



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월19일
(11) 등록번호 10-2046449
(24) 등록일자 2019년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/06 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7027169
(22) 출원일자(국제) 2012년03월19일
심사청구일자 2017년03월16일
(85) 번역문제출일자 2013년10월15일
(65) 공개번호 10-2014-0038387
(43) 공개일자 2014년03월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/029636
(87) 국제공개번호 WO 2012/125998
국제공개일자 2012년09월20일
(30) 우선권주장
61/453,656 2011년03월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010121180 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
글로벌이문
미국 콜로라도 80027 루이스빌 인피니트 드라이브 1450
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리프리젠티드 바이 더 셰크러테리, 디파트먼트 오브 헬스 앤드 휴먼 서비씨즈
미합중국 메릴랜드 20892-7660 베데스다 엠에스씨 7660 이그제큐티브 볼트바드 6011 스위트 325 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼 내셔널 인스티튜츠 오브 헬스
(72) 발명자
팔레나 클라우디아
미국 20851 메릴랜드주 로크빌 세틀랜드 코트 2
귀 지민
미국 80027 콜로라도주 수페리어 휴론 피크 에비뉴 3130
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 65 항

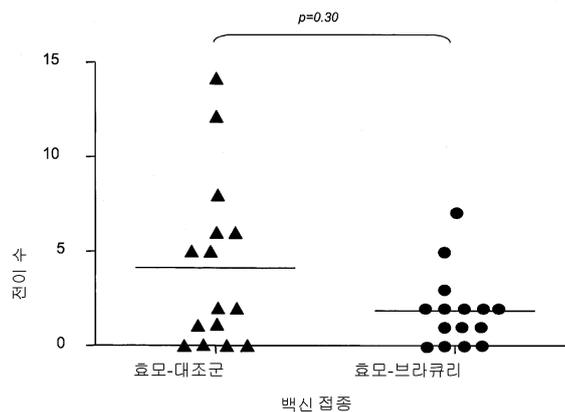
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 효모-브라큐리 면역요법 조성물

(57) 요약

브라큐리 항원을 포함하는 효모-기재 면역요법 조성물, 및 브라큐리의 발현 또는 과발현을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료 방법이 개시된다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

아펠리언 데이비드

미국 07005 뉴저지주 분톤 타운십 올드 비치 글렌
로드 3

슈름 제프리

미국 20854 메릴랜드주 포토맥 소렐 애비뉴 10301

명세서

청구범위

청구항 1

a) 효모 베타클; 및

b) 1종 이상의 브라큐리 (Brachury) 항원을 포함하는, 암 항원

을 포함하는, 암을 가진 개체에서 암의 전이성 진행을 감소, 저지, 반전, 지연 또는 예방하기 위한 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고,

상기 암을 가진 개체는 전이성 진행 중이거나, 전이성 진행을 겪을 위험에 있거나, 또는 전이성 진행을 겪기 시작할 것으로 예측되는 것인,

면역요법 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리 발현이 감지되지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리 발현이 감지되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 개체는 단계 I, 단계 II, 단계 III 또는 단계 IV의 암을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

a) 효모 베타클; 및

b) 1종 이상의 브라큐리 항원을 포함하는, 암 항원

을 포함하는, 개체에서 브라큐리-발현 암의 개시를 예방 또는 지연시키기 위한 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 면역요법 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 개체 내에 암이 감지되지 않은 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 개체는 암 발병 위험이 높은 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 개체는 전암성 병변(precancerous lesion)을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 개체는 암을 가지나, 브라큐리-발현 암 세포가 상기 암 내에서 감지되지 않은 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 암은 아직 전이성이 아닌 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 암은 높은 전이 위험성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 개체는 단계 I 또는 단계 II의 암을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 다른 암 치료법으로 치료 중이거나 치료된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 치료법은 화학요법인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 치료법은 표적화된 암 치료법인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 치료법은 방사선 요법인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 치료법은 입양 T 세포 전이인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제13항에 있어서,

상기 치료법은 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물의 투여인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 부가적인 면역요법 조성물은 효모 베타클, 및 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제2 암 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 제2 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, 티로시나아제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (APC:adenomatous polyposis coli), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로젠 수용체 (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, 메소텔린, 및 NGEF로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 제2 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), 및 MUC-1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

a) 효모 베타클; 및

b) 1종 이상의 브라큐리 항원을 포함하는, 암 항원

을 포함하는, 암을 가진 개체에서 종양 세포의 화학요법-내성 또는 방사선-내성을 감소 또는 예방하기 위한 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고,

상기 암을 가진 개체는 화학요법 및/또는 방사선요법을 받고 있는 개체인,

면역요법 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리가 감지되지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리 발현이 감지되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

a) 효모 베타클, 및 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제1 암 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물; 및

b) 효모 베타클, 및 브라큐리 항원을 포함하는 제2 암 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물을 포함하는,

브라큐리 발현이 감지되지 않은 암을 가지는 개체에서 암을 치료하기 위한 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고,

상기 제2 면역요법 조성물은 상기 제1 면역요법 조성물의 투여 전에, 그와 동시에, 그에 연속하여, 또는 그에 이어서 투여되는 것을 특징으로 하는,

면역요법 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

단계 (a)에서 제1 면역요법 조성물이 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물과 함께 투여되며, 상기 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물 각각은 부가적인 암 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서,

상기 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, 티로시나아제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (APC), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로겐 수용체 (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, 메소텔린, 및 NGE프로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 28

제25항 또는 제26항에 있어서,

상기 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), 및 MUC-1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 29

- a) 효모 베타글루칸 및 돌연변이 Ras 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물;
 - b) 효모 베타글루칸, 및 태아성 암 항원 (CEA) 및 뮤신-1 (MUC-1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물; 및
 - c) 효모 베타글루칸 및 브라큐리 항원을 포함하는 제3 면역요법 조성물을 포함하는,
- 암을 가진 개체에서 암을 치료하기 위한 면역요법 조성물로서,
- 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 면역요법 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 제1 면역요법 조성물, 제2 면역요법 조성물 및 제3 면역요법 조성물이 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 31

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 개체의 종양 크기를 감소시키고, 개체의 생존률을 증가시키고, 및/또는 개체 내 종양 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 32

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 종양의 수술적 절제를 받고 있거나 받은 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 33

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암은 상피 세포 기원인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 34

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암은 유방암, 소장암, 위암, 췌장암, 신장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 고환암, 폐암, 대장암, 전립선암, 만성 림프성 백혈병 (CLL), Epstein-Barr 바이러스 형질전환 B 세포, 버킷 림프종, 호지킨 림프종, 및 이의 전이성 암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 35

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 또는 서열 번호 6의 포지션 2-435을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 36

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 37

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

암 항원은 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 39

제37항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열 번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 40

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모 베헤클은 전효모(whole yeast)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서,

상기 전효모는 사멸된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 42

제40항에 있어서,

상기 전효모는 열-불활성화된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 43

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모 베헤클은 상기 항원을 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 44

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 캔디다(*Candida*), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 한세놀라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 시조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*) 및 야로이야(*Yarrowia*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 속으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 45

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 46

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 47

제1항, 제5항, 제22항, 제25항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 개체로의 투여에 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제 내에 제제화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 48

a) 불활성화된 전효모; 및

b) 서열 번호 6의 포지션 2-435의 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질로서, 상기 브라큐리 융합 단백질의 발현은 프로모터 *CUP1*의 조절하에 있는 것을 특징으로 하는 브라큐리 융합 단백질

을 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 융합 단백질은 상기 효모에 의하여 발현되고;

상기 조성물은 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 유발하는 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 50

a) 불활성화된 전효모; 및

b) 서열 번호 18의 포지션 2-435의 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질로서, 상기 브라큐리 융합 단백질의 발현은 프로모터 *CUP1*의 조절하에 있는 것을 특징으로 하는 브라큐리 융합 단백질

을 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 융합 단백질은 상기 효모에 의하여 발현되고;

상기 조성물은 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 유발하는 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 52

제48항 또는 제50항에 있어서,

상기 효모 베타글루칸은 사카로마이세스로부터 유래된 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 53

제48항 또는 제50항에 있어서,

상기 효모 베타글루칸은 사카로마이세스 세레비시에로부터 유래된 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 54

제48항 또는 제50항에 있어서, 상기 조성물은 질병 치료에 사용하기 위한 것인 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서,

상기 질병은 암인 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 56

제54항에 있어서,

상기 질병은 Epstein Barr 바이러스 (EBV) 감염과 관련되는 것을 특징으로 하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물.

청구항 57

a) $CuSO_4$ 의 부재 하에, 적절한 배지 내에서, *CUP1* 프로모터의 조절 하에, 브라큐리 항원을 암호화하는 재조합 핵산 분자로 형질전환된 효모를 상기 효모가 반대수증식기 중기(mid-log growth phase)에 도달할 때까지 배양하는 단계;

b) $CuSO_4$ 를 상기 배지에 첨가함으로써, 상기 효모 내에 브라큐리 항원의 발현을 유도하는 단계;

c) 단계 (b) 후 6 내지 8 시간 동안 상기 효모를 배양하는 단계; 및

d) 상기 효모를 수확하는 단계

를 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 제조 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,

단계 (a)에서 상기 효모는 총 배양액 부피 밀리미터 당 1.0 내지 2.0 Y.U.의 세포 밀도로 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제57항에 있어서,

단계 (a)에서 상기 효모는 총 배양액 부피 밀리미터 당 1.0 내지 1.5 Y.U.의 세포 밀도로 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제57항에 있어서,

단계 (a)-(c)에서 상기 효모는 pH가 5.5 이상으로 유지되는 배지 내에서 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제57항에 있어서,

단계 (d) 후에 상기 효모를 열-불활성화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 62

제61항에 있어서,

상기 효모는 56℃에서 1 시간 동안 열-불활성화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

제57항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모를 약학적으로 허용가능한 부형제로 주사용으로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 64

제57항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스로부터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

a) 효모 베히클; 및

b) 브라큐리 (Brachury) 항원을 포함하는 암 항원

을 포함하는, 개체에서 암을 치료하기 위한 면역요법 조성물로서,

상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 서열 번호 18, 또는 서열 번호 18의 2-435로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인,

면역요법 조성물.

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2011.3.17자로 출원된 미국 가출원 제 61/453,656 호의 우선권을 주장한다. 2011.3.17자로 출원된 미국 가출원 제 61/453,656 호의 전체 개시가 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 정부 권리
- [0004] 본 발명은 보건 복지부의 기관인 국립 보건원의 공동 연구 개발 협정의 실적으로 창출되었다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가진다.
- [0005] 공동 연구 계약에 대한 진술
- [0006] 본 발명은 2008.5.8 실행된 공동 연구 개발 협정의 당사자에 의하여 또는 이를 대신하여 행하여졌다. 상기 공동 연구 개발 협정의 당사자들은 GlobeImmune, Inc. 및 국립 보건원의 기관, 센터 또는 부서인 국립 암 연구소로 대표되는 미국 보건 복지부이다.
- [0007] 서열 목록에 대한 참조
- [0008] 본원은 EFS-Wev에 의한 텍스트 파일로서 전자 제출되는 서열 목록을 포함한다. "3923-34-PCT_ST25"로 명명되는 상기 텍스트 파일은 76 KB 크기를 가지며, 2012.3.13에 기록되었다. 상기 텍스트 파일에 포함되는 정보는 37 CFR § 1.52(E)(5)에 따라 그 전체로서 본원에 참조로 포함된다.
- [0009] 기술 분야
- [0010] 본 발명은 일반적으로 효모-기재 면역요법 조성물 및 브라큐리(Brachyury)의 발현 또는 과발현을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0011] "T"로도 알려진 브라큐리는 중배엽 전사 인자이며 유전자의 T-박스 콤플렉스의 일원이다. 브라큐리를 암호화하는 유전자 (인간에서 T 유전자 또는 브라큐리 유전자로 표시됨)는 이형접합 동물 내에 꼬리 길이 및 천추에 영향을 미치는 마우스 내 돌연변이를 통하여 Nadine Dobrovolskaia-Zavadskaia에 의하여 1927년에 최초로 확인되었다. 상기 브라큐리 유전자는 Hermann 일동에 의하여 1990년 마우스 내에서 (Herrmann et al., 1990, *Nature* 343:617-622), 및 인간 브라큐리에 대한 아미노산 서열을 기재하고 추론한 Edwards 일동에 의하여 1996년 인간 내에서 (Edwards et al., 1996, *Genome Res.* 6:226-223) 클로닝되었다.
- [0012] 전사 인자의 T-박스 패밀리의 일원으로서, 브라큐리는 앞뒤 역순상 동서열의 (pallindromic) 공통 서열에 결합하는 "T-박스" 또는 T-도메인으로 불리우는 고도로 보존된 DNA-결합 도메인 모티프를 함유한다. 브라큐리는 다른 T-박스 단백질과 마찬가지로 초기 발달에 역할을 하는 것으로 보여졌으며, 척추동물에서 뒤의 중배엽의 형성 및 분화 및 축 발달에 있어 필수적이다 (예를 들어, Wilkinson et al., 1990, *Nature* 343(6259):657-659); Beddington et al., 1992, *Development* (Suppl.):157-165; Schulte-Merker et al., 1994, *Development* 120:1009-1015; Kispert 및 Herrmann, 1994, *Dev. Biol.* 161:179-193; Showell et al., 2004, *Dev Dyn* 229:201-218 참조). 더욱 최근에, Palen 일동은 브라큐리가 다양한 인간 종양 조직 및 암 세포주 내에서 발현됨을 입증하였으며, 브라큐리 펩티드를 이용하여 정상적인 기증자 및 암 환자 내에서 브라큐리-특이적 T 세포를 생성할 수 있을 보였다 (Palena et al., 2007, *Clin. Cancer Res.* 13(8):2471-2478). Fernando et al.에 의한 연구는 브라큐리가 종양 세포 사이클 진행을 감쇠시키면서 인간 종양 세포 내에서 상피-중배엽 전이 (EMT)를 촉진시키고, 종양 세포에 중배엽 표현형 및 이동 및 침습 능력을 부여함을 보였다 (Fernando et al., 2010, *J. Clin.*

Invest. 120(2):533-544). 따라서, 브라큐리는 암의 전이성 진행에 수반된다.

[0013] 암은 전세계적으로 사망의 주된 원인이며, 암의 효과적인 치료법의 개발은 계속해서 연구 및 임상적 개발의 가장 활동적인 영역 중 하나이다. 암을 치료 및 예방하기 위한 다양한 혁신적 접근이 제안되었으나, 많은 암이 계속해서 높은 치사율을 가지며 치료가 어렵거나 전형적인 치료법에 비교적 무반응이다. 브라큐리 발현과 관련되는 암이 유방, 소장, 위, 신장, 방광, 자궁, 난소, 고환, 폐, 대장 및 전립선을 포함하는 다양한 조직 내에서 발견될 수 있으며, 전이성 및 말기암을 포함한다. 또한, 브라큐리는 만성 림프구성 백혈병 (CLL), Epstein-Barr 형질전환 B 세포, 버킷 및 호지킨 림프종과 같은, B 세포 기원의 종양 내에서 발현된다. 따라서, 브라큐리는 많은 인간 암에서 역할을 하는 것으로 보인다. 브라큐리가 암 면역요법에 대한 표적으로 제안되었으나 (예를 들어, Palena et al., *supra*, Fernando et al., *supra*, 및 WO 2008/106551 참조), 이는 비교적 새로운 암 표적이므로, 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련되는 암을 효과적으로 치료 및/또는 예방하는 새로운 면역요법 제품에 대한 요구가 당업계에 남아 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 발명의 개요

[0015] 본 발명의 일 구현예는 암을 가지는 개체 내에서 암의 전이성 진행을 감소, 저지, 반전, 지연 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 전이성 진행 중이거나 전이성 진행을 겪을 위험에 있거나 또는 전이성 진행을 겪기 시작할 것으로 예측되는 암을 가지는 개체에, (a) 효모 베타히클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 (Brachyry) 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 다른 구현예는 암을 가지는 개체 내에서 암의 전이성 진행을 감소, 저지, 반전, 지연 또는 예방하기 위한, 효모 베타히클 및 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 면역요법 조성물의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 상기 구현예들의 일 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리가 감지되지 않는다. 일 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리 발현이 감지된다. 상기 개체는 단계 I 암, 단계 II 암, 단계 III 암, 또는 단계 IV 암을 가질 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예는 브라큐리-발현 암의 개시를 예방 또는 지연시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 개체에 (a) 효모 베타히클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 다른 구현예는 브라큐리-발현 암의 개시를 예방 또는 지연시키기 위한, 효모 베타히클 및 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 면역요법 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0018] 이들 구현예들의 일 측면에서, 상기 개체 내에서 암이 감지되지 않은 것이다. 일 측면에서, 상기 개체는 암 발병 위험이 높다 (예를 들어, 유전적 소인을 통하여). 일 측면에서, 상기 개체는 전암성 병변을 가진다.

[0019] 이들 구현예들의 일 측면에서, 상기 개체는 암을 가지나, 브라큐리-발현 세포가 상기 암 내에서 감지되지 않은 것이다. 일 측면에서, 상기 암은 아직 전이성이 아니다. 일 측면에서, 상기 암은 높은 전이 위험을 가진다. 일 측면에서, 상기 대상은 단계 I 암을 가진다. 일 측면에서, 상기 대상은 단계 II 암을 가진다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예는 암을 가지는 환자 내에 종양 세포의 화학요법-내성 또는 방사선-내성을 감소 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 암을 가지고 화학요법 및/또는 방사선요법을 받고 있는 개체에 (a) 효모 베타히클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 다른 구현예는 암을 가지는 환자 내에 종양 세포의 화학요법-내성 또는 방사선-내성을 감소 또는 예방하기 위한, 효모 베타히클 및 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 면역요법 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 이러한 구현예의 일 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리가 감지되지 않는다. 일 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리 발현이 감지된다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예는 암 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (a) 브라큐리 발현이 감지되지 않은 암을 가지는 개체에, 효모 베타히클 및 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제1 암 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 제1 조성물의 투여 전에, 그와 동시에, 그에 연속하여, 또는 그에 이어서, 효

모 베히클 및 브라큐리 항원을 포함하는 제2 암 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 상기 방법은 단계 (a)에서, 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물을 투여하는 단계로 포함하고, 상기 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물 각각은 부가적인 암 항원을 포함한다. 상기 구현예의 일 측면에서, 상기 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, 티로시나아제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (APC), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로겐 수용체 (AR), Smad4, MDR1, F1t-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, 메소텔린, 및 NGEF으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 측면에서, 상기 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), 및 MUC-1로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 다른 구현예는 암을 치료하기 위한 면역요법 조성물들의 조합의 용도에 관한 것으로, 상기 면역요법 조성물들은 (a) 효모 베히클 및 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제1 암 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물; 및 (b) 효모 베히클 및 브라큐리 항원을 포함하는 제2 암 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물을 포함한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예는 암 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (a) 암을 가지는 개체에, 효모 베히클 및 돌연변이 Ras 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물을 투여하는 단계; (b) 상기 (a)의 개체에, 효모 베히클, 및 태아성 암 항원 (CEA) 및 뮤신-1 (MUC-1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물을 투여하는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b)의 개체에 효모 베히클 및 브라큐리 항원을 포함하는 제3 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, (a), (b) 및 (c) 투여 단계들은 동시에 행해진다. 본 발명의 또 다른 구현예는 암 치료를 위한 면역요법 조성물들의 조합의 용도에 관한 것으로, 상기 면역요법 조성물들은 (a) 효모 베히클 및 돌연변이 Ras 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물; (b) 효모 베히클 및 태아성 암 항원 (CEA) 및 뮤신-1 (MUC-1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물; 및 (c) 효모 베히클 및 브라큐리 항원을 포함하는 제3 면역요법 조성물을 포함한다.

