Gly Ser Gly Lys Asn Gly Arg Ile Val Lys Ala
130 135 140

Asp Ile Asp Ala Phe Ala Asn Gly Gly Gln Ala Val Ala Ala Thr Glu
145 150 155 160

Ala Pro Ala Ala Val Glu Ala Thr Pro Ala Ala Ala Lys Glu Glu Ala
165 170 175

Pro Lys Ala Gln Pro Ile Pro Ala Gly Glu Tyr Pro Glu Thr Arg Glu
180 185 190

Lys Met Ser Gly Ile Arg Lys Ala Ile Ala Lys Ala Met Val Asn Ser
195 200 205

Lys His Thr Ala Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Val Asp Val Thr
210 215 220
Glu Leu Val Ala His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Val Ala Ala Asp Lys
225 230 235 240

Gly Ile Lys Leu Thr Tyr Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Thr Ser
245 250 255
Ala Leu Arg Glu Tyr Pro Met Leu Asn Thr Ser Leu Asp Asp Ala Ser
260 265 270
Gln Glu Val Val His Lys His Tyr Phe Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp
275 280 285
Thr Asp Lys Gly Leu Leu Val Pro Val Val Lys Asp Thr Asp Arg Lys
290 295 300

Ser Ile Phe Thr Ile Ser Asn Glu Ile Asn Asp Leu Ala Gly Lys Ala
305 310 315 320
Arg Glu Gly Arg Leu Ala Pro Ala Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr
325 330 335
Ile Thr Asn Ile Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile
340 345 350
Asn His Pro Glu Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys
355 360 365

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

<210> 187
<211> 2289
<212> DNA
<213> Bacillus anthracis

<400> 187

atggcaattc aaacaagtaa cttaggttat ccacgtatcg gattacaacg agagtggaaa 60

aaaacattgg aagctttttg gtccaataaa atcaatgaag aacaattttt aacaacaatg 120

aaagaaattc gccttcaaca cgtaaaagta cagcaagaaa aagggattga actcattcca 180

attggcgact ttacatatta cgatcacgtt ttggatactg cttatatgct aggatttatc 240

ccatcacgtt tttctgagtt tacatcttac ctagatgtat attttgcaat ggcgcgtggc 300

tctaaagatc acgtagcttc cgaaatgaca aaatggttta acacaaacta tcattatatc 360

gttcctgaat atgaagaggg attacaaatc tctttaaaag ataatcgtcc acttcgctta 420

tacgaagagg caaaacaaga attgggtgta gatggaaaac ctgttatttt aggaccatat 480

actttcttga aattagctaa aggctataca caagagcaat ttgctactat tttaaaacag 540

ttagttgcac cttacgtaca actgctttca gaactacatg cagctggtgc acaaatcatt 600

cmagttgatg aaccgatttt cgcttcttta acgaaagaag aagttcaaca agcaaaagaa 660

atttatgaag ctattcgtaa agaggttcca aatgcgactc ttcttttaca aacatacttt 720

gatagtgtag aagaaaacta tgaagaaatt attacattcc cagtatcaag tattggatta 780

gatttcgttc atggtaaaga aggtaattta aatgctattt caaaatatgg attcccagct 840

gataaaactt tagctgttgg ttgtatagat ggccgtaaca tttggagagc tgaccttgat 900

gaagttctta cgttatttac aacgttacaa aaacaagtcc aaacgaaaga tctcatcgtt 960

caaccttctt gtagcttatt gcatacacca atcgataaaa cagaagaaac tcacttatca 1020

actgagctat ttgatgcgtt ggcatttgca aatcaaaaat tagaagagtt agttcttatt 1080

cattccgctc tgactcaagg tacagaaagc attagtaatg aactggaaac atatcgaaac 1140

gtacatcata caattcgttc atctgctgca cgtaaccgag aagatgtcaa agcagcacga 1200

acagcactaa aagaagaaga tttttcacgt cctcttccat ttgaaaaacg atacgaatta 1260

caacaagttg ccctaaagtt accgttgtta ccaacaacga ctatcggtag cttccctcaa 1320

acaactgaag ttcgccaaac gcgaaaagaa tggcgtaatg gtattatttc aaatgaacaa 1380

tatgaacaat ttattgaaaa agagacagaa aaatggattc gttaccaaga agaaattggt 1440

cttgatgttc ttgttcatgg cgagtttgaa agaactgaca tggtcgaata ttttggtgag 1500

cgccttgctg gcttctcatt cactaaaaac ggttgggtac aatcatacgg ttctcgttgc 1560

gtaaaaccac ctgttattta tggtgatgta gcctttatta acggcatgac tattaaggaa 1620

acggtttatg cacaaagctt aacagagaaa gttgtaaaag gaatgttaac tggacctgtt 1680

acgattttaa attggtcctt cgttcgaaat gacattccaa gaaaagaagt ttcgtatcaa 1740

attgcattag ctcttcgtca tgaaattgaa ctacttgaat cttctggaat tcgagtgatc 1800
caagtcgatg agccagcact tcgtgaagga atgccactga aagaaaaaga ttgggacgct 1860
tatattacat gggcagtaca atccttcctt ttagcaactt cttctgtagc aaatgaaaca 1920
caaattcata cgcatatgtg ttacagtaac ttcgaagata ttgttgacgc gattcgcgca 1980
ttagatgcag atgtgatttc tatcgaaaca tcaagaagtc acggagaatt tattgataca 2040
ttaaaacata caacatacga aaagggcatc ggtctaggtg tatatgatat tcatagccca 2100
cgtgtaccaa gtaaagatga aatgtataaa atcgtagaac aatctttaca agtatgcgat 2160

cctaaatatt tctggattaa tcctgattgt ggtttaaaaa cgcgaagaac agaagaagtt 2220
attccagctc tagaacatat ggtgcaagca gcaaaagatg ctcgttccct actaaaaaca 2280
aacgcataa 2289

<210> 188
<211> 762
<212> PRT
<213> Bacillus anthracis
<220><221> misc_feature
<222> (201)..(201)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 188

Met Ala Ile Gln Thr Ser Asn Leu Gly Tyr Pro Arg Ile Gly Leu Gln
1 5 10 15

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

Pro Ser Arg Phe Ser Glu Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Val Tyr Phe Ala
85 90 95

Met Ala Arg Gly Ser Lys Asp His Val Ala Ser Glu Met Thr Lys Trp
100 105 110

Phe Asn Thr Asn Tyr His Tyr Ile Val Pro Glu Tyr Glu Glu Gly Leu
115 120 125

Gln Ile Ser Leu Lys Asp Asn Arg Pro Leu Arg Leu Tyr Glu Glu Ala
130 135 140

Lys Gln Glu Leu Gly Val Asp Gly Lys Pro Val Ile Leu Gly Pro Tyr
145 150 155 160

Thr Phe Leu Lys Leu Ala Lys Gly Tyr Thr Gln Glu Gln Phe Ala Thr
165 170 175

Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Pro Tyr Val Gln Leu Leu Ser Glu Leu
180 185 190

His Ala Ala Gly Ala Gln Ile Ile Xaa Val Asp Glu Pro Ile Phe Ala
195 200 205

Ser Leu Thr Lys Glu Glu Val Gln Gln Ala Lys Glu Ile Tyr Glu Ala
210 215 220

Ile Arg Lys Glu Val Pro Asn Ala Thr Leu Leu Leu Gln Thr Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Ser Val Glu Glu Asn Tyr Glu Glu Ile Ile Thr Phe Pro Val Ser
245 250 255

Ser Ile Gly Leu Asp Phe Val His Gly Lys Glu Gly Asn Leu Asn Ala
260 265 270

Ile Ser Lys Tyr Gly Phe Pro Ala Asp Lys Thr Leu Ala Val Gly Cys
275 280 285

Ile Asp Gly Arg Asn Ile Trp Arg Ala Asp Leu Asp Glu Val Leu Thr
290 295 300

Leu Phe Thr Thr Leu Gln Lys Gln Val Gln Thr Lys Asp Leu Ile Val
305 310 315 320

Gln Pro Ser Cys Ser Leu Leu His Thr Pro Ile Asp Lys Thr Glu Glu
325 330 335

Thr His Leu Ser Thr Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ala Phe Ala Asn Gln

340 345 350

Lys Leu Glu Glu Leu Val Leu Ile His Ser Ala Leu Thr Gln Gly Thr

355 360 365

Glu Ser Ile Ser Asn Glu Leu Glu Thr Tyr Arg Asn Val His His Thr

370 375 380

Ile Arg Ser Ser Ala Ala Arg Asn Arg Glu Asp Val Lys Ala Ala Arg

385 390 395 400

Thr Ala Leu Lys Glu Glu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Pro Phe Glu Lys

405 410 415

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

420 425 430

Thr Thr Ile Gly Ser Phe Pro Gln Thr Thr Glu Val Arg Gln Thr Arg

435 440 445

Lys Glu Trp Arg Asn Gly Ile Ile Ser Asn Glu Gln Tyr Glu Gln Phe

450 455 460

Ile Glu Lys Glu Thr Glu Lys Trp Ile Arg Tyr Gln Glu Glu Ile Gly

465 470 475 480

Leu Asp Val Leu Val His Gly Glu Phe Glu Arg Thr Asp Met Val Glu

485 490 495

Tyr Phe Gly Glu Arg Leu Ala Gly Phe Ser Phe Thr Lys Asn Gly Trp

500 505 510

Val Gln Ser Tyr Gly Ser Arg Cys Val Lys Pro Pro Val Ile Tyr Gly

515 520 525

Asp Val Ala Phe Ile Asn Gly Met Thr Ile Lys Glu Thr Val Tyr Ala

530 535 540

Gln Ser Leu Thr Glu Lys Val Val Lys Gly Met Leu Thr Gly Pro Val

545 550 555 560

Thr Ile Leu Asn Trp Ser Phe Val Arg Asn Asp Ile Pro Arg Lys Glu

565 570 575

Val Ser Tyr Gln Ile Ala Leu Ala Leu Arg His Glu Ile Glu Leu Leu

580 585 590

Glu Ser Ser Gly Ile Arg Val Ile Gln Val Asp Glu Pro Ala Leu Arg
595 600 605

Glu Gly Met Pro Leu Lys Glu Lys Asp Trp Asp Ala Tyr Ile Thr Trp
610 615 620

Ala Val Gln Ser Phe Leu Leu Ala Thr Ser Ser Val Ala Asn Glu Thr
625 630 635 640

Gln Ile His Thr His Met Cys Tyr Ser Asn Phe Glu Asp Ile Val Asp
645 650 655

Ala Ile Arg Ala Leu Asp Ala Asp Val Ile Ser Ile Glu Thr Ser Arg
660 665 670

Ser His Gly Glu Phe Ile Asp Thr Leu Lys His Thr Thr Tyr Glu Lys
675 680 685

Gly Ile Gly Leu Gly Val Tyr Asp Ile His Ser Pro Arg Val Pro Ser
690 695 700

Lys Asp Glu Met Tyr Lys Ile Val Glu Gln Ser Leu Gln Val Cys Asp
705 710 715 720

Pro Lys Tyr Phe Trp Ile Asn Pro Asp Cys Gly Leu Lys Thr Arg Arg
725 730 735

Thr Glu Glu Val Ile Pro Ala Leu Glu His Met Val Gln Ala Ala Lys
740 745 750

Asp Ala Arg Ser Leu Leu Lys Thr Asn Ala
755 760

<210> 189

<211> 1413

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 189

atggtagtag gagatttccc aattgaatta gatacagtcg ttgttggtgc aggtcctggt 60

ggatacgttg cggcaattcg tgcagcacaa ttaggtcaaa aggtagcaat tattgaaaaa 120

gctaaccttg gtggcgtatg cttaaacgtt ggatgtattc cttcaaaagc gttaatcaat 180

gcaggtcatc gttatgagaa tgcaatgcat tctgatgaca tgggtatcac tgcagagaac 240

gtaaaagttg actttacaaa agttcaagaa tggaaaaacg gcgtagttaa gaaattaact 300

ggcggtgttg aaggccttct taaaggtaac aaagttgaaa tcattcgcgg tgaagcttac 360

ttcgtagatg ctaatacatt acgcgttatg actgaagagg cagctcaaac ttatacgttt 420

aaaaatgctg ttcttgcaac tggttctaca ccaatcgaaa ttccaggatt caaatactct 480

aaacgtgtta tcaactctac aggcgcttta agcttacctg aaattcctaa aaaacttgtt 540

gtaatcggcg gcggttacat cggtatggaa ttaggtactg catatgctaa cttcggtaca 600

gaagttactg tagtagaagc tggcgacgaa atcttagctg gtttcgaaaa agctatgagc 660

tctgttgtta aacgtgctct acagaaaaaa ggtaacgtaa atatccatac aaaagctatg 720

gctaaaggcg ttgaagaaac agaaactggc gtaaaagtta gctttgaagt taaaggtgaa 780

atccaaactg tagaagcaga ttacgtatta gtaactgtag gtcgtcgtcc aaacactcaa 840

gaaatcggtc ttgagcaagt tggagttaaa atgactgacc gcggcatcat cgaaatcgat 900

gagcaatgtc gtacaaacgt accaaacatc tatgcaatcg gtgatatcgt tcctggacca 960

ccattagctc acaaagcttc ttacgaaggt aaagtagctg tagaagcaat tagtggccat 1020

gcatcagcta tcgattacat cggaattcct gcagtatgct tcactgatcc agaattagca 1080

tctgttggtt acactaagaa acaagctgaa gaagctggaa tgactgtaac tgtatctaag 1140

ttcccattcg ctgctaacgg tcgtgcatta tcattaaaca gcactgacgg tttcttacaa 1200

cttgtaacac gtaaagaaga tggtcttctt gtaggtgctc aagttgcagg tgcaggcgct 1260

tctgatatta tttctgagat tggtttagct atcgaagctg gaatgacagc agaagatatc 1320

gctcaaacaa tccacgctca cccaacatta ggtgaaatca caatggaagc agctgaagtt 1380

gctcttggaa tgccaattca cattgtaaaa taa 1413

<210> 190

<211> 470

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 190

Met Val Val Gly Asp Phe Pro Ile Glu Leu Asp Thr Val Val Val Gly
1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly
20 25 30