[0023] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 또는 측면들에서, 상기 개체가 암 또는 전암성 병변을 가지는 경우, 본 발명의 일 측면에서, 상기 개체는 다른 암 치료법으로 처리중이거나 처리된 것이다. 예를 들어, 이러한 치료법은 이에 제한되지 않으나, 화학요법, 표적화된 암 치료법, 방사선 요법, 입양 T 세포 전이, 및/또는 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물의 투여를 포함한다. 일 측면에서, 부가적인 면역요법 조성물은 효모 베히클 및 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제2 암 항원을 포함한다. 상기 제2 암 항원은 이에 제한되지 않으나, 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, 티로시나아제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (APC:adenomatous polyposis coli), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로겐 수용체 (AR), Smad4, MDR1, F1t-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, 메소텔린, 및 NGEF를 포함한다. 일 측면에서, 상기 제2 암 항원은 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA), 및 MUC-1로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0024] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 방법 또는 용도는 상기 개체 내에서 종양 크기를 감소시키고, 개체의 생존률을 증가시키고, 및/또는 개체 내에서 종양 성장을 억제한다.

[0025] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 방법은 상기 개체로부터 종양의 수술적 절제를 추가로 포함한다.

[0026] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 암은 상피 세포 기원이다. 일 측면에서, 상기 암은 이에 제한되지 않으나, 유방암, 소장암, 위암, 췌장암, 신장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 고환암, 폐암, 대장암, 전립선암, 만성 림프성 백혈병 (CLL), Epstein-Barr 바이러스 형질전환 B 세포, 버킷 림프종, 호지킨 림프종, 및 이의 전이성 암을 포함할 수 있다.

[0027] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 브라큐리 항원은 전장 인간 브라큐리이다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 전장 브라큐리가 아니다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2의 적어도 포지션 1 또는 2로부터 포지션 255와 C-말단 사이까지를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2의 적어도 포지션 1 또는 2로부터 포지션 430과 C-말단 사이까지를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원

은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2의 포지션 246 내지 254를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 6과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 18, 서열 번호 18의 2-435, 또는 서열 번호 18과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 2의 2-435, 또는 서열 번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 2-435, 또는 서열 번호 6과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 18, 서열 번호 18의 2-435, 또는 서열 번호 18과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 2의 2-435, 또는 서열 번호 2와 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 암 항원은 적어도 25 아미노산 길이이다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 적어도 25 아미노산 길이이다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 30 아미노산 보다 큰 길이이다. 일 측면에서, 상기 암 항원은 브라큐리의 2 이상의 면역원성 도메인을 포함한다.

[0028] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 암 항원은 융합 단백질이다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 8과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 서열 번호 20으로 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 20과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진다.

[0029] 본 발명의 다른 구현에는 (a) 효모 베헤클; 및 (b) 상기 효모 베헤클에 의하여 발현되고 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 항원으로서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18로 표시되는 아미노산 서열의 30을 초과하는 아미노산을 포함하는 항원을 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물에 관한 것이다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2의 적어도 포지션 1 또는 2로부터 포지션 255와 C-말단 사이까지를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2의 적어도 포지션 1 또는 2로부터 포지션 430과 C-말단 사이까지를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 18 또는 서열 번호 2의 포지션 246 내지 254를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 6과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 18, 서열 번호 18의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 18과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 2의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 6, 서열 번호 6의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 6과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 18, 서열 번호 18의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 18과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 2의 포지션 2-435, 또는 서열 번호 2와 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 암 항원은 융합 단백질이다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 서열 번호 8인 아미노산 서열 또는 서열 번호 8과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 서열 번호 20의 아미노산 서열 또는 서열 번호 20과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일 측면에서, 상기 효모 베헤클인 전효모(whole yeast)이다. 일 측면에서, 상기 전효모는 열-불활성화된다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현에는 (a) 불활성화된 전효모; 및 (b) 서열 번호 6의 포지션 2-435의 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질을 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물에 관한 것이다. 상기 브라큐리 융합 단백질의 발현은 프로모터 *CUP1*의 조절 하에 있고, 상기 브라큐리 융합 단백질은 상기 효모에 의하여 발현되고, 상기 조성물은 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 유발한다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현에는 (a) 불활성화된 전효모; 및 (b) 서열 번호 18의 포지션 2-435의 아미노산 서열을 포함하는 브라큐리 융합 단백질을 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물에 관한 것이다. 상기 브라큐리 융합 단백질의 발현은 프로모터 *CUP1*의 조절 하에 있고, 상기 브라큐리 융합 단백질은 상기 효모에 의하여 발현되고, 상기 조성물은 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 유발한다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 효모 베헤클은 전효모이다. 일 측면에서, 상기 전효모는 사멸된다. 일 측면에서, 상기 전효모는 열-불활성화된다. 일 측면에서, 상기 효모는 상기 항원을 발현한다. 일 측면에서, 상기 효모는 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 캔디다(*Candida*), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 한세놀라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스

(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 시조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*) 및 야로이아(*Yarrowia*)로 이루어지는 균으로부터 선택되는 속으로부터이다. 일 측면에서, 상기 효모는 사카로마이세스로부터이다. 일 측면에서, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터이다.

[0033] 상기한 또는 본원 명세서의 다른 곳에 기재되는 본 발명의 임의의 구현예들 중 일 측면 또는 측면들에서, 상기 조성물은 대상에 투여에 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제 내에 제제화된다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현예는 질병 치료를 위한 본원에 개시되는 효모-브라큐리 면역요법 조성물들 중 임의의 것의 용도에 관한 것이다. 일 측면에서, 상기 질병은 암이다. 일 측면에서, 상기 질병은 감염원과 관련된다. 일 측면에서, 상기 질병은 바이러스 또는 바이러스 감염과 관련된다. 그러한 바이러스는 이에 제한되지 않으나 Epstein Barr Virus (EBV)를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 다른 구현예는 Epstein Barr 바이러스 (EBV) 감염과 관련되는 질병 또는 상태의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 개체에 본원에 개시되는 임의의 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0036] 본 발명의 또 다른 구현예는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (a) $CuSO_4$ 의 부재 하에 적절한 배지 내에서 *CUP1* 프로모터의 조절 하에 브라큐리 항원을 암호화하는 재조합 핵산 분자로 형질전환된 효모를 상기 효모가 대수증식기 중기(mid-log growth phase)에 도달할 때까지 배양하는 단계; (b) $CuSO_4$ 를 상기 배지에 첨가함으로써 상기 효모 내에 브라큐리 항원의 발현을 유도하는 단계; (c) 단계 (b) 후 6 내지 8 시간 동안 상기 효모를 배양하는 단계; 및 (d) 상기 효모를 수확하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 단계 (a)에서 상기 효모는 총 배양액 부피 밀리미터 당 1.0 내지 2.0 Y.U.의 세포 밀도로 배양된다. 일 측면에서, 단계 (a)에서 상기 효모는 총 배양액 부피 밀리미터 당 1.0 내지 1.5 Y.U.의 세포 밀도로 배양된다. 일 측면에서, 단계 (a)-(c)에서 상기 효모는 pH가 5.5 이상으로 유지되는 배지 내에서 배양된다. 일 측면에서, 상기 방법은 단계 (d) 후에 상기 효모를 열-불활성화하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 일 측면에서, 상기 효모는 약 56°C에서 약 1 시간 동안 열-불활성화된다. 이러한 구현예의 추가적 측면에서, 상기 효모는 약학적으로 허용가능한 부형제로 주사용으로 제제화될 수 있다. 일 측면에서, 상기 효모는 사카로마이세스로부터이다. 일 측면에서, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비시애로부터이다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에 따르면, 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련되는 암을 효과적으로 치료 및/또는 예방하는 면역요법 조성물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1a는 U2 및 UL2 배지 모두를 이용하는, 효모-브라큐리 면역요법 조성물 내 브라큐리 발현의 항-브라큐리에 의한 감지를 보이는 디지털화된 웨스턴 블롯 사진이다.

도 1b는 U2 및 UL2 배지 모두를 이용하는, 효모-브라큐리 면역요법 조성물 내 브라큐리 발현의 항-His에 의한 감지를 보이는 디지털화된 웨스턴 블롯 사진이다.

도 2는 항원 유도 시 세포 밀도 및 항원 유도 후 수확 시기를 변화시킨, 효모-브라큐리 면역요법 조성물 내 브라큐리 발현을 보이는 디지털화된 웨스턴 블롯 사진이다.

도 3a-3c는 2 자극 사이클 동안 효모-브라큐리로 펄스된 후 브라큐리 CTL 펩티드로 펄스된 세 명의 건강한 기증자 중 두 명으로부터의 말초혈액 단핵세포 (PBMCs)가 SW480 암종 세포를 (HLA-A2 양성/브라큐리 높음) 최소의 MCF7 암종 용해로 (HLA-A2 양성/브라큐리 낮음) 사멸시킬 수 있는 CD8+ CTLs를 생성할 수 있었음을 보이는 곡선들이다 (도 3a, 기증자 07706; 도 3b, 기증자 17663; 도 3c, 기증자 26532).

도 4a는 효모-브라큐리 면역요법 조성물로 자극된 건강한 기증자 PBMCs로부터의 브라큐리-특이적 T 세포가 적절한 MHC (SW480, HLA-A2 양성/브라큐리 높음) 대 H226 암종 세포 (HLA-A2 음성/브라큐리 높음)를 가지는 종양 세포를 특이적으로 용해함을 보이는 곡선이다.

도 4b는 도 4a에 나타낸 실험에 사용되는 SW480 및 H226 종양 세포 내 대조 유전자 (GAPDH)의 것에 대한 브라큐리 mRNA의 발현을 보이는 곡선이다.

도 5는 정제된 브라큐리 단백질 또는 대조 β -gal 단백질의 나타낸 투여량에 대한, 효모-브라큐리 (GI-6301,

원) 또는 대조 효모 (효모 대조군, 삼각형)으로 백신 접종된 마우스 비장으로부터 분리된 CD4+ T 세포 증식을 보이는 곡선이다.

도 6은 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물 (GI-6301, 원)의 투여가 효모 단독 투여받은 마우스와 비교하여 (브라큐리 항원 없음) 마우스 내 브라큐리-발현 종양 감소 경향을 나타냄을 보이는 곡선이다.

도 7a 및 7b는 브라큐리-특이적 T 세포주, T-2-BR-A가 브라큐리 특이적 HLA-A2 테트라머에 결합하고 (도 7b), 대조 테트라머에는 결합하지 않음 (도 7a)을 보이는 유세포 분석이다.

도 8은 브라큐리 작용제 펩티드-펄스된 자가 B 세포로 자극 후, 브라큐리 특이적 T 세포주, T-2-BR-A 내 퍼포린의 발현을 보이는 유세포 분석이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

발명의 상세한 설명

[0040]

본 발명은 일반적으로 효모-기재 면역요법 조성물 및 브라큐리를 발현 또는 과발현하는 암의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 효모 베키클 및 브라큐리 항원 또는 그의 면역원성 도메인 (본원에서 "효모-브라큐리 면역요법: 또는 "효모-브라큐리 면역요법 조성물"로도 언급됨)을 포함하는 효모-기재 면역요법 조성물 (효모-기재 면역요법으로도 언급됨)의 용도를 포함한다. 본원 명세서에서 본 발명자들은 신규한 효모-브라큐리 면역요법 제품의 구성 및 제조를 기재하고, 효모-브라큐리 면역요법이 정상적인 개체로부터 및 암 환자로부터의 CD8+ CTLs를 포함하는 브라큐리-특이적 T 세포에 확대됨을 입증한다. 또한, 효모-브라큐리 면역요법 조성물로 면역화된 마우스는 생체 내에서 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 생성하였으며, 브라큐리-발현 종양 성장이 이들 마우스 내에서 억제되었다. 본원에 제시되는 데이터를 함께 고려하면 효모-브라큐리 면역요법이 브라큐리-특이적 세포성 면역 반응 (CD4+ 및 CD8+)의 유발 및 브라큐리-발현 종양의 예방 및 치료에 유용하며, 전이성 암 및 관련 상태의 예방 및/또는 치료를 위한 새로운 치료법을 제공함을 보인다.

[0041]

본 발명에 사용가능한 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 몇몇 이유로 브라큐리-발현 암을 효과적으로 표적화하도록 독특하게 적응된다. 첫째로, 브라큐리는 EMT 과정에 수반되며, 따라서 이론에 구애됨이 없이, 발명자들은 브라큐리가 말기 종양 및 전이성 진행에 있어서 역할을 하는 것으로 믿는다. 따라서, 본 발명의 일 측면에서, 효모-브라큐리 면역요법은 표적화 종양 세포가 운동성을 획득하기 시작하고 다른 조직에 침입하기 전에 또는 그 동안 표적화 종양 세포에 효과적이며, 이에 따라 전이성 암의 개시 및/또는 암, 특히 전이성 암의 진행을 예방, 억제, 저지, 반전 또는 지연시킨다. 전형적인 암 치료법이 실패하면 치료 옵션이 거의 없는, 말기 암, 특히 전이성 암에 대한 효과적인 치료법에 대한 요구가 크다. 효모-브라큐리는 이러한 암 치료, 또는 지연, 억제, 반전 또는 예방을 위한 새로운 접근법을 제시한다. 또한, 효모-브라큐리 면역요법을 이용하여 초기 암을 가지는 개체 내에서 전이성 암 또는 암의 진행을 예방 또는 지연시킬 수 있다. 상기 치료법은 일 구현예에서, 높은 전이성 진행을 가지는 암에 유용하고, 암의 진행을 저지하는데 유용할 수 있다. 나아가, 효모-브라큐리 면역요법은 전암성 (전-악성) 병변 또는 종양을 가지는 개체 내, 암 발병 위험이 높은 개체 내, 특히 높은 전이율을 가지는 개체 내, 및 심지어 정상적인 개체 내에서 암 예방을 위한 예방제로서 유용하며, 본원에 기재되는 것과 같은 다른 암에 대한 예방적 면역요법과 함께 사용될 수 있다.

[0042]

효모-브라큐리 면역요법은 또한 화학요법 및 방사선 요법을 포함하는 암에 대한 다른 치료법을 받고 있는 개체에 이롭다. 보다 구체적으로, 전이성 암은 일부 경우 원발암보다 화학요법 및/또는 방사선 요법에 더 내성인 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 사용하여, 암 내 브라큐리 발현을 억제 (및 이에 따라 항-증식성 영향을 억제)함으로써 전이성 암에서 일어날 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 감소 또는 제거할 수 있으며, 본 발명의 조성물은 개체 내 화학요법 또는 방사선 요법의 성능을 증진시킬 수 있다.

[0043]

또한, 효모-브라큐리 면역요법을 이용하여 사실상 비-종양적일 수 있거나 또는 악성 형질전환에 선행할 수 있는 브라큐리 발현과 관련된 상태 또는 질병을 치료할 수 있다. 예를 들어, 감염원, 예를 들어 Epstein Barr 바이러스 (EBV)와 같은 바이러스로 감염된 세포 내에서 브라큐리를 상향조절할 수 있다. 따라서, 효모-브라큐리 면역요법을 이용하여, 이에 제한되지 않으나 EBV-관련 상태 (예를 들어, 전이성 단핵증)를 포함하는 바이러스 감염과 같은 전염병을 포함하는, 브라큐리 발현과 관련된 질병 또는 상태를 치료 또는 예방할 수 있다.

[0044]

효모-브라큐리 면역요법은 또한 동일한 효모 조성물 내에 부가적인 종양 항원의 이용, 또는 기타 종양 항원을 표적화하는 (순차적으로 또는 동시에) 기타 효모-기재 면역요법 또는 기타 면역요법 및 암 치료/요법과 조합 사

용에 쉽게 적응가능하다. 따라서, 상기 효모-브라큐리 면역요법은 암 유형, 암 단계, 암 등급, 종양에 의하여 발현되는 항원, 및 개체의 전체적 의학적 상태에 적응될 수 있으며 (즉, 상기 요법은 용이하게 맞춤화된다), 이미 암을 가진 개체에 대하여, 다양한 종양 단계에서 최대 효능을 제공하기 위하여 개체 내 암이 진행됨에 따라 그 사용이 조정될 수 있다. 효모-브라큐리 면역요법은 광범위한 암의 예방적 및/또는 치료적 처리를 위한 정교하고 효과적이며 개별화된 접근법을 고안하는 기회를 제공한다.

[0045] 본원에 기재되는 효모-브라큐리 조성물은, 다수가 독성 문제를 가지는 외인성 보조제, 사이토카인 또는 기타 면역자극 분자의 사용 없이, 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응을 포함하는, CD4-의존적 TH17 T 세포 반응 및 항원-특이적 CD8+ T 세포 반응을 포함하는, 표적 항원 (브라큐리)에 대한 후천성 면역 반응뿐 아니라 선천성 면역 반응을 유도한다. 또한, 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 조절 T 세포 (Treg) 수 및/또는 기능을 억제함으로써, 예를 들어 종양의 존재에 의하여 정상적으로 억제될 이펙터 T 세포 반응을 증진시킨다. 또한, 항체 반응을 생성함으로써 면역화하는 면역요법 조성물과 비교하여, 효모-브라큐리 면역요법에 의하여 유발되는 항원-특이적, 광범위한 강력한 세포성 면역 반응은 종양 세포 표적화에 특히 효과적인 것으로 믿어진다. 과연, 많은 연구들이 종양 세포가 MHC Class I 분자 내 종양 펩티드를 인식하는 CD8+ CTLs를 통하여 표적화될 때 면역요법 접근이 증진됨을 보였다.

[0046] 효모-브라큐리 면역요법은 항원 제시 세포 활성화에 뛰어나며, 면역 반응을 크로스-프라이밍하는 고유의 능력을 가져, 그렇지 않으면 억압 환경일 수 있는 것에도 불구하고, 종양에 대하여 전형적으로 효과적인 CD8+ CTL 반응을 생성한다. 이러한 유형의 면역요법은 항원 제시 세포의 적절한 면역원을 제시하는 자연적 능력을 이용하므로, 본 발명에 따라 효과적인 면역요법을 생산하기 위하여 브라큐리의 CTL 에피토프 또는 MHC Class II 에피토프의 정확한 정체를 아는 것은 필요하지 않다. 사실상, 복수의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 에피토프들을 단일 효모-브라큐리 면역요법 조성물 내에 표적화할 수 있으며, 따라서 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법은 짧은 펩티드의 사용에 제한되지 않고, 사실상, 이들 조성물 내에 더 긴 폴리펩티드 및 융합 단백질의 사용이 효과적이다. 따라서, 효모-브라큐리 면역요법을 사용함으로써, 추정상의 T 세포 에피토프를 확인하기 위한 알고리즘 및 복잡한 식의 이용이 피하여진다.