Gln Lys Val Ala Ile Ile Glu Lys Ala Asn Leu Gly Gly Val Cys Leu
35 40 45

Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Ile Asn Ala Gly His Arg

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

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

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

Ala Lys Gly Val Glu Glu Thr Glu Thr Gly Val Lys Val Ser Phe Glu
                245                 250                 255
Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Val Glu Ala Asp Tyr Val Leu Val Thr
            260                 265                 270
Val Gly Arg Arg Pro Asn Thr Gln Glu Ile Gly Leu Glu Gln Val Gly
        275                 280                 285
Val Lys Met Thr Asp Arg Gly Ile Ile Glu Ile Asp Glu Gln Cys Arg
    290                 295                 300
```

Thr Asn Val Pro Asn Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Val Pro Gly Pro
305 310 315 320
Pro Leu Ala His Lys Ala Ser Tyr Glu Gly Lys Val Ala Val Glu Ala
325 330 335
Ile Ser Gly His Ala Ser Ala Ile Asp Tyr Ile Gly Ile Pro Ala Val
340 345 350
Cys Phe Thr Asp Pro Glu Leu Ala Ser Val Gly Tyr Thr Lys Lys Gln
355 360 365

Ala Glu Glu Ala Gly Met Thr Val Thr Val Ser Lys Phe Pro Phe Ala
370 375 380
Ala Asn Gly Arg Ala Leu Ser Leu Asn Ser Thr Asp Gly Phe Leu Gln
385 390 395 400
Leu Val Thr Arg Lys Glu Asp Gly Leu Leu Val Gly Ala Gln Val Ala
405 410 415
Gly Ala Gly Ala Ser Asp Ile Ile Ser Glu Ile Gly Leu Ala Ile Glu
420 425 430

Ala Gly Met Thr Ala Glu Asp Ile Ala Gln Thr Ile His Ala His Pro
435 440 445
Thr Leu Gly Glu Ile Thr Met Glu Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Met
450 455 460
Pro Ile His Ile Val Lys
465 470

<210> 191
<211> 375
<212> DNA
<213> Brucella
<400> 191

atggctgatc tcgcaaagat cgttgaagac ctttcggccc tgaccgttct ggaagccgct 60
gagctgtcca agcttctcga agagaagtgg ggcgtttcgg ctgctgctcc ggtcgctgtt 120

gctgctgccg gtggcgctgc ccctgctgct gccgcagaag aaaagaccga attcgacgtc 180
gttctcgctg acggcggcgc taacaagatc aacgtgatca aggaagtgcg cgcactcacc 240
ggtctcggcc tcaaggaagc caaggacctg gtcgaaggcg ctccgaaggc tgtcaaggaa 300

ggcgcctcga aggacgaagc tgagaagatc aaggcacagc tcgaagctgc tggcgccaag 360

gttgaactca agtaa 375

<210> 192

<211> 124

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 192

Met Ala Asp Leu Ala Lys Ile Val Glu Asp Leu Ser Ala Leu Thr Val
1 5 10 15

Leu Glu Ala Ala Glu Leu Ser Lys Leu Leu Glu Glu Lys Trp Gly Val
20 25 30

Ser Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Pro
35 40 45

Ala Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Asp
50 55 60

Gly Gly Ala Asn Lys Ile Asn Val Ile Lys Glu Val Arg Ala Leu Thr
65 70 75 80

Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Gly Ala Pro Lys
85 90 95

Ala Val Lys Glu Gly Ala Ser Lys Asp Glu Ala Glu Lys Ile Lys Ala
100 105 110

Gln Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Leu Lys
115 120

<210> 193

<211> 570

<212> DNA

<213> Brucella

<400> 193

atggaagtca ttcttctgga acgcattggc cgcctcggcc agatgggcga caccgtcaag 60

gtcaaggacg gctatgcccg caacttcctg ctgccgcagg gcaaggctct tcgtgccaac 120

gaagccaaca agaagaagtt tgaaggccag cgcgcacagc ttgaagccca gaacctggaa 180

cgcaagaacg aagcccaggc tgttgccgac aagctcaatg gcgaaagctt catcgtcgtg 240

cgttcggcag gtgaaaccgg ccagctctac ggttccgttt cgacccgcga catcgccgaa 300

atcatcacgg ccaacggctt cacgctgcac cgcaaccagg ttgagctgaa ccacccgatc 360

aagacgatcg gcctgcacga agtttcggtt tcgctgcacc cggaagtcca ggtcaaggtc 420

atggtcaaca tcgcgcgctc gaccgaagaa gccgaatgtc aggccaaggg tgaagacctc 480

acctcgatcg aagccatcta cggcatcgaa gagcagccgc tttcggaaga agtcttcgac 540

gacgaagacg aagctgaaga tcaggcttga 570

<210> 194

<211> 189

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 194

Met Glu Val Ile Leu Leu Glu Arg Ile Gly Arg Leu Gly Gln Met Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Lys Val Lys Asp Gly Tyr Ala Arg Asn Phe Leu Leu Pro
20 25 30

Gln Gly Lys Ala Leu Arg Ala Asn Glu Ala Asn Lys Lys Lys Phe Glu
35 40 45

Gly Gln Arg Ala Gln Leu Glu Ala Gln Asn Leu Glu Arg Lys Asn Glu
50 55 60

Ala Gln Ala Val Ala Asp Lys Leu Asn Gly Glu Ser Phe Ile Val Val
65 70 75 80

Arg Ser Ala Gly Glu Thr Gly Gln Leu Tyr Gly Ser Val Ser Thr Arg
85 90 95

Asp Ile Ala Glu Ile Ile Thr Ala Asn Gly Phe Thr Leu His Arg Asn
100 105 110

Gln Val Glu Leu Asn His Pro Ile Lys Thr Ile Gly Leu His Glu Val
115 120 125

Ser Val Ser Leu His Pro Glu Val Gln Val Lys Val Met Val Asn Ile
130 135 140

Ala Arg Ser Thr Glu Glu Ala Glu Cys Gln Ala Lys Gly Glu Asp Leu
145 150 155 160

Thr Ser Ile Glu Ala Ile Tyr Gly Ile Glu Glu Gln Pro Leu Ser Glu

165 170 175

Glu Val Phe Asp Asp Glu Asp Glu Ala Glu Asp Gln Ala

180 185

<210> 195

<211> 642

<212> DNA

<213> Brucella

<400> 195

atgcgcactc ttaagtctct cgtaatcgtc tcggctgcgt tgctgccgtt ctctgcgacc 60

gcttttgctg ccgacgccat ccaggaacag cctccggttc cggctccggt tgaagtagct 120

ccccagtata gctgggctgg tggctatacc ggtctttacc ttggctacgg ctggaacaag 180

gccaagacca gcaccgttgg cagcatcaag cctgacgatt ggaaggctgg cgcctttgct 240

ggctggaact tccagcagga ccagatcgta tacggtgttg aaggtgatgc aggttattcc 300

tgggccaaga agtccaagga cggcctggaa gtcaagcagg gctttgaagg ctcgctgcgt 360

gcccgcgttg gctacgacct gaacccggtt atgccgtacc tcacggctgg tattgccggt 420

tcgcagatca agcttaacaa cggcttggac gacgaaagca agttccgcgt gggttggacg 480

gctggtgccg gtctcgaagc caagctgacg gacaacatcc tcggccgcgt tgagtaccgt 540

tacacccagt acggcaacaa gaactatgat ctggccggta cgactgttcg caacaagctg 600

gacacgcagg atttccgcgt cggcatcggc tacaagttct aa 642

<210> 196

<211> 213

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 196

Met Arg Thr Leu Lys Ser Leu Val Ile Val Ser Ala Ala Leu Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Pro Ala Pro Val Glu Val Ala Pro Gln Tyr Ser Trp Ala Gly Gly

35 40 45

Tyr Thr Gly Leu Tyr Leu Gly Tyr Gly Trp Asn Lys Ala Lys Thr Ser

50 55 60

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

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

Gly Thr Thr Val Arg Asn Lys Leu Asp Thr Gln Asp Phe Arg Val Gly
195 200 205
Ile Gly Tyr Lys Phe
210

<210> 197
<211> 786
<212> DNA
<213> Brucella
<400> 197
atgtttagct taaaagggac tgttatgaaa accgcacttc ttgcatccgt cgcaatgttg 60
ttcacaagct cggctatggc tgccgacatc atcgttgctg aaccggcacc cgttgcagtc 120
gacacgttct cttggactgg cggctatatt ggtatcaatg ctggttacgc tggcggcaag 180
ttcaagcatc cgttctcagg catcgagcag gatggggccc aagatttttc aggttcgctc 240

gacgtcacgg ccagcggctt tgttggcggc gttcaggccg gttataactg gcagcttgcc 300

aacggcctcg tgcttggtgg cgaagctgac ttccagggct cgacggttaa gagcaagctt 360

gttgacaacg gtgacctctc cgatatcggc gttgcaggca acctcagcgg cgacgaaagc 420

ttcgtcctcg agaccaaggt tcagtggttt ggaacggtgc gtgcgcgcct cggcttcacc 480

ccgactgaac gcctgatggt ctatggtacc ggtggtttgg cctatggtaa ggtcaagacg 540

tcgcttagcg cctatgacga tggtgaatcg ttcagcgccg gaaactctaa gaccaaggct 600

ggctggacgc ttggtgcagg tgtagaatac gccgtcacca acaattggac cctgaagtcg 660

gaatacctct acaccgacct cggcaagcgt tccttcaatt acattgatga agaaaacgtc 720

aatattaaca tggaaaacaa ggtgaacttc cacaccgtcc gcctcggtct gaactacaag 780

ttctaa 786

<210> 198

<211> 261

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 198

Met Phe Ser Leu Lys Gly Thr Val Met Lys Thr Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Val Ala Met Leu Phe Thr Ser Ser Ala Met Ala Ala Asp Ile Ile Val
20 25 30

Ala Glu Pro Ala Pro Val Ala Val Asp Thr Phe Ser Trp Thr Gly Gly
35 40 45

Tyr Ile Gly Ile Asn Ala Gly Tyr Ala Gly Gly Lys Phe Lys His Pro
50 55 60

Phe Ser Gly Ile Glu Gln Asp Gly Ala Gln Asp Phe Ser Gly Ser Leu
65 70 75 80

Asp Val Thr Ala Ser Gly Phe Val Gly Gly Val Gln Ala Gly Tyr Asn
85 90 95

Trp Gln Leu Ala Asn Gly Leu Val Leu Gly Gly Glu Ala Asp Phe Gln
100 105 110

Gly Ser Thr Val Lys Ser Lys Leu Val Asp Asn Gly Asp Leu Ser Asp
115 120 125

Ile Gly Val Ala Gly Asn Leu Ser Gly Asp Glu Ser Phe Val Leu Glu
130 135 140

Thr Lys Val Gln Trp Phe Gly Thr Val Arg Ala Arg Leu Gly Phe Thr
145 150 155 160

Pro Thr Glu Arg Leu Met Val Tyr Gly Thr Gly Gly Leu Ala Tyr Gly
165 170 175
Lys Val Lys Thr Ser Leu Ser Ala Tyr Asp Asp Gly Glu Ser Phe Ser
180 185 190
Ala Gly Asn Ser Lys Thr Lys Ala Gly Trp Thr Leu Gly Ala Gly Val
195 200 205
Glu Tyr Ala Val Thr Asn Asn Trp Thr Leu Lys Ser Glu Tyr Leu Tyr
210 215 220

Thr Asp Leu Gly Lys Arg Ser Phe Asn Tyr Ile Asp Glu Glu Asn Val
225 230 235 240
Asn Ile Asn Met Glu Asn Lys Val Asn Phe His Thr Val Arg Leu Gly
245 250 255
Leu Asn Tyr Lys Phe
260

<210> 199
<211> 1128
<212> DNA
<213> Brucella
<400> 199
atgcccagac ccatttttaa ctttgactgg aggtcagaaa tgaacatcaa gagccttctc 60
cttggctccg ctgcagctct ggttgcagct tccggcgctc aggctgccga cgcaatcgtc 120

gcgccagagc ccgaagccgt tgaatatgtc cgcgtttgcg acgcttacgg cgctggctac 180
ttctacattc cgggcaccga aatctgcctg cgcgtccatg gttacgtccg ttacgacgta 240
aagggcggcg atgacgttta ctccggtacc gaccgcaatg gctgggacaa gggcgctcgt 300
ttcgcactcc gcgtttccac cggttcggaa accgaactcg gcaccctcaa gaccttcacc 360
gaactgcgct tcaactatgc tgcgaacaat tcgggcgtag atggtaaata tggtaatgaa 420
accagcagcg gcaccgtcat ggagttcgcg tatatccagc tcggtggtct gcgcgttggt 480
atcgatgaat cggaattcca taccttcacc ggttacctcg gcgatgtcat caacgatgac 540

gtgatctcgg ctggctccta ccgcaccggc aagatctcgt acaccttcac tggcggaaac 600

ggcttctcgg ctgtgatcgc tctcgaacag ggtggcgaca acgacggtgg ttacactggc 660

acgaccaact accacatcga cggctacatg cctgacgttg ttggcggcct gaagtatgct 720

ggcggctggg gttcgatcgc tggtgttgtt gcctatgact cggtcatcga agaatgggct 780

gccaaggttc gtggcgacgt caacatcacc gaccagttct cggtttggtt gcagggcgca 840

tattcgtccg ctgctacgcc ggatcagaac tacggccagt ggggcggcga ttgggctgtc 900

tggggtggtc tgaagtatca ggctacgcag aaggctgcct tcaacctgca ggctgcgcat 960

gacgactggg gcaagacggc agttacggct aacgttgctt acgaactggt tcctggcttc 1020

accgttacgc cggaagtttc ctacaccaag tttggtggcg agtggaagaa cactgttgct 1080

gaagacaatg cttggggcgg tatcgttcgc ttccagcgtt cgttctaa 1128

<210> 200

<211> 375

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 200

Met Pro Arg Pro Ile Phe Asn Phe Asp Trp Arg Ser Glu Met Asn Ile
1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu Leu Gly Ser Ala Ala Ala Leu Val Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Ala Gln Ala Ala Asp Ala Ile Val Ala Pro Glu Pro Glu Ala Val Glu
35 40 45

Tyr Val Arg Val Cys Asp Ala Tyr Gly Ala Gly Tyr Phe Tyr Ile Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Ile Cys Leu Arg Val His Gly Tyr Val Arg Tyr Asp Val
65 70 75 80

Lys Gly Gly Asp Asp Val Tyr Ser Gly Thr Asp Arg Asn Gly Trp Asp
85 90 95

Lys Gly Ala Arg Phe Ala Leu Arg Val Ser Thr Gly Ser Glu Thr Glu
100 105 110

Leu Gly Thr Leu Lys Thr Phe Thr Glu Leu Arg Phe Asn Tyr Ala Ala
115 120 125

Asn Asn Ser Gly Val Asp Gly Lys Tyr Gly Asn Glu Thr Ser Ser Gly
130 135 140

Thr Val Met Glu Phe Ala Tyr Ile Gln Leu Gly Gly Leu Arg Val Gly
145 150 155 160

Ile Asp Glu Ser Glu Phe His Thr Phe Thr Gly Tyr Leu Gly Asp Val
165 170 175
Ile Asn Asp Asp Val Ile Ser Ala Gly Ser Tyr Arg Thr Gly Lys Ile
180 185 190
Ser Tyr Thr Phe Thr Gly Gly Asn Gly Phe Ser Ala Val Ile Ala Leu
195 200 205
Glu Gln Gly Gly Asp Asn Asp Gly Gly Tyr Thr Gly Thr Thr Asn Tyr
210 215 220

His Ile Asp Gly Tyr Met Pro Asp Val Val Gly Gly Leu Lys Tyr Ala
225 230 235 240
Gly Gly Trp Gly Ser Ile Ala Gly Val Val Ala Tyr Asp Ser Val Ile
245 250 255
Glu Glu Trp Ala Ala Lys Val Arg Gly Asp Val Asn Ile Thr Asp Gln
260 265 270
Phe Ser Val Trp Leu Gln Gly Ala Tyr Ser Ser Ala Ala Thr Pro Asp
275 280 285

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

Gly Glu Trp Lys Asn Thr Val Ala Glu Asp Asn Ala Trp Gly Gly Ile
355 360 365
Val Arg Phe Gln Arg Ser Phe
370 375
<210> 201

<211> 786

<212> DNA

<213> Brucella

<400> 201

atgtttagct taaaagggac tgttatgaaa accgcacttc ttgcatccgt cgcaatgttg 60

ttcacaagct cggctatggc tgccgacatc atcgttgctg aaccggcacc cgttgcagtc 120

gacacgttct cttggactgg cggctatatt ggtatcaatg ctggttacgc tggcggcaag 180

ttcaagcatc cgttctcagg catcgagcag gatggggccc aagatttttc aggttcgctc 240

gacgtcacgg ccagcggctt tgttggcggc gttcaggccg gttataactg gcagcttgcc 300

aacggcctcg tgcttggtgg cgaagctgac ttccagggct cgacggttaa gagcaagctt 360

gttgacaacg gtgacctctc cgatatcggc gttgcaggca acctcagcgg cgacgaaagc 420

ttcgtcctcg agaccaaggt tcagtggttt ggaacggtgc gtgcgcgcct cggcttcacc 480

ccgactgaac gcctgatggt ctatggtacc ggtggtttgg cctatggtaa ggtcaagacg 540

tcgcttagcg cctatgacga tggtgaatcg ttcagcgccg gaaactctaa gaccaaggct 600

ggctggacgc ttggtgcagg tgtagaatac gccgtcacca acaattggac cctgaagtcg 660

gaatacctct acaccgacct cggcaagcgt tccttcaatt acattgatga agaaaacgtc 720

aatattaaca tggaaaacaa ggtgaacttc cacaccgtcc gcctcggtct gaactacaag 780

ttctaa 786

<210> 202

<211> 261

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 202

Met Phe Ser Leu Lys Gly Thr Val Met Lys Thr Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Val Ala Met Leu Phe Thr Ser Ser Ala Met Ala Ala Asp Ile Ile Val
20 25 30

Ala Glu Pro Ala Pro Val Ala Val Asp Thr Phe Ser Trp Thr Gly Gly
35 40 45

Tyr Ile Gly Ile Asn Ala Gly Tyr Ala Gly Gly Lys Phe Lys His Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Gln Leu Ala Asn Gly Leu Val Leu Gly Gly Glu Ala Asp Phe Gln

100 105 110

Gly Ser Thr Val Lys Ser Lys Leu Val Asp Asn Gly Asp Leu Ser Asp

115 120 125

Ile Gly Val Ala Gly Asn Leu Ser Gly Asp Glu Ser Phe Val Leu Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Thr Glu Arg Leu Met Val Tyr Gly Thr Gly Gly Leu Ala Tyr Gly

165 170 175

Lys Val Lys Thr Ser Leu Ser Ala Tyr Asp Asp Gly Glu Ser Phe Ser

180 185 190

Ala Gly Asn Ser Lys Thr Lys Ala Gly Trp Thr Leu Gly Ala Gly Val

195 200 205

Glu Tyr Ala Val Thr Asn Asn Trp Thr Leu Lys Ser Glu Tyr Leu Tyr

210 215 220

Thr Asp Leu Gly Lys Arg Ser Phe Asn Tyr Ile Asp Glu Glu Asn Val

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Asn Tyr Lys Phe

260

<210> 203

<211> 522

<212> DNA

<213> Brucella

<400> 203

atgaagtcct tatttattgc atcgacaatg gtgcttatgg cttttccggc tttcgcagaa 60

agcacgacgg taaaaatgta tgaggcgctg ccgaccggac cgggtaaaga agttggcacc 120

gtggtcattt ccgaagcccc gggcgggctg cacttcaagg tgaatatgga aaagctgacg 180
ccgggctatc atggctttca tgttcacgaa aatccaagct gcgctccggg agaaaaagac 240
ggcaagatcg taccggctct tgctgccggc gggcattatg atccgggtaa tacccatcac 300
catttagggc ctgaaggtga tggacatatg ggcgatttgc cacgcctgag cgccaatgct 360
gacggcaagg tgagtgaaac cgttgtcgct ccacatctca agaaattggc ggaaatcaag 420
cagcgttctt tgatggtcca tgtcggaggg gataattatt ccgataagcc tgagccgctt 480
ggtggcggtg gtgcccgttt tgcctgcggc gtgatcgaat aa 522

<210> 204
<211> 173
<212> PRT
<213> Brucella
<400> 204

Met Lys Ser Leu Phe Ile Ala Ser Thr Met Val Leu Met Ala Phe Pro
1 5 10 15
Ala Phe Ala Glu Ser Thr Thr Val Lys Met Tyr Glu Ala Leu Pro Thr
20 25 30
Gly Pro Gly Lys Glu Val Gly Thr Val Val Ile Ser Glu Ala Pro Gly
35 40 45
Gly Leu His Phe Lys Val Asn Met Glu Lys Leu Thr Pro Gly Tyr His
50 55 60
Gly Phe His Val His Glu Asn Pro Ser Cys Ala Pro Gly Glu Lys Asp
65 70 75 80
Gly Lys Ile Val Pro Ala Leu Ala Ala Gly Gly His Tyr Asp Pro Gly
85 90 95
Asn Thr His His His Leu Gly Pro Glu Gly Asp Gly His Met Gly Asp
100 105 110
Leu Pro Arg Leu Ser Ala Asn Ala Asp Gly Lys Val Ser Glu Thr Val
115 120 125
Val Ala Pro His Leu Lys Lys Leu Ala Glu Ile Lys Gln Arg Ser Leu
130 135 140

Met Val His Val Gly Gly Asp Asn Tyr Ser Asp Lys Pro Glu Pro Leu

145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ala Arg Phe Ala Cys Gly Val Ile Glu

165 170

<210> 205

<211> 1731

<212> DNA

<213> Brucella

<400> 205

atggctattc cggatgcacc aggagtatac atgtctcaat ccaaccctac ccgcgcagat 60

ttcgagtccc tgctggcaga atcctttgcg gaacatgatc ttgctgaagg ctatgtcgtc 120

aagggccgca tcgtcgccat cgaaaaggac atggcgatca tcgacgccgg tctgaaggtc 180

gaaggtcgcg tgccgttgaa ggaatttggc gcaaagggca aagacggcac gctgaagccg 240

ggcgacgaag tggaagttta cgtcgagcgt atcgaaaacg ctctgggcga agctgtcctg 300

tcgcgcgaaa aagcacgccg cgaagaaagc tgggtcaagc tcgagcagaa gtttgccaat 360

ggcgagcgcg tcgatggtgt catcttcaat caggtcaagg gtggtttcac cgtcgacctc 420

gatggtgctg ttgccttcct gccgcgcagc caggtcgata tccgtccgat ccgcgacgtc 480

accccactca tgcacgtccc gcaaccgttt gaaatcctca agatggacaa gcgccgcggc 540

aacatcgttg tctcgcgccg taccgttctt gaagaaagcc gtgcggaaca gcgttcggaa 600

atcgtccaga accttgaaga aggtcaggtc gttgaaggcg tcgtcaagaa catcaccgat 660

tacggtgcgt tcgtcgacct cggcggcatt gacggtctcc tgcacgtgac cgacatggca 720

tggcgccgcg tcaaccatcc gtcggaaatc ctcaccatcg gccagacggt caaggtgcag 780

atcatccgca tcaaccagga aacccatcgt atctcgctcg gcatgaagca gcttgagagc 840

gatccttggg atggtatcgg cgcgaagtac ccgatcggca aaaagatcac cggcaccgtc 900

acgaacatca ccgattacgg tgcgttcgtc gaaatcgagc cgggcatcga aggcctcatc 960

cacgtttccg aaatgtcgtg gaccaagaag aatgtccatc cgggcaagat tctgtccacc 1020

acgcaggaag tcgaagtcgt tgtgctcgaa gttgatccgg tcaagcgccg tatctcgctc 1080

ggcctcaagc agaccctcga caatccgtgg acgacctttg cccagaagta ccctgtcggt 1140

accgtcgttg aaggcgaagt caagaacaag accgaattcg gcctgttcat cggcctcgac 1200

ggcgacgttg acggcatggt tcacctctcc gacctcgact ggaaccgtcc gggcgaacag 1260

gtcatcgaag agtacaacaa gggtgaagtg gtcaaggctg tcgttctcga cgttgatgtc 1320

gagaaggaac gcatctcgct cggcatcaag cagctttccg gcgacaaggt cggcgaagca 1380

gcagcttccg gcgaactgcg caagaatgcc gtcgtcacct gcgaagtgac cgccgttacc 1440

gatggtggcc ttgaggtccg tctggtcgat cacgacctcg acagcttcat ccgccgttcg 1500

gatctgtcgc gtgaccgcga cgaacagcgt ccggaacgct tcacggtcgg tcagaaggtt 1560

gacgcccgcg tcatcgcctt cgacaagaag acccgcaagt tgcaggtctc gatcaaggcg 1620

ctcgaaatcg ctgaagaaaa ggaagcagtc gctcagtacg gttcgtccga ctccggcgct 1680

tcgctcggcg acattctcgg cgctgccctg aagaagcagg aaaagaactg a 1731

<210> 206

<211> 576

<212> PRT

<213> Brucella

<400> 206

Met Ala Ile Pro Asp Ala Pro Gly Val Tyr Met Ser Gln Ser Asn Pro

1 5 10 15

Thr Arg Ala Asp Phe Glu Ser Leu Leu Ala Glu Ser Phe Ala Glu His

20 25 30

Asp Leu Ala Glu Gly Tyr Val Val Lys Gly Arg Ile Val Ala Ile Glu

35 40 45

Lys Asp Met Ala Ile Ile Asp Ala Gly Leu Lys Val Glu Gly Arg Val

50 55 60

Pro Leu Lys Glu Phe Gly Ala Lys Gly Lys Asp Gly Thr Leu Lys Pro

65 70 75 80

Gly Asp Glu Val Glu Val Tyr Val Glu Arg Ile Glu Asn Ala Leu Gly

85 90 95

Glu Ala Val Leu Ser Arg Glu Lys Ala Arg Arg Glu Glu Ser Trp Val

100 105 110

Lys Leu Glu Gln Lys Phe Ala Asn Gly Glu Arg Val Asp Gly Val Ile