[0047] 나아가, 브라큐리는 대부분의 정상 (비-종양) 조직에 의하여 발현되지 않고 종양 세포 내에서 전형적으로 과발현되므로, 정상적 조직과 관련되는 임의의 "오프 타겟" 효과가 문제되지 않는다. 상기한 바와 같이, 효모-브라큐리는, 그러한 제제가 원한다면 포함될 수도 있으나 외인성 보조제, 면역자극제 또는 분자, 공자극 분자, 또는 사이토카인의 사용 없이, 면역화 프로토콜 (예방 또는 치료) 내에 효과적으로 이용될 수 있다. 나아가, 효모-브라큐리 면역요법은 다른 유형의 면역요법에서 문제가 될 수 있는 효능 손실 없이 반복적으로 투여될 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물

[0049] 본 발명의 일 구현예는 브라큐리 발현 또는 과발현을 특징으로 하는 암 (처음에는 감지가 가능한 브라큐리를 발현하는 세포를 함유하지 않으나, 암 발병의 후기 단계에서 브라큐리를 발현하는 세포를 함유할 수 있거나 함유할 암을 포함)의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있는 효모-기재 면역요법 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 (a) 효모 베히클; 및 (b) 하나 이상의 브라큐리 항원(들) 및/또는 그의 면역원성 도메인(들)을 포함하는 암 항원을 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물이다. 하나 이상의 브라큐리 항원이 효모 베히클 내에 적재되거나 또는 본원에 기재되는 효모 베히클과 복합체화되거나, 이에 부착되거나, 이와 혼합되거나 이와 함께 투여되어 본 발명의 조성물을 형성하는 것이 본 발명의 구현예이나, 상기 브라큐리 항원 또는 그의 면역원성 도메인은 효모 베히클에 의하여 (예를 들어, 효모 사이토플라스트, 효모 고스트, 또는 효소 막 추출물 또는 그의 분획으로 임의로 추가로 가공될 수 있는, 미손상 효모 또는 효모 스포로플라스트에 의하여) 제조된 단백질로서 가장 전형적으로 발현된다.

[0050] "효모-브라큐리 면역요법 조성물"은 적어도 하나의 브라큐리 항원 또는 그의 면역원성 도메인을 포함하는 특정 유형의 "효모-기재 면역요법 조성물"이다. 문구 "효모-기재 면역요법 조성물"은 "효모-기재 면역요법 제품", "효모-기재 면역치료 조성물", "효모-기재 조성물", "효모-기재 면역요법제", "효모-기재 백신", 또는 이들 문구의 파생어와 상호교환가능하게 사용될 수 있다. "면역요법 조성물"은 대상에서 적어도 하나의 치료적 이점을 달성하기에 충분한 면역 반응을 유발하는 조성물이다. 본원에 사용되는 효모-기재 면역요법 조성물은 효모 베히클 성분을 포함하고 대상에서 적어도 하나의 치료적 이점을 달성하기에 충분한 면역 반응을 유발하는 조성물을 의미한다. 보다 구체적으로, 효모-기재 면역요법 조성물은 효모 베히클 성분 및 전형적으로 항원 성분을 포함하고, 제한없이 T 세포-중재 세포성 면역 반응을 포함하는 세포성 면역 반응과 같은 면역 반응을 유발 또는 유도할 수 있는 조성물이다. 일 측면에서, 본 발명에 사용가능한 효모-기재 면역요법 조성물은 CD8+ 및/또는

CD4+ T 세포-중재 면역 반응을 유도할 수 있으며, 일 측면에서, 특히 표적 항원 (예를 들어, 암 항원)에 대한 CD8+ 및 CD4+ T 세포-중재 면역 반응을 유도할 수 있다. CD4+ 면역 반응은 TH1 면역 반응, TH2 면역 반응, TH17B 면역 반응, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 효모-기재 면역요법은 특히 TH1 및 TH17 반응을 생성할 수 있다. CD8+ 면역 반응은 세포독성 T 림프구 (CTL), 반응을 포함할 수 있고, 효모-기재 면역요법은 이러한 반응을 생성할 수 있다. 일 측면에서, 효모-기재 면역요법 조성물은 대상 내에 조절 T 세포 (Tregs)의 수 및 작용성을 조절한다. 효모-기재 면역요법은 또한 예를 들어 사이토카인, 항체의 첨가 및/또는 효모에 대한 제조 과정을 조절함으로써, 다른 것에 대한 하나의 유형의 반응을 촉진시키도록 변경될 수 있다. 임의로, 효모-기재 면역요법 조성물은 체액성 면역 반응을 유발할 수 있다

[0051] 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 "예방적" 또는 "치료적"일 수 있다. 예방적으로 제공될 때, 본 발명의 조성물은 브라큐리-발현 종양 발병의 예방, 억제 또는 지연; 및/또는 기타 조직 (전이)의 종양 이동 및/또는 종양 침습의 예방, 억제 또는 지연 및/또는 일반적으로 개체 내 암의 진행 예방 또는 억제를 목적으로, 브라큐리를 발현하는 암의 발병 또는 발병 감지 전에 제공된다. 본원에 논의되는 바와 같이, 브라큐리는 말기 암을 포함하는 몇몇 암 내에서 발현되고, 전이성 암과 같은 종양의 침습 및 이동과 관련되는 과정인 EMT 과정에 수반되는 것으로 보여졌다. 따라서, 예방적 조성물은 암을 가지지 않는 것으로 보이는 (건강한, 또는 정상적 개체) 개체에, 전암성 (전-악성) 병변을 가지는 개체에, 및 또한 암을 가지나 브라큐리가 아직 감지되지 않은 (즉, 암 내 종양 세포에 의한 브라큐리 발현 전) 개체에 투여될 수 있다. 암, 특히 브라큐리 발현 및/또는 전이가 전형적으로 관련되는 암의 발병 위험이 높은 개체를 본 발명의 조성물로 예방적으로 처리할 수 있다. 치료적으로 제공될 때, 상기 면역요법 조성물은 개체 내에 종양 크기를 감소시키고; 개체 내 종양 성장을 억제하고; 개체의 생존율을 증가시키고; 기타 조직(전이성 암)의 종양 이동 및/또는 종양 침습의 발병을 예방, 억제, 반전 또는 지연시키고 및/또는 개체 내 암의 진행을 예방, 억제, 반전 또는 지연시킴에 의해서와 같이, 암을 개선할 목적으로, 브라큐리-발현 암을 가지는 개체에 제공된다. 일 측면에서, 효모-브라큐리 면역요법은 암 내 브라큐리 발현을 억제함으로써 전이성 암 내에서 일어날 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 억제, 감소 또는 제거하기 위하여 치료적으로 사용되고, 본 발명의 조성물은 개체 내 화학요법 또는 방사선 요법의 성능을 증진시킬 수 있다.

[0052] 전형적으로, 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 효모 베타글루칸 및 브라큐리 항원 또는 그의 면역원성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 암 항원을 포함하며, 상기 암 항원은 상기 효모 베타글루칸에 의하여 발현되거나, 이에 부착되거나, 그 안에 적재되거나, 그와 혼합된다. 일부 구현예에서, 상기 암 항원, 브라큐리 항원 또는 그의 면역원성 도메인은 융합 단백질로서 제공된다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기에 적합한 몇몇 브라큐리 단백질 및 융합 단백질을 이하 기재한다. 일부 구현예에서, 상기 암 항원 및 브라큐리 항원은 동일 요소이다. 일부 구현예에서, 상기 암 항원은 브라큐리 항원 외에 기타 암 항원을 포함하는 기타 항원을 포함한다. 본 발명의 일 측면에서, 암 항원으로서 유용한 융합 단백질은 2 이상의 항원, 예를 들어, 브라큐리 항원 및 브라큐리 항원이 아닌 다른 암 항원, 또는 두 개의 상이한 브라큐리 항원들을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 상기 융합 단백질은 브라큐리 항원의 2 이상의 면역원성 도메인과 같은 하나 이상의 항원의 2 이상의 면역원성 도메인, 또는 브라큐리 항원의 2 이상의 에피토프와 같은 하나 이상의 항원의 2 이상의 에피토프를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따르면, 효모-브라큐리 면역요법 조성물 내 사용되는 효모 베타글루칸은 본 발명의 조성물 (예를 들어, 치료적 또는 예방적 조성물) 내에 하나 이상의 항원, 그의 면역원성 도메인 또는 에피토프와 함께 사용될 수 있는 임의의 효모 세포 (예를 들어, 전체 또는 미손상 세포) 또는 이의 유도체 (이하 참조)이다. 상기 효모 베타글루칸은 따라서 이에 제한되지 않으나, 살아 있는 미손상 (전체) 효모 미생물 (즉, 세포벽을 포함하는 그의 모든 성분들을 가지는 효모 세포), 사멸된 또는 불활성화된 미손상 효모 미생물, 또는 효모 스페로플라스트 (즉, 세포벽을 결여하는 효모 세포), 효모 사이토플라스트 (즉, 세포벽 및 핵을 결여하는 효모 세포), 효모 고스트 (즉, 세포벽, 핵 및 세포질을 결여하는 효모 세포), 준세포 효모막 추출물 또는 이의 분획 (효모막 입자 및 이전에 준세포 효모 입자로도 불리움), 임의의 기타 효모 입자, 또는 효모 세포벽 제제를 포함하는 미손상 효모의 파생물을 포함할 수 있다.

[0054] 효모 스페로플라스트는 전형적으로 효모 세포벽의 효소 분해에 의하여 생산된다. 이러한 방법은 예를 들어 Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다.

[0055] 효모 사이토플라스트는 전형적으로 효모 세포의 핵 제거에 의하여 생산된다. 이러한 방법은 예를 들어 Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 그 전체로서 포

함된다.

- [0056] 효모 고스트는 전형적으로 투과화 또는 용해된 세포의 재밀봉에 의하여 생산되고, 그 세포의 세포소기관 중 일부를 함유할 수 있으나 그러할 필요는 없다. 이러한 방법은 예를 들어 Franzusoff et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614 및 Bussey et al., 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196에 기재되어 있으며, 상기 문헌들 각각은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다.
- [0057] 효모막 입자 (준세포 효모막 추출물 또는 그의 분획)는 천연 핵 또는 세포질을 결여하는 효모막을 의미한다. 상기 입자는 천연 효모막의 크기로부터 초음파 처리 또는 당업계에 공지된 기타 막 파괴 방법에 이은 재밀봉에 의하여 생산되는 미세입자 범위의 크기를 포함하는 입자의 크기일 수 있다. 준세포 효모막 추출물의 생산 방법은 예를 들어 Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674에 기재되어 있다. 효모막 부분을 함유하는 효모막 입자의 분획 또한 사용할 수 있으며, 효모막 입자 제조 전에 효모에 의하여 항원 또는 기타 단백질이 제조함에 의하여 발현될 때, 해당 항원 또는 기타 단백질을 사용할 수 있다. 해당 항원 또는 기타 단백질은 막 내부에, 막 표면 상에, 또는 이들 조합으로 (즉, 단백질이 막 내부 및 외부 모두에 및/또는 효모막 입자의 막에 걸쳐 있을 수 있음) 운반될 수 있다. 일 구현예에서, 효모막 입자는 막 표면 상에 또는 막 내에 적어도 부분적으로 매립되는 적어도 하나의 원하는 항원 또는 기타 해당 단백질을 포함하는 미손상, 파괴된 또는 파괴되고 재밀봉된 효모막일 수 있는 제조법 효모막 입자이다.
- [0058] 효모 세포벽 제제의 예는, 그 세포벽 제제가 동물에 투여될 때 질병 타겟에 대하여 원하는 면역 반응을 자극하도록, 그 표면 상에 또는 세포벽 내에 적어도 부분적으로 매립되는 항원을 수반하는 분리된 효모 세포벽 제제이다.
- [0059] 임의의 효모 균주를 이용하여 본 발명의 효모 베타클을 생산할 수 있다. 효모는 세 가지 강(class): 자낭균류(Ascomycetes), 담자균류(Basidiomycetes) 및 불완전 균류(Fungi Imperfecti) 중 하나에 속하는 단세포 미생물이다. 면역 조절제로서 사용하기 위한 효모 유형의 선택을 위한 한가지 고려는 효모의 병원성이다. 일 구현예에서, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비시애와 같은 비-병원성 균주이다. 비-병원성 효모 균주의 선택은 효모 베타클이 투여되는 개체에 부작용을 최소화한다. 그러나, 효모의 병원성이 당업계에 공지된 임의의 수단(예를 들어, 돌연변이 균주)에 의하여 무효화될 수 있다면, 병원성 효모를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따르면, 비-병원성 효모 균주가 사용된다.
- [0060] 본 발명에 사용될 수 있는 효모 균주의 속은 이에 제한되지 않으나, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 캔디다(*Candida*: 병원성일 수 있음), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 한세놀라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 시조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*) 및 야로이아(*Yarrowia*)를 포함한다. 일 측면에서, 효모 속은 사카로마이세스, 캔디다, 한세놀라, 피치아 또는 시조사카로마이세스로부터 선택되고, 일 측면에서, 사카로마이세스가 사용된다. 본 발명에 사용될 수 있는 효모 균주의 종은 이에 제한되지 않으나, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스버그젠시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 케플리(*Candida kefyr*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 크립토크커스 라우렌티(*Cryptococcus laurentii*), 크립토크커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 한세놀라 아노말라(*Hansenula anomala*), 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 클루이베로마이세스 프라길리스(*Kluyveromyces fragilis*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로마이세스 마르시아누스 var. 락티스(*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 로도토룰라 루브라(*Rhodotorula rubra*), 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 및 야로이아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)를 포함한다. 다수의 이들 종들은 상기 종들 내에 포함되는 것으로 의도되는 다양한 아종, 형, 아형, 등을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 일 측면에서, 본 발명에 사용되는 효모 종은 S. 세레비시애(*S. cerevisiae*), C. 알비칸스(*C. albicans*), H. 폴리모르파(*H. polymorpha*), P. 파스토리스(*P. pastoris*)를 포함하고, S. 폼베(*S. pombe*), S. 세레비시애(*S. cerevisiae*)가 조작이 비교적 용이하고 "일반적으로 안전한 것으로 인식되고" 있거나 또는 식품 첨가제로서 사용하기 위한 "GRAS" (GRAS, FDA proposed Rule 62FR18938, April 17, 1997)로 인식되고 있으므로 유용하다. 본 발명의 일 구현예는 S. 세레비시애 cir^0 균주와 같은, 특히 높은 복제수로 플라스미드를 복제할 수 있는 효모 균주이다. 상기 S. 세레비시애 균주는 하나 이상의 표적 항원(들) 및/또는 항원 융합 단백질(들) 및/또는 기타 단백질이 높은 수준으로 발현되도록 하는 발현 벡터를 지지할 수 있는 균주이다. 본 발명에 유용한 다른 효모 균주는 사카로마이세스 세레비시애 W303 α 이다. 또한, N-결합 글리코실화를 연장하는 효소 내 돌연변이와 같은, 발현된 표적 항원 또는 기타 단백질의 번역후 변경을 나타내는 것들을 포함하는, 임의의 돌연변이 효모 균주를

본 발명에 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 브라큐리 항원을 포함하는 적어도 하나의 암 항원을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본원에 사용되는 용어 "항원"은 자연 발생 또는 합성적으로 유도 또는 고안된 단백질의 임의의 부분 (예를 들어, 펩티드, 부분 단백질, 전장 단백질), 세포성 조성물 (전세포, 세포 용해물 또는 파괴된 세포), 유기체 (전유기체, 용해물 또는 파괴된 세포) 또는 탄수화물 또는 기타 분자 또는 그의 일부를 의미한다. 항원은 면역계의 요소 (예를 들어, T 세포, 항체)가 마주치는 동일 또는 유사 항원에 대하여 항원-특이적 면역 반응 (예를 들어, 체액성 및/또는 세포-중재 면역 반응)을 유발할 수 있다.

[0062] 항원은 단일 에피토프, 단일 면역원성 도메인과 같이 작거나 더 클 수 있으며, 복수의 에피토프 또는 면역원성 도메인을 포함할 수 있다. 이와 같이, 항원의 크기는 약 8-11 아미노산(즉, 펩티드)와 같이 작을 수 있고, 전장 단백질, 멀티머, 융합 단백질, 키메릭 단백질, 전세포, 전미생물, 또는 그의 일부 (예를 들어, 미생물 추출물 또는 전세포의 단백질 단편 (폴리펩티드) 용해물)와 같이 클 수 있다. 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법에 유용한 항원은 펩티드, 폴리펩티드, 전장 단백질, 멀티머, 융합 단백질 및 키메릭 단백질이다. 또한, 항원은 탄수화물을 포함할 수 있으며, 이는 효모 베타클 내로 또는 본 발명의 조성물 내로 적재될 수 있다. 일부 구현예에서 (예를 들어, 항원이 효모 베타클에 의하여 재조합 핵산 분자로부터 발현될 때), 상기 항원은 전세포 또는 미생물이기보다는 단백질, 융합 단백질, 키메릭 단백질, 또는 그의 단편인 것으로 이해될 것이다. 효모 내 발현을 위하여, 항원이 효모에 의하여 발현될 전체 단백질인 경우, 항원은 재조합에 의하여 발현될 수 있는 최소 크기이고, 전형적으로 적어도 25 또는 그보다 큰 아미노산 길이, 또는 적어도 26 또는 그보다 큰, 적어도 27 또는 그보다 큰, 적어도 28 또는 그보다 큰, 적어도 29 또는 그보다 큰, 적어도 30 또는 그보다 큰, 적어도 31 또는 그보다 큰, 적어도 32 또는 그보다 큰, 적어도 33 또는 그보다 큰, 적어도 34 또는 그보다 큰, 적어도 35 또는 그보다 큰, 적어도 36 또는 그보다 큰, 적어도 37 또는 그보다 큰, 적어도 38 또는 그보다 큰, 적어도 39 또는 그보다 큰, 적어도 40 또는 그보다 큰, 적어도 41 또는 그보다 큰, 적어도 42 또는 그보다 큰, 적어도 43 또는 그보다 큰, 적어도 44 또는 그보다 큰, 적어도 45 또는 그보다 큰, 적어도 46 또는 그보다 큰, 적어도 47 또는 그보다 큰, 적어도 48 또는 그보다 큰, 적어도 49 또는 그보다 큰, 또는 적어도 50 또는 그보다 큰 아미노산 길이이거나, 또는 적어도 25-50 또는 그보다 큰 아미노산 길이, 또는 적어도 30-50 또는 그보다 큰 아미노산 길이, 또는 적어도 35-50 또는 그보다 큰 아미노산 길이, 적어도 40-50 또는 그보다 큰 아미노산 길이, 또는 적어도 45-50 또는 그보다 큰 아미노산 길이나, 더 작은 단백질이 발현될 수 있고 현저히 더 큰 단백질 (예를 들어, 수백 아미노산 길이 또는 심지어 수천 아미노산 길이)이 발현될 수 있다. 일 측면에서, 전장 단백질 또는 N- 및/또는 C-말단으로부터 1 내지 20 아미노산을 결여하는 단백질이 발현될 수 있다. 융합 단백질 및 키메릭 단백질 또한 본 발명에서 발현될 수 있는 항원이다. "표적 항원"은 본 발명의 면역요법 조성물에 의하여 특이적으로 표적화되는 항원이다 (즉, 이에 대한 면역 반응 유발이 요구되는 항원). "암 항원"은 그 항원의 표적화가 또한 암을 표적화하도록, 종양 세포에 의하여 발현되는 항원과 같은 암과 관련되는 적어도 하나의 항원을 포함하는 항원이다. 암 항원은 하나 이상의 종양-관련 단백질을 포함하는, 하나 이상의 단백질로부터 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다. "브라큐리 항원"은 브라큐리 단백질로부터 유도, 고안 또는 생산되는 항원이다.