115 120 125

Phe Asn Gln Val Lys Gly Gly Phe Thr Val Asp Leu Asp Gly Ala Val

130 135 140

Ala Phe Leu Pro Arg Ser Gln Val Asp Ile Arg Pro Ile Arg Asp Val

145 150 155 160

Thr Pro Leu Met His Val Pro Gln Pro Phe Glu Ile Leu Lys Met Asp
165 170 175
Lys Arg Arg Gly Asn Ile Val Val Ser Arg Arg Thr Val Leu Glu Glu

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

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

305 310 315 320
His Val Ser Glu Met Ser Trp Thr Lys Lys Asn Val His Pro Gly Lys
325 330 335
Ile Leu Ser Thr Thr Gln Glu Val Glu Val Val Val Leu Glu Val Asp
340 345 350
Pro Val Lys Arg Arg Ile Ser Leu Gly Leu Lys Gln Thr Leu Asp Asn
355 360 365
Pro Trp Thr Thr Phe Ala Gln Lys Tyr Pro Val Gly Thr Val Val Glu

370 375 380
Gly Glu Val Lys Asn Lys Thr Glu Phe Gly Leu Phe Ile Gly Leu Asp
385 390 395 400
Gly Asp Val Asp Gly Met Val His Leu Ser Asp Leu Asp Trp Asn Arg

405 410 415

Pro Gly Glu Gln Val Ile Glu Glu Tyr Asn Lys Gly Glu Val Val Lys

420 425 430

Ala Val Val Leu Asp Val Asp Val Glu Lys Glu Arg Ile Ser Leu Gly

435 440 445

Ile Lys Gln Leu Ser Gly Asp Lys Val Gly Glu Ala Ala Ala Ser Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

Asp Gly Gly Leu Glu Val Arg Leu Val Asp His Asp Leu Asp Ser Phe

485 490 495

Ile Arg Arg Ser Asp Leu Ser Arg Asp Arg Asp Glu Gln Arg Pro Glu

500 505 510

Arg Phe Thr Val Gly Gln Lys Val Asp Ala Arg Val Ile Ala Phe Asp

515 520 525

Lys Lys Thr Arg Lys Leu Gln Val Ser Ile Lys Ala Leu Glu Ile Ala

530 535 540

Glu Glu Lys Glu Ala Val Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Asp Ser Gly Ala

545 550 555 560

Ser Leu Gly Asp Ile Leu Gly Ala Ala Leu Lys Lys Gln Glu Lys Asn

565 570 575

<210> 207

<211> 1017

<212> DNA

<213> Avian influenza virus

<400> 207

ataatggaga aaattgtact gctgttcgcg attgttagcc tggtgaagtc cgatcagatc 60

tgcatcggtt atcatgctaa caacagcacc gaacaagttg ataccatcat ggagaaaaac 120

gtaaccgtca cccacgctca ggacatcctg gaaaaaaagc acaacggtaa actgtgcgat 180

ctggatggtg tgaaaccgct gatcctgcgt gactgctccg tagcaggttg gctgctgggt 240

aacccgatgt gcgacgagtt catcaacgtt ccagaatggt cctacattgt cgaaaaagct 300

aacccggtta acgacctgtg ttatccgggt gatttcaacg attatgaaga actgaagcac 360

ctgctgtctc gcatcaacca ctttgaaaag atccagatta tcccaaaatc ctcttggtct 420

tcccacgaag cgtctctggg tgtgagcagc gcttgtccgt accagggtaa atcctctttc 480

ttccgtaacg ttgtttggct gatcaagaaa aattctacct acccaaccat caaacgttct 540

tacaacaaca ccaatcagga ggatctgctg gttctgtggg gtatccacca cccgaacgac 600

gcagcagaac agactaagct gtaccagaac ccgaccacct acatcagcgt tggcacttct 660

actctgaacc agcgtctggt gccgcgcatc gcgacccgtt ctaaggtaaa tggtcagtct 720

ggtcgtatgg aatttttctg gaccatcctg aaaccgaacg acgcgatcaa ctttgagtcc 780

aacggtaact tcatcgctcc agaatacgcg tacaaaatcg ttaaaaaggg cgattctact 840

attatgaagt ctgaactgga atacggtaac tgcaatacta aatgccagac gccgatgggt 900

gctattaaca gcagcatgcc atttcacaac attcaccctc tgactatcgg cgagtgcccg 960

aaatacgtaa aaagcaaccg tctggttctg gcgaccggcc tgcgtaactc tccgata 1017

<210> 208

<211> 339

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 208

Ile Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys

1 5 10 15

Ser Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln

20 25 30

Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp

35 40 45

Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val

50 55 60

Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly

65 70 75 80

Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile

85 90 95

Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe

100 105 110

Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe

115 120 125

Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala

130 135 140

Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe

145 150 155 160

Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr

165 170 175

Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu

180 185 190

Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser

225 230 235 240

Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile

245 250 255

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

260 265 270

Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr

275 280 285

Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser

290 295 300

Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro

305 310 315 320

Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn

325 330 335

Ser Pro Ile

<210> 209

<211> 984

<212> DNA

<213> Avian influenza virus

<400> 209

atggtaccgg caccagcgat ggaaaaaaat gttaccgtta ctcatgctca agacattctg 60

gaaaaaaagc ataatggtaa agcgcctgct gacctggacg gtgtaaaacc actgattctg 120

cgtgattgtt ccgtagctgg cgctcctgct ccggttaacg atctgtgtta tccaggcgat 180

ttcaacgact acgaggaact ggcaccggcg attcagatca tcccgaaatc ttcctggtct 240

agccacgaag cgtccctggg cgtttcctcc gcttgccctt accaaggcaa aagctctgca 300

ccggcacgca acgttgtatg gctgatcaag aaaaactcca cctatccgac catcaaacgc 360

agctacaata acaccaacca ggaggacgct ccggctcacc atccgaatga cgccgcagaa 420

cagacgaagc tgtaccagaa cccgaccacc gctccagccg ttaaaaaggg tgacagcacg 480

attatgaaaa gcgagctgga atacggcaac tgcaacacta aatgccagac tccaatgggc 540

gctattaaca gctccatgcc gtttgctccg gccattcaaa tcattccaaa atctagctgg 600

tccgaccatg aagcatccag cggcgtgtcc tctgcctgcc catatcaggg caccccgagc 660

gcaccggctg ttccacgcat cgctacgcgt tctaaggtga acggtcagtc tggtcgtgct 720

ccggctgtta agaaaggcga tagcgccatt gttaagtctg aagtggaata cggtaactgt 780

aacactaagt gtcaaactcc tatcggtgcc atcaactctt ccatgccgtt cgcaccggca 840

ggtgttagca gcgcatgccc gtaccagggc cgcagctctg cgccggctgg tgttagctcc 900

gcttgtccgt atctgggttc tccgagcgca ccagcgggcg ttagctctgc ctgtccgtac 960

ctgggtcgtt ccagcgctcc ggca 984

<210> 210

<211> 328

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 210

Met Val Pro Ala Pro Ala Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala

1 5 10 15

Gln Asp Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Ala Pro Ala Asp Leu

20 25 30

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

35 40 45

Pro Ala Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr

50 55 60

Glu Glu Leu Ala Pro Ala Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser

65 70 75 80

Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly

85 90 95

Lys Ser Ser Ala Pro Ala Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn

100 105 110

Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu

115 120 125

Asp Ala Pro Ala His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu

130 135 140

Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Ala Pro Ala Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr

145 150 155 160

Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln

165 170 175

Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe Ala Pro Ala Ile

180 185 190

Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser Ser Gly

195 200 205

Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Ala Pro Ala Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ala Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu

245 250 255

Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn

260 265 270

Ser Ser Met Pro Phe Ala Pro Ala Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr

275 280 285

Gln Gly Arg Ser Ser Ala Pro Ala Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr

290 295 300

Leu Gly Ser Pro Ser Ala Pro Ala Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr
305 310 315 320
Leu Gly Arg Ser Ser Ala Pro Ala
325

<210> 211
<211> 1056
<212> DNA
<213> Avian influenza virus
<400> 211
atgtctctgc tgaccgaagt agaaactcca actcgtaatg aatgggaatg ccgctgctct 60
gactctagcg accctatcgt tgtggcggca aacattatcg gcatcctgca cctgattctg 120
tggattctgg accgcctgtt tttcaaatgt atctaccgcc gtctgaaata cggtctgaaa 180
cgcggtccgg ctacggcagg cgttccggag tctatgcgcg aagaataccg tcaggagcaa 240
cagtctgccg tggatgttga tgacggccac ttcgtaaaca ttgaactgga aggtggtatg 300
tccctgctga ctgaagtaga aacctatgtc ctgtccatca ttccgtctgg cccgctgaaa 360

gctgagattg ctcaaaaact ggaagacgtt ttcgctggta aaaataccga tctggaggct 420
ctgatggagt ggctgaaaac ccgcccgatc ctgtccccac tgaccaaagg tatcctgggt 480
ttcgttttca ccctgactgt accgtccgaa cgtggtctgc aacgccgtcg ctttgtgcaa 540
aacgctctga acggcaatgg tgacccgaac aatatggacc gtgctgtgaa actgtataaa 600
aagctgaagc gtgaaatcac cttccacggc gccaaagaag ttgctctgtc ctacagcacc 660
ggtgcactgg cttcctgcat gggtctgatc tacaaccgta tgggcactgt aacgacggaa 720
gttgccttcg gtctggtctg tgccacctgt gaacaaatcg cggattctca gcaccgctcc 780

caccgtcaga tggcgactat cactaacccg ctgattcgtc acgaaaaccg tatggttctg 840
gcgtccacta ccgcgaaagc aatggaacag atggctggtt cctccgaaca ggccgcagag 900
gctatggaaa tcgctaacca agctcgtcag atggttcagg ctatgcgcac tattggtacc 960
catccgaact cttccgccgg tctgcgtgat aacctgctgg aaaacctgca agcctaccag 1020
aaacgtatgg gtgtgcaaat gcagcgtttc aaataa 1056
<210> 212
<211> 351
<212> PRT
<213> Avian influenza virus
<400> 212

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro Ile Val Val Ala Ala Asn Ile

20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe

35 40 45

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

50 55 60

Thr Ala Gly Val Pro Glu Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Gln Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gly Gly Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser

100 105 110

Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu

115 120 125

Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp

130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg

165 170 175

Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met

180 185 190

Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe

195 200 205

His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala

210 215 220

Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu

225 230 235 240

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

245 250 255

Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile

260 265 270

Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met

275 280 285

Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Ile

290 295 300

Ala Asn Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr

305 310 315 320

His Pro Asn Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu

325 330 335

Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

340 345 350

<210> 213

<211> 1626

<212> DNA

<213> Norovirus

<400> 213

aaaatggctt ctaatgatgc tgctccttct actgatggtg ctgctggtct ggtgccagaa 60

tccaacaacg aagtcatggc cctggagccg gttgcgggtg cagcgctggc agcgccggta 120

accggtcaga ccaatatcat cgatccgtgg attcgtgcta atttcgtgca ggccccgaac 180

ggcgagttta ccgtgtcccc gcgtaacgca ccgggtgagg ttctgctgaa cctggaactg 240

ggcccggaac tgaacccgta tctggcacac ctggcgcgta tgtacaacgg ttatgccggt 300

ggtatggagg ttcaggttat gctggcaggt aacgcgttta ccgcgggcaa gctggtattt 360

gcggccgtgc ctcctcattt cccagtggag aacctgagcc cgcagcagat caccatgttc 420

ccacatgtga ttattgatgt tcgtactctg gaacctgtgc tgctgccgct gccggatgtt 480

cgcaacaatt tcttccacta taaccagaaa gacgacccga aaatgcgcat cgtcgctatg 540

ctgtatacgc cgctgcgttc caatggttct ggtgatgacg ttttcactgt aagctgccgt 600

gtactgactc gtccatctcc ggatttcgac tttacttacc tggtgccgcc gactgtagag 660

tctaaaacca aaccgttcac tctgccgatc ctgaccctgg gtgaactgtc taactctcgt 720

ttcccggtat ctatcgacca gatgtatacc tctcctaatg aagttatctc cgtccagtgc 780

cagaacggtc gctgcaccct ggacggtgaa ctgcaaggca ccacccaact gcaagtttcc 840

ggcatctgcg ctttcaaagg cgaagtaacc gctcacctgc aagataacga tcacctgtat 900

aacatcacga tcaccaacct gaacggcagc ccgttcgacc cgtctgagga cattccggcc 960

ccactgggtg taccggattt ccagggccgt gtgtttggtg ttatcaccca acgtgacaaa 1020

cagaacgcgg caggtcagag ccagccggcg aaccgtggtc atgacgcagt tgttcctact 1080

tacacggcgc agtacacccc aaaactgggc caggtacaaa tcggtacttg gcagactgat 1140

gatctgaagg ttaaccagcc agtgaaattc accccggttg gtctgaacga cactgagcac 1200

tttaaccagt gggttgtacc gcgttatgcg ggtgctctga atctgaacac caacctggcg 1260

cctagcgtgg ctccggtatt cccgggcgaa cgcctgctgt tctttcgttc ctacctgccg 1320

ctgaaaggtg gttatggtaa cccggctatt gattgcctgc tgccgcagga gtgggtgcag 1380

cacttctatc aggaggcggc tccgtccatg tctgaagttg cgctggttcg ttacatcaac 1440

ccggacaccg gccgtgcgct gttcgaagcg aaactgcacc gcgcaggctt catgaccgtg 1500

tcctctaata cttccgcacc ggttgttgta cctgccaatg gttacttccg cttcgattct 1560

tgggtaaacc agttttactc tctggcaccg atgggtactg gcaacggccg tcgccgtatc 1620

cagtaa 1626

<210> 214

<211> 541

<212> PRT

<213> Norovirus

<400> 214

Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Thr Asp Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Glu Ser Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val Ala
20 25 30

Gly Ala Ala Leu Ala Ala Pro Val Thr Gly Gln Thr Asn Ile Ile Asp
35 40 45

Pro Trp Ile Arg Ala Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe Thr
50 55 60

Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu Leu
65 70 75 80

Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr Asn

85 90 95

Gly Tyr Ala Gly Gly Met Glu Val Gln Val Met Leu Ala Gly Asn Ala
100 105 110
Phe Thr Ala Gly Lys Leu Val Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe Pro
115 120 125
Val Glu Asn Leu Ser Pro Gln Gln Ile Thr Met Phe Pro His Val Ile
130 135 140
Ile Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp Val
145 150 155 160

Arg Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Lys Asp Asp Pro Lys Met Arg
165 170 175
Ile Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly Asp
180 185 190
Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro Asp
195 200 205
Phe Asp Phe Thr Tyr Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr Lys
210 215 220

Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asn Ser Arg
225 230 235 240
Phe Pro Val Ser Ile Asp Gln Met Tyr Thr Ser Pro Asn Glu Val Ile
245 250 255
Ser Val Gln Cys Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Glu Leu Gln
260 265 270
Gly Thr Thr Gln Leu Gln Val Ser Gly Ile Cys Ala Phe Lys Gly Glu
275 280 285

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

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

Gly His Asp Ala Val Val Pro Thr Tyr Thr Ala Gln Tyr Thr Pro Lys
355 360 365

Leu Gly Gln Val Gln Ile Gly Thr Trp Gln Thr Asp Asp Leu Lys Val
370 375 380

Asn Gln Pro Val Lys Phe Thr Pro Val Gly Leu Asn Asp Thr Glu His
385 390 395 400

Phe Asn Gln Trp Val Val Pro Arg Tyr Ala Gly Ala Leu Asn Leu Asn
405 410 415

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

Leu Phe Phe Arg Ser Tyr Leu Pro Leu Lys Gly Gly Tyr Gly Asn Pro
435 440 445

Ala Ile Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr Gln
450 455 460

Glu Ala Ala Pro Ser Met Ser Glu Val Ala Leu Val Arg Tyr Ile Asn
465 470 475 480

Pro Asp Thr Gly Arg Ala Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Ala Gly
485 490 495

Phe Met Thr Val Ser Ser Asn Thr Ser Ala Pro Val Val Val Pro Ala
500 505 510

Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu
515 520 525

Ala Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg Arg Arg Ile Gln
530 535 540

<210>
215

<211> 1488

<212> DNA

<213> Salmonella

<400> 215

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60

tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120

gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt 180

ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240

gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct 300

aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360

aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420

gacaacaccc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480

aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgctga atgtgcaaca aaaatataag 540

gtcagcgata cggctgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc tttagacaat 600

agtactttta aagcctcggc tactggtctt ggtggtactg accagaaaat tgatggcgat 660

ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgccaaag ttaccgttac gggggggaact 720

ggtaaagatg gctattatga agtttccgtt gataagacga acggtgaggt gactcttgct 780

ggcggtgcga cttccccgct tacaggtgga ctacctgcga cagcaactga ggatgtgaaa 840

aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt 900

gttaccggca cagcatctgt tgttaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt 960

gatggtggtt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat 1020

ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca 1080

ctaaacaaac tgggtggcgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact 1140

tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg 1200

gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac 1260

acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg 1320

ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg 1380

accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgcag attctgcagc aggccggtac ctccgttctg 1440

gcgcaggcga accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa 1488

<210> 216

<211> 495

<212> PRT

<213> Salmonella

<400> 216

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln

35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala

50 55 60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly

65 70 75 80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu

130 135 140

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu

145 150 155 160

Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln

165 170 175

Gln Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala

180 185 190

Asp Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr

195 200 205

Gly Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp

210 215 220

Asp Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr

225 230 235 240

Gly Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu

245 250 255

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

260 265 270

Ala Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp

275 280 285

Leu Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr

290 295 300

Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile

305 310 315 320

Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr

325 330 335

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