[0063] 면역 반응의 자극을 언급할 때, 용어 "면역원"은 용어 "항원"의 서브세트이며, 따라서, 일부 경우, 용어 "항원"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 본원에 사용되는 면역원은 그 면역원의 개체에 투여가 그 개체의 면역계가 마주치는 동일 또는 유사 항원에 대한 항원-특이적 면역 반응을 증가시키도록, 체액성 및/또는 세포-중재 면역 반응을 유발하는 (즉, 면역원성인) 항원을 기재한다. 일 구현예에서, 상기 면역원은 CD4+ T 세포 반응 (예를 들어, TH1, TH2 및/또는 TH17) 및/또는 CD8+ T 세포 반응 (예를 들어, CTL 반응)을 포함하는, 세포-중재 면역 반응을 유발한다.

[0064] 소정의 항원의 "면역원성 도메인"은 동물에 투여될 때 면역원으로 작용할 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 함유하는 항원의 단편 또는 에피토프 (예를 들어, 펩티드 단편 또는 서브유닛 또는 항체 에피토프 또는 기타 구조적 에피토프)일 수 있다. 따라서, 면역원성 도메인은 단일 아미노산보다 크고, 적어도 면역원으로 작용할 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 함유하기에 충분한 크기이다. 예를 들어, 단일 단백질은 복수의 상이한 면역원성 도메인들을 함유할 수 있다. 면역원성 도메인은 구조적 도메인이 고려되는 경우, 체액성 면역 반응의 경우와 같이, 단백질 내 선형 서열일 필요는 없다.

[0065] 본원에서 에피토프는 면역계의 적절한 공자극 신호 및/또는 활성화된 세포의 맥락에서 면역계에 제공될 때 면역 반응을 유발하기에 충분한 소정의 항원 내 단일 면역원성 부위로서 정의된다. 즉, 에피토프는 면역계의 성분에 의하여 인지되는 항원의 일부이며, 또한 항원성 결정 요인으로도 언급될 수 있다. 당업자는 T 세포 에피토프가 B 세포 또는 항체 에피토프와 크기 및 구성에 있어서 다르며, Class I MHC 경로를 통하여 제시되는 에피토프는

Class II MHC 경로를 통하여 제시되는 에피토프로부터의 크기 및 구조적 특성과 다름을 인식할 것이다. 예를 들어, Class I MHC 분자에 의하여 제시되는 T 세포 에피토프는 전형적으로 8 내지 11 아미노산 길이인 반면, Class II MHC 분자에 의하여 제시되는 에피토프는 길이가 덜 제한되고 25 아미노산 이하 또는 그보다 길 수 있다. 또한, T 세포 에피토프는 그 에피토프에 의하여 결합되는 특정 MHC 분자에 따라 구조적 특성을 예측하였다. 에피토프는 선형 서열 에피토프 또는 구조적 에피토프 (보존된 결합 영역)일 수 있다. 대부분의 항체는 구조적 에피토프를 인지한다.

[0066] 브라큐리 ("T"로도 언급될 수 있음)는 복수의 상이한 동물 종들 사이에서 고도로 보존된 단백질이며, 단백질의 T-박스 패밀리로 집약적으로 불리우는 몇몇 상이한 단백질들 사이에 공유되는 DNA-결합 도메인 모티프인 "T-박스" 도메인 또는 "T-도메인"을 함유하는 전사 인자이다. 인간 브라큐리는 1996년에 최초로 클로닝되었다 (Edwards et al., *supra*). 인간 브라큐리를 암호화하는 한 뉴클레오티드 서열은 본원에서, GENBANK® Accession No. NM_003181 (GI:19743811)로부터 얻어진 mRNA 서열인 서열 번호 1로 표시된다. 서열 번호 1은 435 아미노산 브라큐리 단백질을 암호화하고, 그 아미노산 서열은 본원에서 서열 번호 2로 표시된다 (GENBANK® Accession No. NP_003172; GI:4507339에서도 발견됨).

[0067] 본원에 개시되는 다른 인간 브라큐리 단백질은 서열 번호 2로 표시되는 인간 브라큐리 단백질의 변종이며, 서열 번호 6의 아미노산 서열을 가진다. 서열 번호 6은 또한 435 아미노산 단백질이며, 본원에서 서열 번호 5로 표시되는 뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화된다. 서열 번호 6은 단백질 전장에 걸쳐 서열 번호 2와 대략 99% 동일하다. 서열 번호 6은 서열 번호 2와 포지션 177 (Asp vs. Gly, 각각), 포지션 368 (Thr vs. Ser, 각각) 및 포지션 409 (Asn vs. Asp, 각각)에서 다르다.

[0068] 본원에 개시되는 다른 인간 브라큐리 단백질은 서열 번호 2 또는 서열 번호 6으로 표시되는 인간 브라큐리 단백질의 작용제이다. 본원에 일반적으로 사용되는 "작용제"는 제한없이, 수용체 또는 리간드에 결합하여 반응을 생산 또는 유발하는 소분자, 단백질, 펩티드, 항체, 핵산 결합체 등을 포함하는 임의의 화합물 또는 제제이며, 상기 수용체 또는 리간드에 결합하는 자연 발생 물질의 작용을 모방하거나 증진시키는 제제를 포함할 수 있다. 본 발명의 브라큐리 항원의 문맥에서 사용될 EO, "작용제" 항원 또는 단백질은 "미모토프(mimotope)"로도 언급될 수 있는, 적어도 하나의 T 세포 작용제 에피토프를 포함하는 항원 또는 단백질을 의미한다. 미모토프 펩티드는 야생형 에피토프의 구조를 모방하는 펩티드이며, 작용제로서, t아기 미모토프는 천연 에피토프의 작용 (생물학적 작용)을 모방하거나 증진한다. 예를 들어, 서열 번호 12 (WLLPGTSTL)의 아미노산 서열은 야생형 브라큐리 단백질의 T 세포 에피토프이다. 서열 번호 13 (WLLPGTSTV)의 아미노산 서열은 서열 번호 12의 T 세포 에피토프의 미모토프 또는 작용제이다.

[0069] 한가지 인간 브라큐리 작용제 항원은 본원에서 서열 번호 18로 표시된다. 서열 번호 18은 435 아미노산 단백질로, 본원에서 서열 번호 17로 표시되는 뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화된다. 서열 번호 18은 서열 번호 6에 대한 포지션 254에서 류신이 서열 번호 18에서 발린으로 치환된 것을 제외하고, 서열 번호 6과 동일하다. 이러한 치환은 이론에 구애됨이 없이 야생형 에피토프 (서열 번호 6의 포지션 246 내지 254)에 비하여 브라큐리에 대한 증진된 T 세포 반응을 유도하는 것으로 믿어지는, 서열 번호 18 내에 포지션 246 내지 254에서 T 세포 작용제 에피토프를 형성한다.

[0070] 서열 번호 2, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18 중 임의의 것의 포지션 41 내지 223은 인간 브라큐리의 T-박스 DNA 결합 도메인을 나타내며, 다른 종으로부터의 브라큐리 서열을 포함하는 다른 브라큐리 서열 내 T-박스 도메인은 이들 서열과의 비교에 의하여 쉽게 확인될 수 있다. 본원에 기재되거나 당업계에 공지되고 본 발명에서 이용되는 임의의 브라큐리 단백질의 T-박스 도메인에 대한 언급은 소정의 T-박스 도메인의 N-말단 및/또는 C-말단 상에 (예를 들어, 서열 번호 2, 6 또는 18의 포지션 41-223의 양면 상에) 브라큐리 서열의 부가적인 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40 연속 아미노산을 포함할 수 있다. 본원에 기재되는 두 개의 인간 브라큐리 단백질을 포함하는 인간 브라큐리는 또한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 에피토프를 함유할 수 있다. 이러한 에피토프는 예를 들어 WO 2008/106551에 기재되어 있으며, CD8+ CTL 에피토프, WLLPGTSTL (본원에서 Tp2, 서열 번호 12로도 언급됨)을 서열 번호 2 또는 서열 번호 6의 포지션 246 내지 254에 포함한다. 상기 논의한 바와 같이, 서열 번호 18은 본원에 서열 번호 13으로 표시되는 서열 번호 12의 작용제 에피토프를 포함한다.

[0071] 인간 브라큐리는 다른 동물 종들로부터의 브라큐리와 매우 높은 상동성을 가지며, 따라서 특히 이들 서열들이 동일하고 실질적으로 상동이며, 표적 항원 (예를 들어, 종양 세포에 의하여 발현되는 천연 브라큐리)에 대하여 효과적인 면역 반응을 유발시키는 경우, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 제조에 있어 다른 유기체

로부터의 브라큐리 서열을 이용할 수 있다. 예를 들어, Hermann 일등에 의하여 1990년에 (Hermann et al., *supra*) 최초로 클로닝된 쥐 브라큐리는 뉴클레오티드 수준에서 인간 브라큐리와 대략 85% 동일하고, 아미노산 수준에서 대략 91% 동일하다. 기타 동물들로부터의 브라큐리에 대하여, 아미노산 수준에서, 인간 브라큐리는 *Pan troglodytes*로부터의 브라큐리와 99.5% 동일하고, *Canis lupus familiaris*로부터의 브라큐리와 90.1% 동일하고, *Bos Taurus*로부터의 브라큐리와 88.5% 동일하고, *Rattus norvegicus*로부터의 브라큐리와 92.2% 동일하고, *Gallus gallus*로부터의 브라큐리와 80.9% 동일하다. T-박스 도메인을 함유하는 브라큐리의 아미노산 1-223 내에, 마우스 및 인간 브라큐리는 단지 두 개의 아미노산 (포지션 26 및 96에서)에 있어서만 다르다. 쥐 브라큐리를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 GENBANK® Accession No. NM_009309 (GI:118130357)으로부터 얻어진 mRNA 서열인 서열 번호 3으로 본원에서 표시된다. 서열 번호 3은 436 아미노산 쥐 브라큐리 단백질을 암호화하고, 그 아미노산 서열은 본원에서 서열 번호 4로 표시된다. 서열 번호 4의 포지션 41 내지 223은 쥐 브라큐리의 T-박스 DNA 결합 도메인을 나타낸다.

[0072] 본 발명의 일 구현예에서, 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 18, 또는 그의 적어도 하나의 면역원성 도메인으로 표시되는 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함한다. 일 구현예에서, 브라큐리 항원은 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 브라큐리의 면역원성 도메인들로 구성되거나 이를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에서, 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 아미노산 포지션 1 또는 2에서 C-말단에서 마지막 25 아미노산들 중 하나 사이 (즉, 서열 번호 2, 서열 번호 6, 또는 서열 번호 18의 포지션 441 내지 435 중 하나 사이, 또는 서열 번호 4의 포지션 442 내지 436 중 하나 사이)로 표시되는 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함한다. 본 발명에 사용가능한 다른 브라큐리 항원은 또한 브라큐리의 적어도 아미노산 포지션 1-223 (예를 들어, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 포지션 1-223) 또는 브라큐리의 포지션 41-223 (예를 들어, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 포지션 41-223)을 포함한다. 본 발명에 사용가능한 다른 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 적어도 아미노산 포지션 1 내지 85에서 포지션 255와 C-말단 사이를 포함한다. 본 발명에 사용가능한 다른 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 적어도 아미노산 포지션 1 내지 85에서 포지션 430과 C-말단 사이를 포함한다. 본 발명에 사용가능한 다른 브라큐리 항원은 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 적어도 아미노산 포지션 1,2,3,4,5,6,7,8,9 또는 10에서 포지션 255와 C-말단 사이를 포함한다.

[0073] 본 발명의 임의의 구현예에 따르면, "전장" 단백질 (또는 전장 기능적 도메인 또는 전장 면역학적 도메인)에 대한 참조는 본원에 기재되거나 공지되어 있거나 공개적으로 이용가능한 서열에 기재되어 있는 단백질 또는 기능적 도메인 또는 면역학적 도메인의 전장 아미노산 서열을 포함한다. 또한 단백질의 동족체 유형인 "거의 전장"인 단백질 또는 도메인은 그러한 전장 단백질 또는 전자 도메인의 N- 및/또는 C-말단으로부터의 1,2,3,4,5,6,7,8,9 또는 10 아미노산의 부가 또는 결실 또는 생략에 있어서 전장 단백질 또는 도메인과 다르다. 예로서, 상기 항원은 포지션 1에서 메티오닌을 생략하고 N-말단 펩티드를 치환하므로, 본원에 기재되는 몇몇 융합 단백질은 "거의 전장" 브라큐리 항원을 포함한다. 단백질 또는 도메인 또는 항원에 대한 일반적 언급은 전장 및 거의 전장 단백질 모두, 및 그의 기타 동족체를 포함할 수 있다.

[0074] 브라큐리 항원과 관련되는 임의의 구현예들의 일 측면에서, 암 항원 또는 브라큐리 항원은 상기 항원이 효모에 의하여 발현되도록 하기에 충분한 최소 크기이다. 효모 내 발현을 위하여, 단백질은 전형적으로 적어도 약 25 아미노산 길이이나, 더 작은 단백질이 발현될 수 있고 현저히 더 큰 단백질이 효모에 의하여 발현될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 사용할 수 있는 브라큐리 항원은 효모에 의하여 재조합적으로 발현될 수 있고, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18 중 임의의 것의 적어도 하나의 면역원성 도메인을 포함할 수 있는 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유하는 브라큐리 단백질의 단편이다. 일 측면에서, 이러한 항원은 적어도 25 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 측면에서, 이러한 항원은 30을 초과하는 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 측면에서, 이러한 항원은 적어도 25-50 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 측면에서, 이러한 항원은 적어도 30-50 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 측면에서, 이러한 항원은 적어도 35-50 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 측면에서, 이러한 항원은 적어도 40-50 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 측면에서, 이러한 항원은 적어도 45-50 아미노산 길이이고, 적어도 하나의 브라큐리의 면역원성 도메인을 함유한다. 일 구현예에서, 본 발명에 사용가능한 브라큐리 항원은 적어도 25 아미노산 길이, 또는 적어도: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215,

220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 또는 430 아미노산 길이이고, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 18의 이들 길 이들의 적어도 임의의 것의 임의의 단편을 포함할 수 있다.

[0075] 일 측면에서, 브라큐리 항원은 본원에 기재되는 CTL 에피토프 중 임의의 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 2 이상의 복사본을 포함할 수 있는, 하나 이상의 CTL 에피토프를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 하나 이상의 CD4+ T 세포 에피토프를 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 하나 이상의 CTL 에피토프 및 하나 이상의 CD4+ T 세포 에피토프를 포함한다. 일 측면에서, 상기 T 세포 에피토프는 작용제 에피토프이다.

[0076] 일 측면에서, 브라큐리 항원은 WLLPGTSTL (서열 번호 12, 서열 번호 2 또는 서열 번호 6의 포지션 245 내지 254 로도 표시됨)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 WLLPGTSTV (서열 번호 13, 서열 번호 18의 포지션 245 내지 254로도 표시됨)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 13의 포지션 4의 아미노산 (이들 서열에서 프롤린 또는 P)은 세린 (S), 트레오닌 (T), 이소류신 (I) 또는 발린 (V)으로 치환된다.

[0077] 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 WLLPGTSTV (서열 번호 14)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열 번호 14의 포지션 2의 아미노산 (이 서열에서 글루타민 또는 Q)은 류신 (L)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열 번호 14의 포지션 4의 아미노산 (이 서열에서 프롤린 또는 P)은 세린 (S), 트레오닌 (T), 류신 (L) 또는 발린 (V)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열 번호 14의 포지션 7의 아미노산 (이 서열에서 트립토판 또는 W)은 발린 (V), 류신 (L), 이소류신 (I), 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열 번호 14의 포지션 9의 아미노산 (이 서열에서 발린 또는 V)은 류신 (L)을 치환된다. 서열 번호 14 내 이들 치환 중 하나 이상의 조합을 가지는 서열을 포함하는 항원이 본 발명에서 고려된다.

[0078] 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 RLIASWTPV (서열 번호 15)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열 번호 15의 포지션 1의 아미노산 (이 서열에서 아르기닌 또는 R)은 티로신 (Y) 또는 트립토판 (W)으로 치환된다. 일 측면에서, 서열 번호 15의 포지션 6의 아미노산 (이 서열에서 트립토판 또는 W)은 발린 (V), 라이신 (L), 이소류신 (I), 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환된다. 서열 번호 15 내에 이들 치환들 중 하나 또는 둘 모두의 조합을 가지는 서열을 포함하는 항원이 본 발명에서 고려된다.

[0079] 일 측면에서, 상기 브라큐리 항원은 AMYSFLDFV (서열 번호 16)의 아미노산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 서열 번호 16의 포지션 2의 아미노산 (이 서열에서 메티오닌 또는 M)은 류신(L)으로 치환된다.

[0080] 본 발명의 일 구현예에서, 브라큐리 항원은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질로 구성되거나 필수적으로 구성되거나, 이를 포함한다. 서열 번호 8의 융합 단백질은 N-에서 C- 말단 프레임 내에 융합된 다음 서열 요소를 가지는 단일 폴리펩티드이다: (1) 단백질 분해효소 분해에 대한 내성을 부여하고 효모 내 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩티드 (서열 번호 8의 포지션 1-6); (2) 서열 번호 6의 포지션 2-435(서열 번호 8의 포지션 7-440)로 구성되는 인간 브라큐리 항원; 및 (3) 헥사히스티딘 태그 (서열 번호 8의 포지션 441-446). 서열 번호 8의 아미노산 서열은 서열 번호 8의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화된다.

[0081] 본 발명의 다른 구현예에서, 브라큐리 항원은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질로 구성되거나 필수적으로 구성되거나, 이를 포함한다. 서열 번호 10의 융합 단백질은 N-에서 C-말단의 프레임 내에 융합되는 다음 서열 요소를 가지는 단일 폴리펩티드이다: (1) 단백질 분해효소 분해에 대한 내성을 부여하고 효모 내 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩티드 (서열 번호 10의 포지션 1-6); (2) 서열 번호 4의 포지션 2-436(서열 번호 10의 포지션 7-441)으로 구성되는 쥐 브라큐리 항원; 및 (3) 헥사히스티딘 태그 (서열 번호 10의 포지션 442-447). 서열 번호 10의 아미노산 서열은 서열 번호 9의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화된다.