340 345 350

Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp

355 360 365

Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser

370 375 380

Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala

385 390 395 400

Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu

405 410 415

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

420 425 430

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr

435 440 445

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser

450 455 460

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu

465 470 475 480

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg

485 490 495

<210> 217

<211> 498

<212> DNA

<213> Salmonella

<400> 217

atgcgtaaat cagcatctgc agtagcagtt cttgctttaa ttgcatgtgg cagtgcccac 60

gcagctggct ttgttggtaa caaagcagag gttcaggcag cggttactat tgcagctcag 120

aatacaacat cagccaactg gagtcaggat cctggcttta cagggcctgc tgttgctgct 180

ggtcagaaag ttggtactct cagcattact gctactggtc cacataactc agtatctatt 240

gcaggtaaag gggcttcggt atctggtggt gtagccactg tcccgttcgt tgatggacaa 300

ggacagcctg ttttccgtgg gcgtattcag ggagccaata ttaatgacca agcaaatact 360

ggaattgacg ggcttgcagg ttggcgagtt gccagctctc aagaaacgct aaatgtccct 420

gtcacaacct ttggtaaatc gaccctgcca gcagggactt tcactgcgac cttctacgtt 480

cagcagtatc aaaactaa 498

<210> 218

<211> 165

<212> PRT

<213> Salmonella

<400> 218

Met Arg Lys Ser Ala Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Leu Ile Ala Cys
1 5 10 15

Gly Ser Ala His Ala Ala Gly Phe Val Gly Asn Lys Ala Glu Val Gln
20 25 30

Ala Ala Val Thr Ile Ala Ala Gln Asn Thr Thr Ser Ala Asn Trp Ser
35 40 45

Gln Asp Pro Gly Phe Thr Gly Pro Ala Val Ala Ala Gly Gln Lys Val
50 55 60

Gly Thr Leu Ser Ile Thr Ala Thr Gly Pro His Asn Ser Val Ser Ile
65 70 75 80

Ala Gly Lys Gly Ala Ser Val Ser Gly Gly Val Ala Thr Val Pro Phe
85 90 95

Val Asp Gly Gln Gly Gln Pro Val Phe Arg Gly Arg Ile Gln Gly Ala
100 105 110

Asn Ile Asn Asp Gln Ala Asn Thr Gly Ile Asp Gly Leu Ala Gly Trp

115 120 125

Arg Val Ala Ser Ser Gln Glu Thr Leu Asn Val Pro Val Thr Thr Phe

130 135 140

Gly Lys Ser Thr Leu Pro Ala Gly Thr Phe Thr Ala Thr Phe Tyr Val

145 150 155 160

Gln Gln Tyr Gln Asn

165

<210> 219

<211> 543

<212> DNA

<213> Salmonella

<400> 219

atgacctcta ctattgcgag tctgatgttt gtcgctggcg cagcggttgc ggctgatcct 60

actccggtga gcgtgagtgg cggtactatt catttcgaag gtaaactggt taatgcagcc 120

tgtgccgtca gcactaaatc cgccgatcaa acggtgacgc tgggtcaata ccgtaccgcc 180

agctttacgg cgattggtaa tacgactgcg caggtgcctt tctccatcgt cctgaatgac 240

tgcgatccga aagtggcggc caacgctgcc gtggctttct ctggtcaggc agataacacc 300

aaccctaatt tgctggctgt ctcctctgcg gacaatagca ctaccgcaac cggcgtcggg 360

attgagattc ttgataatac ctcttcaccg ttgaagccgg acggcgcgac cttctcggcg 420

aagcagtcgc tggttgaagg caccaatacg ctgcgtttta ccgcacgcta taaggcaacc 480

gccgccgcca cgacgccagg ccaggctaat gccgacgcca cctttatcat gaaatacgaa 540

taa 543

<210> 220

<211> 180

<212> PRT

<213> Salmonella

<400> 220

Met Thr Ser Thr Ile Ala Ser Leu Met Phe Val Ala Gly Ala Ala Val

1 5 10 15

Ala Ala Asp Pro Thr Pro Val Ser Val Ser Gly Gly Thr Ile His Phe

20 25 30

Glu Gly Lys Leu Val Asn Ala Ala Cys Ala Val Ser Thr Lys Ser Ala

35 40 45

Asp Gln Thr Val Thr Leu Gly Gln Tyr Arg Thr Ala Ser Phe Thr Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asp Pro Lys Val Ala Ala Asn Ala Ala Val Ala Phe Ser Gly Gln

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Thr Ala Thr Gly Val Gly Ile Glu Ile Leu Asp Asn Thr Ser

115 120 125

Ser Pro Leu Lys Pro Asp Gly Ala Thr Phe Ser Ala Lys Gln Ser Leu

130 135 140

Val Glu Gly Thr Asn Thr Leu Arg Phe Thr Ala Arg Tyr Lys Ala Thr

145 150 155 160

Ala Ala Ala Thr Thr Pro Gly Gln Ala Asn Ala Asp Ala Thr Phe Ile

165 170 175

Met Lys Tyr Glu

180

<210> 221

<211> 243

<212> DNA

<213> Salmonella

<400> 221

atggcaacac cttggtcagg ctatctggat gacgtctcag caaaatttga tacgggcgtt 60

gataatctac aaacgcaggt aacagaggcg ctggataaat tagcagcaaa accctccgat 120

ccggcgctac tggcggcgta tcagagtaag ctctcggaat ataacttgta ccgtaacgcg 180

caatcgaaca cggtaaaagt ctttaaggat attgatgctg ccattattca gaacttccgt 240

taa 243

<210> 222

<211> 80

<212> PRT

<213> Salmonella

<400> 222

Met Ala Thr Pro Trp Ser Gly Tyr Leu Asp Asp Val Ser Ala Lys Phe
1 5 10 15

Asp Thr Gly Val Asp Asn Leu Gln Thr Gln Val Thr Glu Ala Leu Asp
20 25 30

Lys Leu Ala Ala Lys Pro Ser Asp Pro Ala Leu Leu Ala Ala Tyr Gln
35 40 45

Ser Lys Leu Ser Glu Tyr Asn Leu Tyr Arg Asn Ala Gln Ser Asn Thr

50 55 60

Val Lys Val Phe Lys Asp Ile Asp Ala Ala Ile Ile Gln Asn Phe Arg
65 70 75 80

<210> 223

<211> 1740

<212> DNA

<213> Shigella

<400> 223

cataatgtaa gcaccacaac cactggtttt cctcttgcca aaatattggc ttccactgag 60

cttggagaca atactatcca agctgcaaat gatgcagcta acaaattatt ttctcttaca 120

attgctgatc ttactgctaa ccaaaatatt aatacaacta atgcacactc aacttcaaat 180

atattaatcc ctgaacttaa agcaccaaag tcattaaatg caagttccca actaacgctt 240

ttaattggaa accttattca aatactcggt gaaaaatctt taactgcatt aacaaataaa 300

attactgctt ggaagtccca gcaacaggca agacagcaaa aaaacctaga attctccgat 360

aaaattaaca ctcttctatc tgaaactgaa ggactaacca gagactatga aaaacaaatt 420

aataaactaa aaaacgcaga ttctaaaata aaagacctag aaaataaaat taaccaaatt 480

caaacaagat tatccgaact cgacccagag tcaccagaaa agaaaaaatt aagccgggaa 540

gaaatacaac tcactatcaa aaaagacgca gcagttaaag acaggacatt gattgagcag 600

aaaaccctgt caattcatag caaacttaca gataaatcaa tgcaactcga aaaagaaata 660

gactcttttt ctgcatttc aaacacagca tctgctgaac agctatcaac ccagcagaaa 720

tcattaaccg gacttgccag tgttactcaa ttgatggcaa cctttattca actagttgga 780

aaaaataatg aagaatcttt aaaaaatgat ctggctctat tccagtctct ccaagaatca 840

agaaaaactg aaatggagag aaaatctgat gagtatgctg ctgaagtacg taaagcagaa 900

gaactcaaca gagtaatggg ttgtgttggg aaaatacttg gggcactttt aactatcgtt 960

agtgttgttg cagcagcttt ttctggagga gcctctctag cactggcagc tgttggttta 1020

gctcttatgg ttacggatgc tatagtacaa gcagcgaccg gcaattcctt catggaacaa 1080

gccctgaatc cgatcatgaa agcagtcatt gaacccttaa tcaaactcct ttcagatgca 1140

tttacaaaaa tgctcgaagg cttgggcgtc gactcgaaaa aagccaaaat gattggctct 1200

attctggggg caatcgcagg cgctcttgtc ctagttgcag cagtcgttct cgtagccact 1260

gttggtaaac aggcagcagc aaaacttgca gaaaatattg gcaaaataat aggtaaaacc 1320

ctcacagacc ttataccaaa gtttctcaag aatttttctt ctcaactgga cgatttaatc 1380

actaatgctg ttgccagatt aaataaattt cttggtgcag cgggtgatga agtaatatcc 1440

aaacaaatta tttccaccca tttaaaccaa gcagttttat taggagaaag tgttaactct 1500

gccacacaag cgggaggaag tgtcgcttct gctgttttcc agaacagcgc gtcgacaaat 1560

ctagcagacc tgacattatc gaaatatcaa gttgaacaac tgtcaaaata tatcagtgaa 1620

gcaatagaaa aattcggcca attgcaggaa gtaattgcag atctattagc ctcaatgtcc 1680

aactctcagg ctaatagaac tgatgttgca aaagcaattt tgcaacaaac tactgcttga 1740

<210> 224

<211> 579

<212> PRT

<213> Shigella

<400> 224

His Asn Val Ser Thr Thr Thr Thr Gly Phe Pro Leu Ala Lys Ile Leu

1 5 10 15

Ala Ser Thr Glu Leu Gly Asp Asn Thr Ile Gln Ala Ala Asn Asp Ala

20 25 30

Ala Asn Lys Leu Phe Ser Leu Thr Ile Ala Asp Leu Thr Ala Asn Gln

35 40 45

Asn Ile Asn Thr Thr Asn Ala His Ser Thr Ser Asn Ile Leu Ile Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Ile Gly Asn Leu Ile Gln Ile Leu Gly Glu Lys Ser Leu Thr Ala

85 90 95

Leu Thr Asn Lys Ile Thr Ala Trp Lys Ser Gln Gln Gln Ala Arg Gln

100 105 110

Gln Lys Asn Leu Glu Phe Ser Asp Lys Ile Asn Thr Leu Leu Ser Glu

115 120 125

Thr Glu Gly Leu Thr Arg Asp Tyr Glu Lys Gln Ile Asn Lys Leu Lys

130 135 140

Asn Ala Asp Ser Lys Ile Lys Asp Leu Glu Asn Lys Ile Asn Gln Ile

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Ser Arg Glu Glu Ile Gln Leu Thr Ile Lys Lys Asp Ala Ala Val

180 185 190

Lys Asp Arg Thr Leu Ile Glu Gln Lys Thr Leu Ser Ile His Ser Lys

195 200 205

Leu Thr Asp Lys Ser Met Gln Leu Glu Lys Glu Ile Asp Ser Phe Ser

210 215 220

Ala Phe Ser Asn Thr Ala Ser Ala Glu Gln Leu Ser Thr Gln Gln Lys

225 230 235 240

Ser Leu Thr Gly Leu Ala Ser Val Thr Gln Leu Met Ala Thr Phe Ile

245 250 255

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

260 265 270

Leu Phe Gln Ser Leu Gln Glu Ser Arg Lys Thr Glu Met Glu Arg Lys

275 280 285

Ser Asp Glu Tyr Ala Ala Glu Val Arg Lys Ala Glu Glu Leu Asn Arg

290 295 300

Val Met Gly Cys Val Gly Lys Ile Leu Gly Ala Leu Leu Thr Ile Val

305 310 315 320

Ser Val Val Ala Ala Ala Phe Ser Gly Gly Ala Ser Leu Ala Leu Ala

325 330 335

Ala Val Gly Leu Ala Leu Met Val Thr Asp Ala Ile Val Gln Ala Ala

340 345 350

Thr Gly Asn Ser Phe Met Glu Gln Ala Leu Asn Pro Ile Met Lys Ala

355 360 365

Val Ile Glu Pro Leu Ile Lys Leu Leu Ser Asp Ala Phe Thr Lys Met

370 375 380

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

385 390 395 400

Ile Leu Gly Ala Ile Ala Gly Ala Leu Val Leu Val Ala Ala Val Val

405 410 415

Leu Val Ala Thr Val Gly Lys Gln Ala Ala Ala Lys Leu Ala Glu Asn

420 425 430

Ile Gly Lys Ile Ile Gly Lys Thr Leu Thr Asp Leu Ile Pro Lys Phe

435 440 445

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

450 455 460

Ala Arg Leu Asn Lys Phe Leu Gly Ala Ala Gly Asp Glu Val Ile Ser