[0082] 본 발명의 다른 구현예에서, 브라큐리 항원은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질로 구성되거나 필수적으로 구성되거나, 이를 포함한다. 서열 번호 20의 융합 단백질은 N-에서 C-말단의 프레임 내에 융합되는 다음 서열 요소를 가지는 단일 폴리펩티드이다: (1) 단백질 분해효소 분해에 대한 내성을 부여하고 효모 내 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩티드 (서열 번호 20의 포지션 1-6, 본원에서 서열 번호 11로도 표시되는 펩티드 서열); (2) 서열 번호 18의 아미노산 2-435(서열 번호 20의 포지션 7-440), 서열 번호 18은 전장 인간 브라큐리 작용제 단백질을 나타냄; 및 (3) 헥사히스티딘 태그 (서열 번호 20의 포지션 441-446). 상기 작용제 에피토프 (서열 번호 13)는 서열 번호 20의 포지션 251 내지 259 (서열 번호 18의 포지션 246 내지 254)에 위치한다. 서열 번호 20의 아미노산 서열은 서열 번호 19의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화된다.

- [0083] 본 발명에 사용가능한 브라큐리 항원은 또한 그 단백질 전장에 걸쳐 또는 그 단백질의 일부를 형성하는 그의 소정의 단편 또는 도메인 (예를 들어, 면역학적 도메인 또는 기능적 도메인 (적어도 하나의 생물학적 활성을 가지는 도메인))에 있어서 본원에 기재되는 브라큐리 단백질 또는 항원들중 임의의 것의 아미노산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재되는 브라큐리 단백질의 도메인은 T-박스 도메인을 포함한다. 면역학적 도메인이 앞에 상세히 기재되었다.
- [0084] 본 발명의 일부 측면에서, 결과적인 브라큐리 단백질이 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물 내에 항원으로 사용될 때, 증진된 면역 반응, 감소된 면역 반응 또는 실질적으로 유사한 면역 반응을 포함하는 야생형 또는 표준 브라큐리 단백질로서 천연 브라큐리 단백질에 대하여 면역 반응을 유발한다면, 야생형 또는 표준 브라큐리 단백질의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 아미노산에 대하여 아미노산 삽입, 결실 및/또는 치환이 행하여질 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 MHC 분자 또는 MHC 제시 맥락에서 에피토프를 인식하는 T 세포 수용체에 대한 에피토프의 결합력 또는 친화성을 개선시킴에 의해서와 같이, 브라큐리 작용제에 대한 T 세포 반응을 증진시키도록 돌연변이된 하나 이상의 T 세포 에피토프를 포함할 수 있는, 브라큐리 작용제 항원의 사용을 포함한다. 브라큐리 작용제는 따라서, 중앙 세포에 의하여 발견되는 천연 브라큐리에 대한 T 세포 반응의 잠재성 또는 효능을 개선할 수 있다. 서열 번호 18의 아미노산 서열을 가지는 브라큐리 항원은 브라큐리 작용제 (또는 작용제 에피토프를 포함하는 브라큐리 항원)의 비제한적 예이다.
- [0085] 또한, 서열 번호 8, 서열 번호 10, 또는 서열 번호 20의 융합 단백질에 대하여 앞서 기재한 것들과 같은, N-말단 발현 서열 및 C-말단 태그는 임의적이거나, 발현, 안정성을 개선하거나 보조하고 및/또는 단백질 동정 및/또는 정제를 허용하기 위하여 본원에 다른 곳에 기재된 몇몇 상이한 서열들로부터 선택될 수 있다. 또한, 효모 내 사용에 적합한 많은 상이한 프로모터들이 당업계에서 공지되어 있다. 나아가, 짧은 매개 링커 서열 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 아미노산 펩티드)을 클로닝 촉진을 위하여, 숙주 세포 단백질 분해효소를 위한 절단 부위로서, 단백질 또는 항원 프로세싱 가속화를 위하여, 및 구조물의 향후 조작을 위하여 제한 효소 부위의 도입을 포함하는 다양한 이유로 브라큐리 항원을 포함하는 융합 단백질의 부분들 사이에 도입할 수 있다.
- [0086] 임의로, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 성분으로 사용되는 융합 단백질을 포함하는 단백질을 효모 내 이중 항원의 발현을 개선 또는 안정화하는데 특히 유용한 항원 구조물을 사용하여 생산한다. 일 구현예에서, 원하는 항원성 단백질(들) 또는 펩티드(들)가 그들의 아미노-말단에서 (a) 효모 베헤클 내 융합 단백질의 발현을 안정화하거나 발현된 융합 단백질의 번역후 변형을 방지하는 특정 합성 펩티드 (이러한 펩티드들은 예를 들어 2004.8.12에 공개된 미국 특허 공보 제 2004-0156858 A1에 상세히 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다); (b) 이에 제한되지 않으나 효모 알파 인자 리더 서열을 포함하는 내생 효모 단백질의 적어도 일부 - 여기서 융합 파트너는 효모 내 단백질 발현의 개선된 안정성을 제공하고 및/또는 효모 세포에 의한 단백질의 번역후 변형을 방지한다 (이러한 단백질은 또한 미국 특허 공보 제 2004-0156858 A1, supra에 상세히 기재되어 있다); 및/또는 (c) 융합 단백질이 효모 표면 상에 발현되도록 하는 효모 단백질의 적어도 일부 (예를 들어, 본원에 보다 상세히 기재되는 Aga 단백질)에 융합된다. 또한, 본 발명은 임의로 특히 단백질의 선별 및 동정에 사용하기 위한, 항원-암호화 구조물의 C-말단에 융합되는 펩티드의 용도를 포함한다. 이러한 펩티드는 이에 제한되지 않으나, 펩티드 태그 (예를 들어, 6X His 또는 헥사펩티드) 또는 임의의 기타 짧은 에피토프 태그와 같은 합성 또는 천연 펩티드를 포함한다. 본 발명에 따른 항원의 C-말단에 부착되는 펩티드는 상기 논의된 N-말단 펩티드의 첨가와 함께 또는 첨가없이 사용될 수 있으며, 그 반대 또한 마찬가지이다.
- [0087] 일 구현예에서, 효모 내에 발현될 융합 단백질 내에 유용한 합성 펩티드가 항원의 N-말단에 연결되며, 상기 펩티드는 상기 항원에 이중인 적어도 두 개의 아미노산 포지션으로 이루어지고, 상기 펩티드는 상기 효모 베헤클 내 융합 단백질의 발현을 안정화하거나 발현된 융합 단백질의 번역후 변형을 예방한다. 상기 합성 펩티드 및 항원의 N-말단은 함께 다음 요구 조건을 가지는 융합 단백질을 형성한다: (1) 상기 융합 단백질의 포지션 1에서 아미노산 잔기는 메티오닌이다 (즉, 합성 펩티드 내 첫번째 아미노산은 메티오닌이다); (2) 융합 단백질의 포지션 2에서 아미노산 잔기는 글리신 또는 프롤린이 아니다 (즉, 합성 펩티드 내 두번째 아미노산은 글리신 또는 프롤린이 아니다); (3) 융합 단백질의 포지션 2-5에서 아미노산 포지션들중 어느 것도 메티오닌이 아니다 (즉, 합성 펩티드가 6 아미노산 보다 짧다면, 합성 펩티드 또는 단백질의 일부이든, 포지션 2-6의 아미노산은 메티오닌을 포함하지 않는다); 및 (4) 융합 단백질의 포지션 2-6에서 아미노산들 중 어느 것도 라이신 또는 아르기닌이 아니다 (즉, 합성 펩티드가 5 아미노산 보다 짧다면, 합성 펩티드 또는 단백질의 일부이든, 포지션 2-6의 아미노산은 라이신 또는 아르기닌을 포함하지 않는다). 상기 합성 펩티드는 2 아미노산과 같이 짧을 수 있으나, 일 측면에서, 2-6 아미노산 (3,4,5 아미노산을 포함)이며, 6 아미노산 이상, 정수로서 약 200 아미노산 이하,

300 아미노산, 400 아미노산, 500 아미노산 또는 그 이상일 수 있다.

[0088] 일 구현예에서, 융합 단백질은 M-X2-X3-X4-X5-X6의 아미노산 서열을 포함하고, M은 메티오닌이고; X2는 글리신, 프롤린, 라이신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고; X3은 메티오닌, 라이신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고; X4는 메티오닌, 라이신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고; X5는 메티오닌, 라이신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이고; X6은 메티오닌, 라이신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산이다. 일 구현예에서, 상기 X6 잔기는 프롤린이다. 효모 세포 내 항원의 발현의 안정성을 증진시키고 및/또는 효모 내 단백질의 번역후 변형을 방지하는 예시적 합성 서열은 서열 M-A-D-E-A-P (서열 번호 11로 표시됨)을 포함한다. 발현 생성물의 증진된 안정성 외에도, 이러한 융합 파트너는 구조물 내 번역화 항원에 대한 면역 반응에 부정적으로 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 또한, 상기 합성 융합 펩티드는 항체와 같은, 선택 제제에 의하여 인식될 수 있는 에피토프를 제공하도록 고안될 수 있다.

[0089] 본 발명의 일 측면에서, 상기 효모 베타글루칸 항원이 효모 베타글루칸 표면 상에서, 부분적으로 또는 전체적으로, 발현된 단백질 생성물의 전달 또는 전좌에 의하여 발현 또는 제공되도록 조작된다 (세포외 발현). 본 발명의 이러한 측면을 달성하기 위한 한가지 방법은 효모 베타글루칸 표면 상에 하나 이상의 단백질(들)을 배치하기 위한 스페이서 암을 사용하는 것이다. 예를 들어, 해당 항원(들) 또는 기타 단백질을 효모 세포벽에 표적화하는 단백질을 가지는 해당 항원(들) 또는 기타 단백질의 융합 단백질을 생산하기 위하여 스페이서 암을 사용할 수 있다. 예를 들어, 기타 단백질 표적화에 사용될 수 있는 그러한 한가지 단백질은 항원 또는 기타 단백질이 효모 표면 상에 위치하도록 항원(들) 또는 기타 단백질이 효모 세포벽에 표적화될 수 있도록 하는 효모 단백질이다 (예를 들어, 세포벽 단백질 2(cwp2), Aga2, Pir4 또는 Flo1 단백질). 효모 단백질 이외의 단백질들을 스페이서 암에 사용할 수 있다; 그러나, 스페이서 암 단백질의 경우, 면역 반응이 스페이서 암 단백질보다 표적 항원에 대하여 일어나는 것이 가장 바람직하다. 이와 같이, 기타 단백질이 스페이서 암에 사용되는 경우, 사용되는 스페이서 암 단백질은 표적 항원(들)에 대한 면역 반응을 압도할 정도로 스페이서 암 단백질 자체에 대한 큰 면역 반응을 생성하지 않아야 한다. 당업자는 표적 항원(들)에 대한 면역 반응에 대하여 스페이서 암 단백질에 대한 적은 면역 반응을 추구하여야 한다. 스페이서 암은, 원한다면 항원이 효모로부터 쉽게 제거되거나 떨어져 가공되도록 하는 절단 부위 (예를 들어, 단백질 분해효소 절단 부위)를 가지도록 작제될 수 있다. 면역 반응의 크기를 결정하는 임의의 공지 방법을 사용할 수 있으며 (예를 들어, 항체 생산, 용균 분석 등), 이는 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0090] 표적 항원(들) 또는 기타 단백질을 효모 표면 상에 노출되도록 배치하는 다른 방법은 상기 표적을 효모 세포벽에 앵커링하기 위한 글리코실포스파티딜이노시톨 (GPI)과 같은 신호 서열을 사용하는 것이다. 대안적으로, 배치는 항원이 세포벽에 결합되는 단백질에 결합하도록, 소포체 (ER) 내로 전좌를 통하여 전좌를 통하여 분비 경로 내로 해당 항원(들) 또는 기타 단백질을 표적화하는 신호 서열을 첨부함으로써 달성될 수 있다 (예를 들어, cwp).

[0091] 일 측면에서, 스페이서 암 단백질은 효모 단백질이다. 효모 단백질은 약 2 내지 약 800 아미노산의 효모 단백질로 구성될 수 있다. 일 구현예에서, 효모 단백질은 약 10 내지 700 아미노산이다. 다른 구현예에서, 효모 단백질은 약 40 내지 600 아미노산이다. 본 발명의 기타 구현예들은 적어도 250 아미노산, 적어도 300 아미노산, 적어도 350 아미노산, 적어도 400 아미노산, 적어도 450 아미노산, 적어도 500 아미노산, 적어도 550 아미노산, 적어도 600 아미노산, 또는 적어도 650 아미노산인 효모 단백질을 포함한다. 일 구현예에서, 효모 단백질은 적어도 450 아미노산 길이이다. 항원 표면 발현 최적화가 바람직하다면 이를 위한 다른 고려는, 항원 및 스페이서 암 조합이 모노머 또는 다이머 또는 트라이머로서, 또는 더 많은 함께 연결된 단위로서 발현되어야 하는 것인가이다. 모노머, 다이머, 트라이머 등의 사용은 더욱 면역원성으로 되게 하는 방식으로 항원의 전부는 아니더라도 일부가 효모 베타글루칸 표면 상에 드러나도록 항원의 적절한 스페이싱 또는 폴딩을 허용한다.

[0092] 효모 단백질의 사용은 효모 베타글루칸 내 융합 단백질의 발현을 안정화하고, 발현된 융합 단백질의 번역후 변형을 방지하고, 및/또는 융합 단백질을 효모 내 특정 구획으로 표적화할 수 있다 (예를 들어, 효모 세포 표면 상에 발현되도록). 효모 분비 경로 내로의 전달을 위하여, 사용되는 예시적 효모 단백질은 이에 제한되지 않으나: Aga (이에 제한되지 않으나, Aga1 및/또는 Aga2를 포함); SCU2 (효모 전좌효소); 알파 팩터 신호 리더 서열; CPY; 세포벽 내 정위 및 유지를 위한 Cwp2p; 딸세포 형성의 초기 단계 동안 효모 세포 버드(bud)에 정위를 위한 BUD 유전자; Flo1p; Pir2p; 및 Pir4p를 포함한다.

[0093] 기타 서열을 사용하여 단백질을 효모 베타글루칸의 다른 부분들에, 예를 들어, 시토졸 또는 미토콘드리아 또는 소포체 또는 핵 내에 표적화, 유지 및/또는 안정화할 수 있다. 상기 구현예들에 사용될 수 있는 적합한 효모 단백질

의 예는 이에 제한되지 않으나, TK, AF, SEC7; 글루코오스 및 세포질 정위에서 그들의 억제가능한 발현을 위한 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제 PCK1, 포스포글리세로키나아제 PGK 및 트리오스 포스페이트 이소머라아제 TPI 유전자 생성물; 열 처리에 세포 노출시 그 발현이 유도되고 그 단백질이 더 열안정성인, 열 충격 단백질 SSA1, SSA3, SSA4, SSC1; 미토콘드리아 내로 들어오기 위한 미토콘드리아 단백질 CYC1; ACT1을 포함한다.

[0094] 효모 베타클의 제조 및 효모 베타클을 해당 항원 및/또는 기타 단백질 및/또는 제제와 발현, 조합 및/또는 결합 시켜 효모-기재 면역요법 조성물을 생산하는 방법들이 본 발명에서 고려된다.

[0095] 본 발명에 따르면, 용어 "효모 베타클-항원 복합체" 또는 "효모-항원 복합체"는 효모 베타클과 항원과의 결합을 기재하기 위하여 일반적으로 사용되며, 그 조성물이 상기한 바와 같이 면역 반응을 유발시키기 위하여 사용될 때 "효모-기재 면역요법 조성물"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 이러한 결합은 효모(제조합 효모)에 의한 항원의 발현, 항원의 효모 내로의 도입, 항원의 효모에의 물리적 부착, 및 완충액 또는 기타 용액 또는 제제 내에서와 같은, 효모 및 항원의 혼합을 포함한다. 이러한 유형의 복합체들을 이하 상세히 기재한다.

[0096] 일 구현예에서, 효모 베타클 제조에 사용되는 효모 세포가 단백질(즉, 항원)을 암호화하는 이중 핵산 분자로 그 단백질이 상기 효모 세포에 의하여 발현되도록 형질감염된다. 이러한 효모는 또한 본원에서 재조합 효모 또는 재조합 효모 베타클로도 언급된다. 상기 효모 세포는 다음, 약학적으로 허용가능한 부형제로 제제화되고, 환자에 직접 투여되거나, 추후 투여를 위하여 저장되거나, 미손상 세포로서 수지상 세포 내로 적재될 수 있다. 상기 효모 세포는 또한 사멸되거나, 또는 효모 스페로플라스트, 시토플라스트, 고스트 또는 준세포 입자의 형성에 의해서와 같이 파생화될 수 있으며, 이들 중 임의의 것을 이어서 저장, 투여, 또는 수지상 세포 내로 적재할 수 있다. 효모 스페로플라스트는 또한 항원을 발현하는 재조합 스페로플라스트를 생산하기 위하여 재조합 핵산 분자로 직접 형질전환될 수 있다 (예를 들어, 스페로플라스트가 전효모로부터 생산된 다음, 형질감염된다). 항원(들)을 재조합에 의하여 발현하는 효모 세포 또는 효모스페로플라스트를 사용하여 효모 사이토플라스트, 효모 고스트, 또는 효모 막 입자 또는 효모 세포벽 입자, 또는 이의 분획을 포함하는 효모 베타클을 생산할 수 있다.

[0097] 일반적으로, 효모 베타클 및 항원(들) 및/또는 기타 제제들을 본원에 기재된 임의의 기술에 의하여 결합시킬 수 있다. 일 측면에서, 효모 베타클을 항원(들) 및/또는 제제(들)과 세포 내 적재하였다. 다른 측면에서, 항원(들) 및/또는 제제(들)을 효모 베타클에 공유결합 또는 비-공유결합에 의하여 부착하였다. 또 다른 측면에서, 효모 베타클 및 항원(들) 및/또는 제제(들)을 혼합에 의하여 결합하였다. 다른 측면에서, 및 일 구현예에서, 항원(들) 및/또는 제제(들)을 효모 베타클에 의하여 또는 이로부터 효모 베타클이 유도되는 효모 세포 또는 효모 스페로플라스트에 의하여 재조합에 의하여 발현시켰다.

[0098] 본 발명의 효모 베타클에 의하여 생산될 항원 및/또는 기타 단백질의 수는 효모 베타클에 의하여 합리적으로 생산될 수 있는 항원 및/또는 기타 단백질의 수이며, 전형적으로, 약 2 내지 약 6 항원 및 또는 기타 단백질을 포함하는, 적어도 1 내지 적어도 약 6 이상의 범위이다.

[0099] 본 발명의 효모 베타클 내 항원 또는 기타 단백질의 발현은 당업계에서 공지된 임의의 기술을 사용하여 달성된다. 간략히, 적어도 하나의 원하는 항원 또는 기타단백질을 암호화하는 핵산 분자를, 숙주 효모 세포 내로 형질전환될 때 핵산 분자의 구성적 또는 조절된 발현을 실행할 수 있도록 하기 위하여, 핵산 분자가 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 방식으로 발현 벡터 내로 삽입한다. 하나 이상의 항원 및/또는 기타 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 하나 이상의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 하나 이상의 발현 벡터 상에 있을 수 있다. 특히 중요한 발현 조절 서열은 프로모터 및 업스트림 활성화 서열과 같은, 전사 개시를 조절하는 것들이다. 임의의 적합한 효모 프로모터를 본 발명에 사용할 수 있으며, 많은 그러한 프로모터들이 당업계에 공지되어 있다. 사카로마이세스 세레비시에 내 발현을 위한 프로모터는 이에 제한되지 않으나, *ADH2/GAPDH* 및 *CYC1/GAL10* 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터, 세포 내 글루코오스 농도가 낮을 때 (예를 들어, 약 0.1 내지 약 0.2%) 유도되는 *ADH2/GAPDH* 프로모터, 및 *CUP1* 프로모터 및 *TEF2* 프로모터를 포함하는, 다음 효모 단백질들을 암호화하는 유전자들의 프로모터들을 포함한다: 알콜 디하이드로게나아제 I (ADH1) 또는 II (ADH2), CUP1, 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK), 트리오스 포스페이트 이소머라아제 (TPI), 번역 신장 인자 EF-1 알파 (TFE2), 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나아제 (GAPDH: 트리오스 포스페이트 디하이드로게나아제에 대하여, TDH3으로도 언급됨), 갈락토키나아제 (GAL1), 갈락토오스-1-포스페이트 우리딜-트랜스퍼라아제 (GAL7), UDP-갈락토오스 에피머라아제 (GAL10), 시토크롬 c1 (CYC1), Sec7 단백질 (SEC7) 및 액시드 포스파타아제 (PHO5). 마찬가지로, 많은 인핸서로도 언급되는 업스트림 활성화 서열 (UASs)이 공지되어 있다. 사카로마이세스 세레비시에 내 발현을 위한 업스트림 활성화 서열은 이에 제한되지 않으나, 다음 단백질들을 암호화하는 유전자들의 UASs: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 및 GAL10, 및 GAL4 유전자 생성물에 의하여 활성화되는

기타 UASs을 포함하며, ADH2 UAS가 일 측면에서 사용된다. ADH2 UAS는 ADR1 유전자 생성물에 의하여 활성화되므로, 이중 유전자가 ADH2 UAS에 작동가능하게 연결될 때 ADR1을 과발현시키는 것이 바람직할 것이다. 사카로마이세스 세레비시에 내 발현을 위한 전사 종결 서열은 α -인자, GAPDH, 및 CYC1 유전자의 종결 서열들을 포함한다.

[0100] 메틸트록픽 효모 내 유전자 발현을 위한 전사 조절 서열은 알콜 옥시다아제 및 포르메이트 디하이드로게나아제를 암호화하는 유전자들의 전사 조절 영역들을 포함한다.

[0101] 본 발명에 따른 효모 세포 내로 핵산 분자의 형질감염은 핵산 분자가 세포 내로 도입될 수 있는 임의의 방법에 의하여 달성될 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 확산, 능동 수송, 욕 초음파처리, 전기천공, 미세주입, 리포펙션, 흡착, 및 프로토플라스트 융합을 포함한다. 형질감염된 핵산 분자는 당업자에 공지된 기술을 이용하여 효모 염색체 내로 통합되거나 또는 염색체의 벡터 상에 유지될 수 있다. 그러한 핵산 분자를 운반하는 효모 벡히클의 예는 본원에 상세히 개시되어 있다. 상기 논의한 바와 같이, 효모 사이토플라스트, 효모 고스트, 및 효모 막 입자 또는 세포벽 제제는 또한 미손상 효모 미생물 또는 효모 스페로플라스트를 원하는 핵산 분자로 형질감염시키고, 그 안에 항원을 생산한 다음, 상기 미생물 또는 스페로플라스트를 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 추가로 조작하여 원하는 항원 또는 기타 단백질을 함유하는 사이토플라스트, 고스트 또는 준세포 효모 막 추출물 또는 그의 분획을 생산함으로써 재조합에 의하여 생산될 수 있다

[0102] 재조합 효모 벡히클의 생산 및 상기 효모 벡히클에 의한 항원 및/또는 기타 단백질의 발현을 위한 효과적인 조건들은 그 안에 효모 균주가 배양될 수 있는 효과적인 배지를 포함한다. 효과적인 배지는 전형적으로 동화가능한 탄수화물, 질소 및 인산 공급원, 및 적절한 염, 미네랄, 금속 및 비타민 및 성장 인자와 같은 기타 영양분을 포함하는 수성 배지이다. 상기 배지는 복합 영양분을 포함할 수 있거나 또는 소정의 최소 배지일 수 있다. 본 발명의 효모 균주는 이에 제한되지 않으나 생물반응기, 삼각 플라스크, 시험관, 마이크로티터 디쉬 및 페트리 플레이트를 포함하는 다양한 용기들 내에서 배양될 수 있다. 배양은 효모 균주에 적합한 온도, pH, 및 산소 함량에서 수행된다. 그러한 배양 조건들은 당업자의 전문 지식 범위 내이다 (예를 들어, Guthrie et al. (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego 참조). 예를 들어, 하나의 프로토크콜 하에, 적절한 배지를 함유하는 배양액을 스타터 플레이트 및/또는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 스타터 배양액으로부터 얻어진 배양액을 이용하여 접종할 수 있으며, 250 rpm에서 교반하면서 대략 30°C에서 20 시간 동안 성장시킨다. 다음, 1차 배양을 원하는 더 큰 배양으로 확대시킬 수 있다. 효모가 형질전환된 벡터로부터의 단백질 발현 (예를 들어, 브라큐리 발현)은 사용되는 프로모터가 구성적 프로모터인 경우 구성적일 수 있거나, 또는 사용되는 프로모터가 유도성 프로모터 (예를 들어, CUP1 프로모터의 경우 황산구리)인 경우 그 프로모터에 대한 적합한 유도 조건의 첨가에 의하여 유도될 수 있다. 유도성 프로모터의 경우, 단백질 발현의 유도는 배양액이 약 0.2 Y.U./ml 또는 그 이상의 밀도일 수 있는 적합한 세포 밀도로 성장된 후 개시될 수 있다.

[0103] 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 배양에 적합한 배지의 비-제한적인 예의 한가지는 U2 배지이다. U2 배지는 다음 성분들을 포함한다: 글루코오스 20g/L, 황산암모늄을 함유하는 효모 질소 베이스 6.7g/L, 및 히스티딘, 류신, 트립토판, 및 아데닌 각각 0.04 mg/mL. 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 배양에 적합한 다른 비제한적 예는 UL2 배지이다. UL2 배지는 다음 성분들을 포함한다: 글루코오스 20g/L, 황산 암모늄을 함유하는 효모 질소 베이스 6.7 g/L, 및 히스티딘, 트립토판 및 아데닌 각각 0.04 mg/mL.

[0104] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명에 따른 효모 벡히클 내 브라큐리 단백질 발현을 위하여 유도성 프로모터(예를 들어, CUP1 프로모터)가 사용되는 경우, 단백질 발현의 유도는 그러한 프로모터를 이용하여 효모에 의하여 발현되는 대부분의 단백질에 적합할 세포 밀도에 비하여 더 높은 세포 밀도에서 개시된다. 더 구체적으로, 본 발명자들은 효모 내 브라큐리 항원 발현을 유도하기 전에, 브라큐리 항원을 발현하는 효모가 적어도 0.5 Y.U./ml 내지 대략 2.0 Y.U./ml 사이, 일 측면에서 0.5 Y.U./ml 내지 대략 1.5 Y.U./ml, 및 일 측면에서 적어도 1.0 Y.U./ml 내지 약 2.0 Y.U./ml, 및 다른 측면에서 적어도 약 1.0 Y.U./ml의 세포 밀도로 성장되면, CUP1 프로모터에 의하여 구동되는 최적의 브라큐리 항원 발현이 일어남을 발견하였다. 본 발명자들은 브라큐리 발현 유도에 이어, 효모가 1X 내지 1.5X로 배가할 뿐임을 발견하였다. 또한, 브라큐리 발현 유도 후, 약 2.0 Y.U./ml 보다 높은 세포 밀도로, 또는 약 6-8 시간 보다 긴 시간 동안 효모의 성장은 효모 내 항원 축적을 실질적으로 개선시키지 않으면서 배양액의 생존률 감소를 초래함을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 일 구현예에서, CUP1 프로모터와 같은 유도성 프로모터의 조절 하에 항원 발현되는 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 항원 발현 유도 전에 대수증식기 중기(mid-log growth phase)로 성장한다. 일 측면에서, 세포들은 항원 발현 유도 전에 약 1 내지 2 Y.U./ml로 성장한다. 일 측면에서, 항원 발현이 유도되고 (예를 들어, 황산구리 첨가에 의하여) 6, 6.5, 7, 7.5, 또는 8 시간 이하 동안 계속된다. 일 측면에서, 상기 유도는 약 30°C의 온도 및 250 rpm의 교반 속도에

서 일어난다.

[0105] 본 발명의 일부 구현예에서, 효모는 중성 pH 조건 하에 성장한다. 본원에 사용되는 용어 "중성 pH"는 약 pH 5.5 내지 약 pH 8 사이, 및 일 측면에서 약 pH 6 내지 약 8 사이의 pH 범위를 의미한다. 당업자는 pH계로 측정시 작은 변동 (DP를 들어, 10분의 1, 100분의 1)이 일어날 수 있음을 인식할 것이다. 이와 같이, 효모 세포 성장을 위한 중성 pH의 사용은 효모 세포가 그들이 배양 중인 시간의 대부분 동안 중성 pH에서 성장함을 의미한다. 일 구현예에서, 효모는 적어도 5.5의 pH 수준에서 유지되는 배지 내에 성장한다 (즉, 배지의 pH는 pH 5.5 이하로 떨어지지 않도록 된다). 다른 측면에서, 효모는 약 6, 6.5, 7, 7.5 또는 8로 유지되는 pH 수준에서 성장한다. 효모 배양에 중성 pH의 사용은 면역조정을 위한 베타클로르 효모의 사용에 대한 바람직한 특징인 몇몇 생물학적 효과를 촉진시킨다. 예를 들어, 중성 pH에서 효모의 배양은 세포 발생 시간에 대한 부정적 영향 (예를 들어, 배가 시간 감소) 없이 효모의 우수한 성장을 허용한다. 효모는 그들의 세포벽 유연성 손실없이 도밀도로 계속하여 성장할 수 있다. 중성 pH의 사용은 모든 수확 밀도에서 유연성 세포벽을 가지는 효모 및/또는 세포벽 소화 효소 (예를 들어, 글루카나아제)에 더 민감한 효모의 생산을 허용한다. 유연성 세포벽을 가지는 효모는, 예를 들어, 효모를 식균작용한 항원 제시 세포에 의하여 사이토카인 (예를 들어, 이에 제한되지 않으나, IFN- γ , 인터류킨-12 (IL-12) 및 IL-2, 및 IL-6과 같은 염증성 사이토카인을 포함하는 TH1-형 사이토카인) 분비를 촉진시킴으로써, 더 산성 조건 하에 성장한 효모와 비교하여 상이하거나 개선된 면역 반응을 유도할 수 있으므로, 이러한 특징을 바람직하다. 또한, 세포벽 내에 위치하는 항원에 대한 더 큰 접근성이 이러한 배양 방법에 의하여 제공된다. 다른 측면에서, 일부 항원에 대한 중성 pH의 사용은 그러한 항원 발현 효모가 더 낮은 pH (예를 들어, pH 5)에서 배지 내에서 배양될 때 가능하지 않은, 디티오프라이트 (DTT) 처리에 의한 디-설파이드 결합된 항원의 배출을 허용한다.

[0106] 일 구현예에서, 효모 글리코실화 양의 조절을 이용하여 효모에 의한 특히 표면 상에 항원 발현을 조절한다. 슈가 모이어티는 별키한 경향이 있으므로, 효모 글리코실화의 양은 항원, 특히 표면 상에 발현되는 것의 면역원성 및 항원성에 영향을 미칠 수 있다. 이와 같이, 효모 표면 상에 슈가 모이어티의 존재 및 표적 항원(들) 주위의 3차원 공간에 대한 그의 영향을 본 발명에 따른 효모 조절에서 고려하여야 한다. 임의의 방법을 사용하여 효모의 글리코실화 양을 감소시킬 수 있다 (또는, 원한다면 이를 증가). 예를 들어, 낮은 글리코실화를 가지도록 선택된 효모 돌연변이 균주 (예를 들어, mnn1, och1 및 mnn9 돌연변이)를 사용하거나, 또는 표적 항원상에 글리코실화 억제제 서열을 돌연변이에 의하여 제거할 수 있다. 대안적으로, 생략된 글리코실화 패턴을 가지는 효모, 예를 들어, 피치아를 사용할 수 있다. 또한, 글리코실화를 감소 또는 변경하는 방법을 사용하여 효모를 처리할 수 있다.

[0107] 본 발명의 일 구현예에서, 효모 베타클 내 항원 또는 기타 단백질을 재조합적으로 발현하기 위한 대안으로서, 효모 베타클에 단백질 또는 펩티드, 또는 항원으로 작용하고 및/또는 면역조절제 또는 생물학적 반응 조절제로서 유용한 탄수화물 또는 기타 분자를 세포 내 적재한다. 이어서, 이제 상기 항원 및/또는 기타 단백질을 세포 내 함유하는 효모 베타클을 개체에 투여하거나 또는 수지상 세포와 같은 담체 내로 적재할 수 있다. 펩티드 및 단백질을 확산, 능동 수송, 리포솜 융합, 전기천공, 식세포 작용, 동결-해동 사이클 및 욱 초음파 처리와 같은, 당업자에게 공지된 기술에 의하여 본 발명의 효모 베타클 내로 직접 삽입할 수 있다. 펩티드, 단백질, 탄수화물 또는 기타 분자가 직접 적재될 수 있는 효모 베타클은 미손상 효모, 및 생산 후 항원 및 기타 제제가 적재될 수 있는 스페로플라스트, 고스트 또는 사이토플라스트를 포함한다. 대안적으로, 미손상 효모에 항원 및/또는 제제를 적재한 다음, 스페로플라스트, 고스트, 사이토플라스트, 또는 준세포 입자를 이로부터 제조할 수 있다. 이러한 구현예에서, 임의의 수의 항원 및/또는 기타 제제들, 예를 들어, 미생물 또는 이의 일부의 적재에 의하여 제공될 수 있는 것과 같은, 적어도 1, 2, 3, 4 또는 수백 또는 수천개 이하의 항원 및/또는 기타 제제들을 효모 베타클 내로 적재할 수 있다.

[0108] 본 발명의 다른 구현예에서, 항원 및/또는 기타 제제가 효모 베타클에 물리적으로 부착된다. 항원 및/또는 기타 제제의 효모 베타클에의 물리적 부착은, 이에 제한되지 않으나, 항체 또는 기타 결합 파트너를 사용함에 의해서와 같이, 항원 및/또는 기타 제제의 효모 베타클 외표면의 화학적 가교결합 또는 항원 및/또는 기타 제제의 효모 베타클의 외표면의 생물학적 결합을 포함하는, 공유 및 비-공유 결합 방법을 포함하는, 당업계에 적합한 임의의 방법에 의하여 달성될 수 있다. 화학적 가교결합은 예를 들어, 글루타르알데히드 결합, 광친화성 표지, 카보디이미드 처리, 디-설파이드 결합을 연결할 수 있는 화학물질 처리, 및 기타 당업계에 표준인 가교결합 화학물질 처리를 포함하는 방법에 의하여 달성될 수 있다. 대안적으로, 효모의 외표면이 특정 전하 특성을 가지는 항원 및/또는 기타 제제에 융합 또는 결합할 가능성이 높도록 세포벽의 조성 또는 효모막의 지질 이중층의 전하를 변경시키는 화학물질을 효모 베타클과 접촉시킬 수 있다. 항체, 결합 펩티드, 가용성 수용체, 및 기타 리간

드와 같은 표적화 제제들 또한 항원 내에 융합 단백질로서 혼입시키거나 또는 효모 베타클에의 항원의 결합을 위하여 항원과 결합시킬 수 있다.

[0109] 항원 또는 기타 단백질이 효모 표면 상에 발현되거나 이에 물리적으로 부착될 때, 일 측면에서, 스페이서 암이 상기 표면 상에 항원 또는 기타 단백질 발현 또는 내용물을 최적화하도록 조심스럽게 선택될 수 있다. 스페이서 암(들)의 크기는 항원 또는 기타 단백질이 효모 표면 상에 결합을 위하여 얼마나 노출되는지에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 어떤 항원(들) 또는 기타 단백질(들)이 사용되고 있는지에 따라, 당업자는 효모 표면 상에 항원 또는 기타 단백질에 대한 적절한 스페이싱을 유발하는 스페이서 암을 선택할 것이다. 일 구현예에서, 상기 스페이서 암은 적어도 450 아미노산의 효모 단백질이다. 스페이서 암은 앞서 상세히 논의되었다.

[0110] 또 다른 구현예에서, 효모 베타클 및 항원 또는 기타 단백질은, 효모 베타클과 항원 또는 기타 단백질을 완충액 또는 기타 적합한 제제 내에서 가볍게 혼합함에 의해서와 같이 (예를 들어, 혼합물), 보다 수동적인, 비-특이적 또는 비-공유결합 메커니즘에 의하여 서로 결합된다.

[0111] 일 구현예에서, 미손상 효모 (이중 항원 또는 기타 단백질 발현을 가지거나 없는)를 효모 세포벽 제제, 효소막 입자 또는 효모 단편 (즉, 미손상이 아닌)을 생산하는 방식으로 그라인딩하거나 프로세싱할 수 있으며, 일부 구현예에서, 면역 반응을 증진시키기 위하여 상기 효모 단편은 항원 (예를 들어, DNA 백신, 단백질 서브유닛 백신, 사멸되거나 불활성화된 병원균, 바이러스 벡터 백신)을 포함하는 기타 조성물이 제공되거나 이와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 효소 처리, 화학적 처리 또는 물리적 힘 (예를 들어, 기계적 전단 또는 초음파 처리)을 사용하여 효모를 보조제로서 사용되는 부분들로 분해할 수 있다.

[0112] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명에 유용한 효모 베타클은 사멸되거나 불활성화된 효모 베타클을 포함한다. 효모의 사멸 또는 불활성화는 당업계에 공지된 다양한 적합한 방법들에 의하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 효모의 열 불활성화는 효모를 불활성화시키는 표준 방식이며, 당업자는 원한다면 당업계에 공지된 표준 방법에 의하여 표적 항원의 구조적 변화를 모니터링할 수 있다. 대안적으로, 화학적, 전기적, 방사성 또는 UV 방법과 같은, 효모를 불활성화시키는 기타 방법들을 이용할 수 있다. 예를 들어, *Methods of Enzymology*, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990)와 같은 표준 효모 배양 텍스트북에 개시된 방법을 참조한다. 사용되는 임의의 불활성화 전략은 표적 항원의 2차, 3차 또는 4차 구조를 고려하여야 하며, 그 면역원성을 최적화하기 위하여 그러한 구조를 보존하여야 한다.