465 470 475 480

Lys Gln Ile Ile Ser Thr His Leu Asn Gln Ala Val Leu Leu Gly Glu

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Tyr Gln Val Glu Gln Leu Ser Lys Tyr Ile Ser Glu Ala Ile Glu Lys

530 535 540

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

545 550 555 560

Asn Ser Gln Ala Asn Arg Thr Asp Val Ala Lys Ala Ile Leu Gln Gln

565 570 575

Thr Thr Ala

<210> 225

<211> 1089

<212> DNA

<213> Shigella

<400> 225

gaaattcaaa acacaaaacc aacccagact ttatatacag atatatccac aaaacaaact 60

caaagttctt ccgaaacaca aaaatcacaa aattatcagc agattgcagc gcatattcca 120

cttaatgtcg gtaaaaatcc cgtattaaca accacattaa atgatgatca acttttaaag 180

ttatcagagc aggttcagca tgattcagaa atcattgctc gccttactga caaaaagatg 240

aaagatcttt cagagatgag tcacaccctt actccagaga acactctgga tatttccagt 300

ctttcttcta atgctgtttc tttaattatt agtgtagccg ttctactttc tgctctccgc 360

actgcagaaa ctaaattggg ctctcaattg tcattgattg cgttcgatgc tacaaaatca 420

gctgcagaga acattgttcg gcaaggcctg gcagccctat catcaagcat tactggagca 480

gtcacacaag taggtataac gggtatcggt gccaaaaaaa cgcattcagg gattagcgac 540

caaaaaggag ccttaagaaa gaaccttgcc actgctcaat ctcttgaaaa agagcttgca 600

ggttctaaat tagggttaaa taaacaaata gatacaaata tcacctcacc acaaactaac 660

tctagcacaa aatttttagg taaaaataaa ctggcgccag ataatatatc cctgtcaact 720

gaacataaaa cttctcttag ttctcccgat atttctttgc aggataaaat tgacacccag 780

agaagaactt acgagctcaa tacccttttct gcgcagcaaa aacaaaacat tggccgtgca 840

acaatggaaa catcagccgt tgctggtaat atatccacat caggagggcg ttatgcatct 900

gctcttgaag aagaagaaca actaatcagt caggccagca gtaaacaagc agaggaagca 960

tcccaagtat ctaaagaagc atcccaagcg acaaatcaat taatacaaaa attattgaat 1020

ataattgaca gcatcaacca atcaaagaat tcgacagcca gtcagattgc tggtaacatt 1080

cgagcttaa 1089

<210> 226

<211> 362

<212> PRT

<213> Shigella

<400> 226

Glu Ile Gln Asn Thr Lys Pro Thr Gln Thr Leu Tyr Thr Asp Ile Ser

1 5 10 15

Thr Lys Gln Thr Gln Ser Ser Ser Glu Thr Gln Lys Ser Gln Asn Tyr

20 25 30

Gln Gln Ile Ala Ala His Ile Pro Leu Asn Val Gly Lys Asn Pro Val

35 40 45

Leu Thr Thr Thr Leu Asn Asp Asp Gln Leu Leu Lys Leu Ser Glu Gln

50 55 60

Val Gln His Asp Ser Glu Ile Ile Ala Arg Leu Thr Asp Lys Lys Met

65 70 75 80

Lys Asp Leu Ser Glu Met Ser His Thr Leu Thr Pro Glu Asn Thr Leu

85 90 95

Asp Ile Ser Ser Leu Ser Ser Asn Ala Val Ser Leu Ile Ile Ser Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Thr Gln Val Gly Ile Thr Gly Ile Gly Ala Lys Lys Thr His Ser

165 170 175

Gly Ile Ser Asp Gln Lys Gly Ala Leu Arg Lys Asn Leu Ala Thr Ala

180 185 190

Gln Ser Leu Glu Lys Glu Leu Ala Gly Ser Lys Leu Gly Leu Asn Lys

195 200 205

Gln Ile Asp Thr Asn Ile Thr Ser Pro Gln Thr Asn Ser Ser Thr Lys

210 215 220

Phe Leu Gly Lys Asn Lys Leu Ala Pro Asp Asn Ile Ser Leu Ser Thr

225 230 235 240

Glu His Lys Thr Ser Leu Ser Ser Pro Asp Ile Ser Leu Gln Asp Lys

245 250 255

Ile Asp Thr Gln Arg Arg Thr Tyr Glu Leu Asn Thr Leu Ser Ala Gln
260 265 270

Gln Lys Gln Asn Ile Gly Arg Ala Thr Met Glu Thr Ser Ala Val Ala
275 280 285

Gly Asn Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Tyr Ala Ser Ala Leu Glu Glu
290 295 300

Glu Glu Gln Leu Ile Ser Gln Ala Ser Ser Lys Gln Ala Glu Glu Ala
305 310 315 320

Ser Gln Val Ser Lys Glu Ala Ser Gln Ala Thr Asn Gln Leu Ile Gln
325 330 335

Lys Leu Leu Asn Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Ser Lys Asn Ser Thr
340 345 350

Ala Ser Gln Ile Ala Gly Asn Ile Arg Ala
355 360

<210> 227

<211> 249

<212> DNA

<213> Shigella

<400> 227

agtgttacag taccgaatga tgattggaca ttgagttcat tatctgaaac ttttgatgat 60

ggaactcaaa cattacaagg tgaactaaca ttggcactag ataaattagc taaaaatcct 120

tcgaatccac agttgctggc tgaataccaa agtaaattat ctgaatatac attatatagg 180

aacgcgcaat ccaatacagt gaaagtgatt aaggatgttg atgctgcaat tattcaaaac 240

ttcagataa 249

<210> 228

<211> 82

<212> PRT

<213> Shigella

<400> 228

Ser Val Thr Val Pro Asn Asp Asp Trp Thr Leu Ser Ser Leu Ser Glu
1 5 10 15

Thr Phe Asp Asp Gly Thr Gln Thr Leu Gln Gly Glu Leu Thr Leu Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gln Ser Lys Leu Ser Glu Tyr Thr Leu Tyr Arg Asn Ala Gln Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Arg

<210> 229

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 229

ggggacgacg ucgugggggg g 21

<210> 230

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400

> 230

aauuguguaa uguccuucaa 20

<210> 231

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 231

Cys Asp Gly Arg Cys

1 5

<210> 232

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 232

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val

20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser

35

<210> 233

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 233

Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu His His Leu Ala His Leu Ala

1 5 10 15

Leu His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala

20 25

<210> 234

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic construct

<400> 234

Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu His His Leu Ala His Leu Ala

1 5 10 15

His His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala

20 25

<210> 235

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 235

Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu His His Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

His His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala

20 25

<210> 236

<211> 15

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 236

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Cys

1 5 10 15

<210> 237

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila

<400> 237

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 238

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 238

gaggctctct ctctctc 17

<210> 239

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 239

tccatgacgt tcctgacgtt tctctctctc tctcggag 38

<210> 240

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 240

cggcggataa ccgcgagcgg ttattcgccc tacggctctc tctctctcgg ag 52

<210> 241

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 241

gggggacgat cgtcgggggc tctctctctc tcggag 36

<210> 242

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 242

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 243

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 243

ctctctctct ctctc 15

<210> 244

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 244

ccttccttcc ttcc 14

<210> 245

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 245

cttcttcttc ttcttctt 18

<210> 246

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 246

cctcctcctc ctcctcct 18

<210> 247

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 247

tctcctcctt t 11

<210> 248

<211> 15

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 248

cucucucucu cucuc 15

<210> 249

<211> 14

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 249

ccuuccuucc uucc 14

<210> 250

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 250

cuucuucuuc uucuucuu 18

<210> 251

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 251

ccuccuccuc cuccuccu 18

<210> 252

<211> 11

<212> RNA

<213> Artificial sequenced

<220><223> Synthetic construct

<400> 252

ucuccuccuu u 11

<210> 253

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 253

ctctctctct ctc 13

<210> 254

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 254

gagagagaga gag 13

<210> 255

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 255

ctctctctct ctctctc 17

<210> 256

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 256

ccttccttcc ttcc 14

<210> 257

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 257

ggaaggaagg aagg 14

<210> 258

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 258

ctctctctcc tctctctc 18

<210> 259

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 259

tccatgacgt tcctgacgtt tgagagagag agag 34

<210> 260

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 260

tccatgagct tcctgagtct tgagagagag agag 34

<210> 261

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 261

ctctctctct ctcctctctc tctctc 26

<210> 262

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 262

ctctctctct ctcctctctc tctctc 26

<210> 263

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 263

ctctctctct ctc 13

<210> 264

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 264

cggcggataa ccgcgagcgg ttattcgccc tacggctctc tctctctcgg ag 52

<210> 265

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 265

gggggacgat cgtcgggggc tctctctctc tcggag 36

<210> 266

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 266

gaggggaggg gaggg 15

<210> 267

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 267

gctcggatcc 10

<210> 268

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 268

cgtacggtcg 10

<210> 269

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 269

cgaccgtacg ggatccgagc 20

<210> 270

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 270

ggaaggaagt taggaaggaa gg 22