[0113] 효모 베타클은 당업자에게 공지된 많은 기술들을 이용하여 본 발명의 효모-기재 면역요법 조성물 또는 생성물로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 효모 베타클은 동결건조에 의하여 건조될 수 있다. 효모 베타클을 포함하는 제제는 또한, 베이킹 또는 양조 작업에 사용되는 효모에 대하여 행하여지는 것과 같이, 효모를 케이크 또는 정제로 패키징함으로써 제조될 수 있다. 또한, 효모 베타클은 숙주 또는 숙주 세포에 의하여 허용되는 등장 완충액과 같은 약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합될 수 있다. 그러한 부형제의 예는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로오스 용액, 헵크 용액 및 기타 생리학적으로 밸런스된 수성 염 용액들을 포함한다. 불휘발유, 참기름, 에틸 올레이트, 또는 트리글리세라이드와 같은 비수성 베타클 또한 사용할 수 있다. 기타 유용한 제제들은 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 소르비톨, 글리세롤 또는 텍스트란과 같은, 점도 개선제를 함유하는 현탁액을 포함한다. 부형제는 또한 등장성 및 화학적 안정성을 증진시키는 물질과 같은, 소량의 첨가제를 함유할 수 있다. 완충액의 예는 인산 완충액, 중탄산 완충액, Tris 완충액을 포함하며, 방부제의 예는 티메로살, m- 또는 o-크레졸, 포르말린 및 벤질 알콜을 포함한다. 표준 제제는 현탁액 또는 주사용 용액으로서 적합한 액체 내 채취될 수 있는 주사가 가능한 액체 또는 고체일 수 있다. 따라서, 비-액체 제제 내에, 부형제는 예를 들어 텍스트로오스, 인간 혈청 알부민, 및/또는 투여 전에 멸균수 또는 식염수가 첨가되는 방부제를 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 생물학적 반응 조절제 화합물로도 언급될 수 있는 부가적 제제, 또는 그러한 제제/조절제를 생산하는 능력을 포함할 수 있다. 예를 들어, 효모 베타클은 적어도 하나의 항원 및 적어도 하나의 제제/생물학적 반응 조절제 화합물로 형질감염되거나 적재될 수 있거나, 또는 본 발명의 조성물이 적어도 하나의 제제/생물학적 반응 조절제와 함께 투여될 수 있다. 생물학적 반응 조절제는 보조제 및 면역조절제 화합물로 언급될 수 있는, 면역 반응을 조절할 수 있는 기타 화합물, 및 효모-기재 면역요법제와 같은, 다른 화합물 또는 제제의 생물학적 활성(그러한 생물학적 활성은 면역계 효과에 제한되지 않음)을 조절하는 화합물을 포함한다. 몇몇 면역조절제 화합물은 보호 면역 반응을 자극할 수 있는 반면, 다른 것들은 유해한 면역 반응을 억제할 수 있으며, 면역조절제가 소정의 효모-기재 면역요법제와 함께 유용한지 여부는 적어도 부분적으로 치료 또는 예방될 질병 상태 및/또는 치료될 개체에 의존할 것이다. 몇몇 생물학적 반응 조절제는 세포-중재 면역 반응을 우선적으로 증진시키는 반면, 다른 것들은 체액성 면역 반응을 우선적으로 증진시킨다 (즉, 체액성 면역에

비하여 세포-중재의 수준이 증가되는 면역 반응을 자극시킬 수 있거나, 그 반대이다). 몇몇 생물학적 반응 조절제는 효모-기재 면역요법제의 생물학적 특성과 공통으로 하나 이상의 특성을 가지거나, 효모-기재 면역요법제의 생물학적 특성을 증진 또는 보완한다. 면역 반응의 자극 또는 억제를 측정하고, 세포-중재 면역 반응을 체액성 면역 반응과 구분하고, 세포-중재 반응의 일 유형을 다른 것으로부터 (예를 들어, TH18 반응 대 TH1 반응) 구분하기 위한 당업자에게 공지된 많은 기술들이 있다.

[0115] 본 발명에 유용한 제제/생물학적 반응 조절제는 이에 제한되지 않으나, 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 지질 유도체, 펩티드, 단백질, 폴리사카라이드, 소분자 약물, 항체 및 이의 항원 결합 단편 (이에 제한되지 않으나, 항-사이토카인 항체, 항-사이토카인 수용체 항체, 항-케모카인 항체를 포함), 비타민, 폴리뉴클레오티드, 핵산 결합 모이어티, 앵타머, 및 성장 조절제를 포함할 수 있다. 일부 적합한 제제들은 이에 제한되지 않으나, IL-1 또는 IL-1의 또는 IL-1R의 작용제, 항-IL-1 또는 기타 IL-1 길항제; IL-6 또는 IL-6의 또는 IL-6R의 작용제, 항-IL-6 또는 기타 IL-6 길항제; IL-12 또는 IL-12의 또는 IL-12R의 작용제, 항-IL-12 또는 기타 IL-12 길항제; IL-17 또는 IL-17의 또는 IL-17R의 작용제, 항-IL-17 또는 기타 IL-17 길항제; IL-21 또는 IL-21의 또는 IL-21R의 작용제, 항-IL-21 또는 기타 IL-21 길항제; IL-22 또는 IL-22의 또는 IL-22R의 작용제, 항-IL-22 또는 기타 IL-22 길항제; IL-23 또는 IL-23의 또는 IL-23R의 작용제, 항-IL-23 또는 기타 IL-23 길항제; IL-25 또는 IL-25의 또는 IL-25R의 작용제, 항-IL-25 또는 기타 IL-25 길항제; IL-27 또는 IL-27의 또는 IL-27R의 작용제, 항-IL-27 또는 기타 IL-27 길항제; 타입 I 인터페론 (IFN- α 포함) 또는 타입 I 인터페론 또는 그 수용체의 작용제 또는 길항제; 타입 II 인터페론 (IFN- γ 포함) 또는 타입 II 인터페론 또는 그 수용체의 작용제 또는 길항제; 항-CD40, CD40L, 림프구-활성화 유전자 3 (LAG3) 단백질 및/또는 IMP321 (LAG3의 가용성 형태로부터 유도되는 T-세포 면역자극 인자), 항-CTLA-4 항체 (예를 들어, 아네르기성 T 세포 방출을 위한); T 세포 공-자극제 (예를 들어, 항-CD137, 항-CD28, 항-CD40); 알렘투주맙(alemtuzumab) (예를 들어, CamPath®), 데니류킨 디프티톡스(denileukin diftitox) (예를 들어, ONTAK®); 항-CD4; 항-CD25; 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2; FOXP3을 블로킹하는 제제 (예를 들어, 그 활성을 제거/CD4+/CD25+ T 조절 세포 사멸을 위한); Flt3 리간드, 이미퀴모드(imiquimod) (Aldara™), 과립 대식세포 집락 자극인자 (GM-CSF); 과립 집락 자극인자 (G-CSF), 사그라마스팀(sargramostim) (Leukine®); 제한없이 프로락틴 및 성장 호르몬을 포함하는 호르몬; 이에 제한되지 않으나, TLR-2 작용제, TLR-4 작용제, TLR-7 작용제, 및 TLR-9 작용제를 포함하는, 툴 유사 수용체 (TLR) 작용제; 이에 제한되지 않으나, TLR-2 길항제, TLR-4 길항제, TLR-7 길항제, 및 TLR-9 길항제를 포함하는, TLR 길항제; 이에 제한되지 않으나, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브(Celecoxib), NSAIDS), 글루코코르티코이드, 스타틴, 및 IMiDTMs를 포함하는 탈리도미드 및 그의 유사체 (탈리도미드의 구조적 및 기능적 유사체 (예를 들어, REVLIMID® (레날리도마이드: lenalidomide), ACTIMID® (포말리도마이드: pomalidomide))를 포함하는, 소염제 및 면역조절제; 균류 및 세균 성분 또는 임의의 전염증성 사이토카인 또는 케모카인과 같은 전염증성 제제; 이에 제한되지 않으나, 바이러스계 백신, 세균계 백신, 또는 항체계 백신을 포함하는 면역요법 백신; 및 임의의 기타 면역조절제, 면역강화제, 소염제, 전염증성 제제, 및 항원 제시 세포 또는 TH17, TH1, 및/또는 Treg 세포의 수를 조절하거나 그 활성 상태를 조절하거나 및/또는 그 생존을 조절하는 임의의 제제를 포함한다. 그러한 제제의 임의의 조합이 본 발명에서 고려되며, 그러나 임의의 제제가 효모-기재 면역요법제와 (예를 들어, 동시에, 순차적으로 또는 이와 다른 형태로) 조합되거나 이와 함께 프로토콜 내에 투여되는 조성물이 본 발명에 포함된다. 그러한 제제는 당업계에 잘 알려져 있다. 이들 제제들은 단독으로 사용되거나 또는 본원에 기재되는 기타 제제들과 조합 사용될 수 있다.

[0116] 제제들은 소정의 단백질 또는 펩티드 또는 그의 도메인의 작용제 및 길항제를 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 "작용제"는 제한없이, 수용체 또는 리간드에 결합하고 반응을 생산 또는 유발하는 소분자, 단백질, 펩티드, 항체, 핵산 결합 제제 등을 포함하는 임의의 화합물 또는 제제이고, 수용체 또는 리간드에 결합하는 자연 발생 물질의 작용을 모방하거나 증진시키는 제제를 포함할 수 있다. "길항제"는 제한없이, 작용제의 작용을 블로킹하거나 억제하거나 감소시키는, 소분자, 단백질, 펩티드, 항체, 핵산 결합 제제 등을 포함하는 임의의 화합물 또는 제제이다.

[0117] 본 발명의 조성물은 암 예방 또는 치료에 유용한 임의의 기타 제제 또는 조성물 또는 프로토콜, 또는 암, 특히 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련되는 암의 증상을 치료하거나 완화시키는 임의의 화합물을 추가로 포함하거나 또는 이와 함께 (동시에, 순차적으로 또는 간헐적으로) 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 예방 및/또는 치료적 면역요법을 포함하는, 기타 면역요법 조성물과 함께 사용될 수 있다. 과연, 본 발명의 조성물은 암 내 브라큐리 발현을 억제함으로써 (이에 따라 항종식성 영향을 억제함으로써) 전이성 암 내 일어날 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 억제 또는 감소시키는데 사용될 수 있거나, 또는 본 발명의 조성물은 개체 내

화학요법 또는 방사선 요법의 성능을 증진시킬 수 있다. 암 치료에 유용한 부가적인 제제, 조성물 또는 프로토콜 (예를 들어, 치료 프로토콜)은 이에 제한되지 않으나, 화학요법, 종양의 수술적 절제, 방사선 요법, 동종이계 또는 자가조직 줄기 세포 이식, 및/또는 표적화 암 치료법 (예를 들어, 이에 제한되지 않으나, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERMs), 아로마타아제 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 세린/트레오닌 키나아제 억제제, 히스톤 디아세틸라아제 (HDAC) 억제제, 레티노이드 수용체 활성화제, 세포사멸 자극제, 혈관형성 억제제, 폴리 ADP-리보오스) 폴리머라아제 (PARP) 억제제, 또는 면역자극제를 포함을 포함하는, 종양 성장 및 진행에 수반되는 분자를 특이적으로 표적화하는 소분자 약물, 생물의약 또는 모노클로날 항체 요법)을 포함한다. 이들 중 임의의 부가적인 치료제 및/또는 치료 프로토콜을 본 발명의 면역요법 조성물과 동시에, 교대로, 또는 그 후에, 또는 다른 시간 지점에 투여할 수 있다. 예를 들어, 화학요법 또는 표적화 암 치료법과 함께 개체에 제공될 때, 면역요법 조성물의 효능을 최대화하기 위하여, 화학요법 또는 표적화 암 치료법 투여 사이의 "휴일" 동안 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 것이 바람직할 것이다. 종양의 수술적 절제는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여에 종종 선행할 수 있으나, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여 동안 또는 그 후에 부가적 또는 1차 수술이 행하여질 수 있다.

[0118] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 조성물, 또는 본원에 기재된 조성물의 임의의 개별 성분들을 포함하는 키트를 포함한다. 키트는 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련되는 암 예방 또는 치료를 위하여 본 발명의 임의의 조성물을 사용하기 위한 설명서 또는 지시서 및 부가적 시약을 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명의 조성물의 투여 또는 사용 방법

[0120] 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물은, 암의 발병 예방, 암의 진행 저지 또는 암을 제거를 포함하여, 브라큐리 발현 또는 과발현과 관련되거나 이를 특징으로 하는 암을 예방 또는 치료하기 위하여 사용되도록 고안된다. 보다 구체적으로, 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 브라큐리-발현 종양을 예방, 억제 또는 그 발병을 지연시키기 위하여, 및/또는 종양 이동 및/또는 기타 조직의 종양 침습 (전이)를 억제 또는 지연시키기 위하여, 및/또는 개체 내 암의 진행을 일반적으로 예방 또는 억제하기 위하여 사용될 수 있다. 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 또한, 개체 내 종양 크기를 감소시키고; 개체 내 종양 성장을 억제하고; 개체의 생존율을 증가시키고; 종양 이동 및/또는 기타 조직의 종양 침습 (전이성 암)을 예방, 억제, 반전 또는 지연시키고, 및/또는 개체 내 암의 진행을 예방, 억제, 반전 또는 지연시킴에 의해서와 같이, 암의 적어도 하나의 증상을 완화시키는데 사용될 수 있다. 효모-브라큐리 면역요법은 또한 암 내 브라큐리 발현을 억제함으로써 전이성 암 내 일어날 수 있는 화학요법 내성 또는 방사선 내성을 억제, 감소 또는 제거시키기 위하여 치료적으로 사용될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 개체 내 화학요법 또는 방사선 요법의 성능을 증진시킬 수 있다.

[0121] 본 발명의 조성물 및 방법에 적합한 암은 브라큐리를 발현하거나 발현할 수 있는 임의의 암, 또는 브라큐리를 발현하거나 발현할 수 있는 암에 근접하는 암이며, 이에 제한되지 않으며, 유방암, 소장암, 위암, 신장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 고환암, 폐암, 대장암, 췌장암, 또는 전립선암을 포함하고, 전이성 및 말기암을 포함한다. 또한, 브라큐리는 만성 림프성 백혈병 (LCC), Epstein-Barr 바이러스 형질전환된 B 세포, 버킷 및 호지킨 림프종, 및 이의 전이성 암과 같은, B 세포 기원의 종양 내에서 발현된다.

[0122] 본 발명의 일 구현예는 암을 가지는 개체 내에서 종양 이동을 억제 및/또는 암의 전이성 진행을 감소, 저지, 반전 또는 예방, 또는 암의 전이성 사건발달을 반전시키는 방법에 관한 것이다. 상기 논의한 바와 같이, 브라큐리는 종양 세포 사이클 진행을 감쇠시키면서, 인간 종양 세포 내 상피-중간엽 전이 (EMT)를 촉진시켜, 종양 세포에 중간엽 표현형, 및 이동 및 침습 능력을 부여한다. 따라서, 전이성 진행에 있어서 브라큐리의 수반은 브라큐리가 전이성 단계 전에 암을 저지하는 것을 포함하는, 전이성 진행의 예방 또는 억제를 위한 이상적 타겟이 되게 한다. 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 사용은, 화학요법 및 방사선과 같은 전통적 치료법으로부터의 암의 회피 (회피 시도)에도 불구하고, 암의 진행의 저지를 포함하여 전이성 암의 예방 또는 치료에 효과적일 수 있다. 상기 방법은 암을 가지는 개체에, 이에 제한되지 않으나, (a) 효모 베헤클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 본원에 기재되는 바와 같은 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0123] 일 측면에서, 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리가 감지되지 않는다. 일반적으로, 브라큐리가 개체의 암 내에서 감지되지 않을 때, 그 개체는 브라큐리 발현이 아직 나타나지 않은 (예를 들어, 단계 I 또는 단계 II), 또는 브라큐리 발현이 어떠한 경우에도 아직 감지가능하지 않은 (즉, 브라큐리가 적은 수의 종양 세포 내에서 낮은 수준으로 발현되거나 발현되지 않을 수 있으나, 표준 감지 방법을 이용하여 쉽게 감지가능하지 않음) 초기 단계 암을 가질 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법제의 사

용에 의하여 브라큐리-발현 종양 세포의 발병이 예방, 지연 또는 억제된다. 그 결과, 종양 이동 및/또는 종양의 전이성 진행을 초래하는 기타 전이성 과정이 예방, 지연 또는 억제되고 및/또는 일반적 종양 진행 저지가 개체 내에서 일어난다.

[0124] 다른 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에서 브라큐리 발현이 감지되거나 감지될 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에서, 상기 개체는 단계 I, 단계 II, 단계 III 또는 단계 IV 암을 가질 수 있다. 이러한 측면에서, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 사용은 브라큐리 발현 정양을 감소, 제거 또는 감소 또는 저지하고, 이는 개체 내 종양 크기 감소, 브라큐리-발현 종양 성장 억제, 및/또는 개체의 생존을 증가를 가져올 수 있다. 상기 개체는 전이성 진행의 저지, 감소 또는 반전을 겪을 것이며, 이는 환자의 생존을 및 건강을 개선시키고, 나아가 암 치료를 위한 기타 치료 프로토콜을 허용할 것이다.

[0125] 과연, 전이성 암은, 이에 의하여 암이 그 치료로부터 "회피"하거나 또는 그 치료에 의하여 덜 영향을 받고 진행하는, 화학요법, 방사선 또는 표적화 암 치료법과 같은 암 치료법에 대한 내성 또는 증가된 내성과 관련될 수 있다. 따라서, 치료의 효능을 증진 또는 개선하고 환자 건강 및 생존을 개선하기 위하여 그러한 치료에 대한 내성을 감소 또는 제거할 필요가 있다. 따라서, 본 발명의 일 구현예는 암을 가지는 환자 내에서 화학요법-내성, 표적화 암 치료법-내성, 또는 방사선-내성을 감소 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 암을 가지고 암에 대한 화학요법 및/또는 방사선 요법을 받고 있는 개체에, (a) 효모 베타클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 본원에 기재되는 바와 같은 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 또한 이에 제한되지 않으나, 표적화 암 치료법을 포함하는, 암의 기타 치료적 처리와 관련되는 내성을 치료하기 위하여 사용될 수 있다.

[0126] 이러한 구현예의 일 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에서 브라큐리가 감지되지 않는다. 이러한 측면에서, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여는, 암 내 브라큐리-발현 종양 세포 발달을 억제함으로써, 화학요법 또는 방사선 요법에 대한 내성의 개시를 예방 또는 억제한다. 다른 측면에서, 상기 조성물이 최초 투여될 때 개체의 암 내에 브라큐리 발현이 감지된다. 이러한 측면에서, 상기 개체는 화학요법 또는 방사선 내성을 이미 겪고 있거나 겪지 않을 수 있다. 어떠한 경우에도, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여는 환자 내 브라큐리-발현 종양 세포를 감소 또는 제거함으로써, 화학요법 또는 방사선 요법 내성을 예방 또는 억제하거나, 화학요법 또는 방사선 요법의 능력을 증진시켜 개체를 치료한다.

[0127] 본 발명의 다른 구현예는 암, 특히 브라큐리-발현 암의 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 브라큐리-발현 암을 가지는 개체에, (a) 효모 베타클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 본원에 기재되는 바와 같은 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 상기 방법은 환자 내 종양 크기를 감소시킨다. 일 측면에서, 상기 방법은 환자의 생존율을 증가시킨다. 일 측면에서, 상기 방법은 개체 내 종양 성장을 억제한다. 일 측면에서, 상기 방법은 종양의 전이성 진행을 예방, 저지 또는 반전시킨다.

[0128] 브라큐리 발현은 암이 더 높은 단계로 전진 또는 진행함에 따라 (예를 들어, 특정 암에 따라, 단계 I에서 단계 II에서 단계 III에서 단계 IV) 더욱 일반적인 것으로 믿어지고 전이성 진행과 관련되므로, 본 발명의 구현예는 브라큐리-발현 암의 개시를 예방 또는 지연시키거나, 전이성 단계 전 또는 악성 단계 전에 암을 저지시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 브라큐리-발현 암 세포가 아직 감지되지 않은 개체에, (a) 효모 베타클; 및 (b) 적어도 하나의 브라큐리 항원을 포함하는 암 항원을 포함하는 본원에 기재되는 바와 같은 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 상기 암은 적어도 암을 가지는 개체의 서브세트 내에서 암의 일부 단계에서 브라큐리를 발현하거나 발현을 허용하는 것으로 믿어진다. 이러한 구현예의 일 측면에서, 상기 개체는 이미 암을 가지나, 조성물이 최초 투여될 때 암 내 브라큐리가 감지되지 않으며, 이는 상기 개체가 브라큐리 발현이 아직 나타나지 않았거나, 브라큐리 발현이 아직 감지가가능하지 않은 (즉, 브라큐리가 적은 수의 종양 세포 내에서 낮은 수준으로 발현되거나 발현되지 않을 수 있으나, 아직 표준 감지 방법을 이용하여 쉽게 감지가가능하지 않음) 초기 단계 암을 가질 수 있음을 의미한다. 일부 경우, 암의 유형은 높은 전이성 진행률을 가지는 것으로 알려진 것일 수 있다. 이러한 측면에서, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여는 환자의 암 내 브라큐리-발현 종양 세포 발달을 예방, 지연 또는 억제하고, 따라서 브라큐리 발현을 수반하는 전이성 진행을 예방, 저지, 지연 또는 억제한다. 다른 측면에서, 상기 개체는 조성물이 투여될 때 암을 가지지 않는다. 이러한 개체는 아마도 가족력 또는 유전적 마커때문에, 또는 그 개체가 전암성 세포 또는 병변의 신호를 보였거나 전암성 (악성전) 세포 또는 병변을 가지기 때문에, 암 발병 성향이 있거나 가능성이 있을 수 있다.

[0129] 일 측면에서, 상기 개체는 암 치료에 유용한 적어도 하나의 다른 치료 화합물 또는 치료 프로토콜로 부가적으로

처리될 수 있다. 이러한 치료제 및 프로토콜은 본원 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의되었다. 예를 들어, 본원에 기재되는 본 발명의 방법에 대한 임의의 구현예에서, 일 측면에서, 상기 개체가 암을 가질 때 (종양 세포 내 감지가 가능한 브라큐리 발현 상태와 무관하게), 상기 개체는 다른 암 치료법으로 처리 중이거나 처리되었다. 이러한 치료법은 이에 제한되지 않으나, 화학요법, 방사선 요법, 표적화 암 치료법, 종양의 수술적 절제, 줄기 세포 전송, 사이토카인 치료법, 입양 T 세포 전송, 및/또는 제2 면역요법 조성물 투여를 포함하는, 본원에 앞서 기재되는 임의의 치료 화합물 또는 치료제의 사용 또는 임의의 치료 프로토콜을 포함할 수 있다. 제2 면역요법 조성물의 투여의 경우, 그러한 조성물은 이에 제한되지 않으나, 부가적 효모-기재 면역요법, 재조합 바이러스-기재 면역요법 (바이러스 벡터), 사이토카인 치료법, 면역자극 치료법 (면역자극 특성을 가지는 화학요법을 포함), DNA 백신 및 기타 면역요법 조성물을 포함할 수 있다.

[0130] 일 측면에서, 상기 제2 면역요법 조성물은 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제2 암 항원을 포함한다. 예를 들어, 효모-브라큐리 면역요법 조성물과 함께 사용할 수 있는 제2 면역요법 조성물은 다른 암 항원을 포함하는 효모-면역요법 조성물이다. 그러한 암 항원은 이에 제한되지 않으나, 태아성 암 항원 (CEA), 점 돌연변이 Ras 종양 단백질, MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, 정상 및 점 돌연변이 p53 종양 단백질, PSMA, 티로시나아제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (adenomatous polyposis coli) (APC), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로젠 수용체 (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesothelin, NGEP, 그러한 항원의 변형체, 그러한 항원의 스플라이스 변종, 및 그러한 항원의 에피토프 작용제, 및 그러한 항원들의 조합, 및/또는 이의 면역원성 도메인, 이의 변형물, 이의 변종, 및/또는 이의 에피토프 작용제를 포함한다.

[0131] 본원에 사용되는 용어 암의 "치료" 또는 이의 치환 (예를 들어, "암에 대하여 치료되는" 등)은, 일단 암이 발생 하였으면 (예를 들어, 개체 내에 암이 진단 또는 감지되었으면), 종양 크기 감소, 종양 성장 억제, 개체 생존률 증가, 전이성 암의 개시 또는 발병의 지연, 억제, 저지 또는 예방 (종양 이동 및/또는 원발성 암 외부의 조직의 종양 침습 및/또는 암의 전이성 진행과 관련되는 기타 과정들을 지연, 억제, 저지 또는 예방함에 의해서와 같이), 암 진행 지연 또는 저지, 종양에 대한 면역 반응 개선, 종양 항원에 대한 장기간 메모리 면역 반응 개선, 및/또는 개선된 개체의 일반적 건강을 포함하는 (이 처리 부재시와 비교하여) 그 처리의 적어도 하나의 치료적 목적으로, 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 암으로부터 "예방" 또는 "보호", 또는 이의 치환 (예를 들어, 암의 예방" 등)은, 암이 발생하기 전에, 또는 특정 단계 암 또는 암 내 종양 항원 발현이 일어나기 전에 (예를 들어, 브라큐리 발현이 암 내 감지되기 전에), 암 개시 또는 발병 예방 또는 지연을 포함하는, 또는 그 처리 후 암이 발생한다면, 적어도 암의 심각성 감소 (예를 들어, 종양 성장 수준 감소, 암 진행 저지, 암에 대한 면역 반응 개선, 전이성 과정 억제) 또는 개체 내 결과 개선 (예를 들어, 생존률 향상)을 포함하는, (그 처리 부재시와 비교하여) 그 처리의 적어도 하나의 목적으로, 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 일반적으로 의미한다.

[0132] 본 발명은 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 대상 또는 개체에의 전달 (투여, 면역화)을 포함한다. 상기 투여 과정은 생체외 또는 생체내에서 수행될 수 있으나, 전형적으로 생체내에서 수행된다. 생체의 투여는 효모 베타클, 항원(들) 및 기타 제제 또는 조성물이 세포 내로 적재되도록 하는 조건 하에 환자로부터 제거된 세포 집단 (수지상 세포)에 본 발명의 조성물을 투여하고, 환자에 상기 세포를 돌려주는 것과 같은, 환자의 외부에 조절 단계의 일부를 수행함을 의미한다. 본 발명의 치료 조성물은 임의의 적합한 투여 방식에 의하여 환자에 되돌려지거나, 환자에 투여될 수 있다.

[0133] 조성물의 투여는 전신성 또는 점막 및/또는 표적 부위 근처 (예를 들어, 종양 부위 근처)일 수 있다. 적합한 투여 방식은 예방 또는 치료될 암의 유형 및/또는 표적 세포 집단 또는 조직에 따라 당업자에게 분명할 것이다. 다양한 허용가능한 투여 방법은 이에 제한되지 않으나, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 결절 내 (intranodal) 투여, 관상 내(intracoronary) 투여, 동맥 내 투여 (예를 들어, 목동맥 내로), 피하 투여, 경피 전달, 기관 내 투여, 관절 내 투여, 심실 내 투여, 흡입 (예를 들어, 에어로졸), 두개 내, 척수 내, 안 내, 귀, 비강 내, 경구, 폐 투여, 카테터 함침, 및 조직 내로 직접 주입을 포함한다. 일 측면에서, 투여 방식은 정맥 내, 복강 내, 피하, 피 내(intradermal), 결절 내, 근육 내, 경피, 흡입, 비 내, 경구, 안 내, 관절 내, 두개 내, 및 척수 내를 포함한다. 비경구 전달은 피 내, 근육 내, 복강 내, 흉막 내, 폐 내, 정맥 내, 피하, 동맥 카테터 및 정맥 카테터 방식을 포함한다. 귀(aural) 전달은 점적을 포함하고, 비 내 전달은 점비약 또는 비 내 주입을 포함하고, 안 내 전달은 점안약을 포함할 수 있다. 에어로졸 (흡입) 전달은 또한 당업계에 표준 방법을 이용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, Stribling et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281, 1992 참

조). 일 측면에서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 피하 투여된다. 일 측면에서, 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 중앙 환경 내로 직접 투여된다.

[0134] 일반적으로, 적합한 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 단일 투여량은, 적합한 시간 기간에 걸쳐 1 회 이상 투여될 때, 효모 베타클 및 브라큐리 항원을 환자의 소정의 세포 유형, 조직 또는 영역에 하나 이상의 브라큐리 항원 또는 에피토프에 대한 항원-특이적 면역 반응을 유발하기에 효과적인 양으로 효과적으로 제공할 수 있는 투여량이다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명의 효모-브라큐리의 단일 투여량은 상기 조성물이 투여되는 유기체의 체중 킬로그램 당 약 1×10^5 내지 약 5×10^7 효모 세포 균등물이다. 일 측면에서, 본 발명의 효모 베타클의 단일 투여량은, 임의의 중간 투여량을 포함하여, 0.1×10^6 세포의 증가분으로 (즉, 1.1×10^6 , 1.2×10^6 , $1.3 \times 10^6 \dots$), 투여량 당 (즉, 유기체 당) 약 100 Y.U. (1×10^9 세포)이다. 일 구현예에서, 적합한 투여량은 1 Y.U. 내지 40 Y.U.를 포함하고, 일 측면에서 10 Y.U. 내지 40 Y.U.를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 투여량은 개체 상에 다른 부위에 그러나 동일 투여 기간 동안 투여된다. 예를 들어, 10 Y.U. 투여량은 하나의 투여 기간 동안 개체 상에 네 개의 상이한 부위에 주입함으로써 40 Y.U. 투여량이 투여될 수 있다. 본 발명은 단일 투여량을 형성하기 위한 개체 상에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 상이한 부위에서 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 양(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 Y.U. 또는 그 이상)의 투여를 포함한다. 하나의 효모 단위 (Y.U.)는 1×10^7 효모 세포 또는 효모 세포 균등물이다.

[0135] 예를 들어, 항원에 대한 면역 반응이 약해질 때 또는 특정 항원 또는 항원(들)에 대한 면역 반응을 제공하거나 기억 반응을 유도하기 위하여 필요로 될 때, 치료 조성물의 "부스터" 또는 "부스트"가 투여된다. 부스터는 치료되는 개체의 상태 및 투여시 치료 목적(예를 들어, 예방적, 능동 치료, 유지)에 따라, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 주 간격으로, 또는 매월, 두 달에 한번, 분기별, 매년, 및/또는 본래 투여 후 수년 증가분으로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 투여 스케줄은 효모-브라큐리 면역요법 조성물이 수주 내지 수개월 내지 수년의 시간 기간에 걸쳐 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 횟수로 투여되는 것이다. 일 구현예에서, 투여량은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상 투여 동안 매주 또는 2주에 한번 투여된 후, 원하는 암 예방 또는 치료적 처리를 달성하는데 요구되는 대로 2 주에 한번 또는 매월 투여된다. 다음, 부가적 부스터가 원한다면 유지 또는 차도 치료로서 유사 또는 더 긴 간격으로 (수개월 또는 수년) 제공될 수 있다.

[0136] 본 발명의 일 측면에서, 하나 이상의 부가적인 치료제 또는 치료 프로토콜이 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여와 동시에 및/또는 이와 순차적으로 투여되거나 수행된다 (예를 들어, 종양의 수술적 제거, 화학요법제의 투여, 방사선 요법의 투여, 다른 면역요법 조성물 또는 프로토콜의 투여, 사이토카인 치료법, 입양 T 세포 전송, 또는 줄기 세포 이식). 예를 들어, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 최초 투여 전 또는 최초 투여 후 하나 이상의 치료가 투여되거나 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 하나 이상의 치료가, 상기 효모-브라큐리 조성물이 화학요법 또는 기타 치료법의 하나 이상의 연속 투여 사이에 소정의 간격으로 투여되는 프로토콜에서와 같이, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여와 교대하는 방식으로 투여되거나 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 부가적 치료를 개시하기 전에 일정 시간에 걸쳐 1회 이상의 투여로 투여된다. 즉, 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 일정 시간 기간 동안 단일치료법으로서 투여된 다음, 부가적 치료법이 (예를 들어, 화학요법) 효모-브라큐리 면역요법의 새로운 투여량과 함께 또는 효모-브라큐리 면역요법과 교대하는 방식으로 추가된다. 대안적으로 또는 부가적으로, 다른 치료제가 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여 시작 전에 일정 시간 기간 동안 투여될 수 있으며, 이러한 개념들을 조합할 수 있다 (예를 들어, 종양의 수술적 절제 후, 수주 동안 효모-브라큐리 면역요법으로 단일치료 후, 수주 또는 수개월 동안 화학요법과 효모-브라큐리 면역요법의 교대 투여 후, 임의로 효모-브라큐리 면역요법 또는 다른 치료법을 이용한 단일치료법, 또는 순차적, 동시 또는 교대하는 방식으로 제공되는 치료법의 조합의 새로운 프로토콜). 효모-브라큐리 면역요법을 이용하는 암 치료의 다양한 프로토콜이 본 발명에서 고려되며, 이들 실시예들은 다양한 가능한 프로토콜의 비제한적 예인 것으로 간주되어야 한다.

[0137] 본 발명의 일 측면에서, 브라큐리 표적화 이외에도 브라큐리 이외의 부가적 항원들 또한 효모-기재 면역요법을 이용하여 표적화될 수 있다. 이러한 부가적인 표적 항원들은 브라큐리 항원으로서 동일 효모-베타클 내에 포함되거나, 또는 상이한 항원들을 표적화하는 부가적인 효모-기재 면역요법 조성물들을 제조한 다음 치료될 개체, 암의 유형에 의하여 또는 개체의 특정 종양에 의하여 발현되는 항원에 따라, 및/또는 개체 내 암의 단계, 또는 개체의 치료 단계에 따라 원하는 대로 조합할 수 있다. 예를 들어, (1) 돌연변이 Ras와 같은 암 발병에 있어서 중요한 사건에 수반되는 항원들, (2) CEA와 같은 세포성 과정의 조절 장애와 관련되거나 이에 수반되는 항원들,

및 (3) 전이성 과정에 수반되는 브라큐리를 포함하는 항원들의 조합을 선택할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 기타 효모-기재 면역요법 조성물들은 이에 제한되지 않으나, 태아성 암 항원 (CEA), 점 돌연변이 Ras 종양단백질, MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, 정상 및 점 돌연변이 p53 종양단백질, PSMA, 티로시나아제, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, 선종성 용종증 (adenomatous polyposis coli) (APC), Myc, von Hippel-Lindau 단백질 (VHL), Rb-1, Rb-2, 안드로젠 수용체 (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, 메소텔린, NGEF, 이러한 항원의 변형, 이러한 항원의 스플라이스 변종, 및 이러한 항원의 에피토프 작용제, 및 이러한 항원들의 조합, 및/또는 이의 면역원성 도메인, 이의 변형체, 이의 변종, 및/또는 이의 에피토프 작용제를 포함하는 하나 이상의 항원들을 발현할 수 있다. 개체의 종양 내 항원의 표적화를 최적화하기 위하여, 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여 전에, 이와 동시에 또는 교대로, 및/또는 투여 후에, 이들 효모-기재 면역요법 조성물들 하나, 둘, 셋 또는 그 이상을 개체에 투여할 수 있다. 상기한 바와 같이, 부가적인 치료법 또한 이러한 프로토콜 내에 사용될 수 있다 (예를 들어, 종양의 수술적 절제, 화학요법, 표적화 암 치료법, 방사선 요법, 등).

[0138] 본 발명의 일 구현예에서, 암 치료 방법이 제공된다. 상기 방법은 브라큐리 발현이 감지되지 않은 암을 가지는 개체에, 효모 베타글, 및 브라큐리 항원을 포함하지 않는 제1 암 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 제1 면역요법 조성물의 투여 전에, 이와 동시에 또는, 이에 이어서, 상기 개체에 효모 베타글, 및 브라큐리 항원을 포함하는 제2 암 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 부가적인 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 하나 이상의 부가적인 면역요법 조성물 각각은 부가적인 암 항원을 포함한다. 상기 부가적인 항원은 이에 제한되지 않으나, 돌연변이 Ras, 태아성 암 항원 (CEA) 및 MUC-1을 포함하는 본원에 기재되거나 당업자에게 공지된 것들 중 임의의 것일 수 있다.

[0139] 본 발명의 다른 구현예에서, 암 치료 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 암을 가지는 개체에, 효모 베타글 및 돌연변이 Ras 항원을 포함하는 제1 면역요법 조성물을 투여하는 단계; (b) 상기 (a)의 개체에, 효모 베타글, 및 태아성 암 항원 (CEA) 및 뮤신-1 (MUC-1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항원을 포함하는 제2 면역요법 조성물; 및 (c) 상기 (a) 및 (b)의 개체에, 효모 베타글 및 브라큐리 항원을 포함하는 제3 면역요법 조성물을 투여하는 단계. (a), (b) 및 (c)의 투여 단계들 중 하나 이상은 동시에 또는 순차적으로 행하여질 수 있다. 단계들은 특정 개체의 암을 치료하기 위하여 요구되는 대로 반복될 수 있고, 상기 암 항원은 특정 개체의 암에 특이적으로 접근하기 위하여 처리 전 또는 처리 중에 변형될 수 있다.

[0140] 본 발명의 방법에서, 조성물 및 치료 조성물은 척추 동물, 특히 제한 없이 영장류, 설치류, 가축 및 애완동물을 포함하는 척추동물 부류, 포유류의 일원에 투여될 수 있다. 가축은 소비될 또는 유용한 생성물을 생산하는 포유류 (예를 들어, 양모 생산을 위한 양)를 포함한다. 본 발명을 이용하여 치료 또는 보호할 포유류는 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 마우스, 래트, 염소, 양, 소, 말 및 돼지를 포함한다.

[0141] "개체"는 제한 없이 인간을 포함하는 포유류와 같은 척추동물이다. 포유류는 이에 제한되지 않으나, 가축, 스포츠 동물, 애완동물, 영장류, 마우스 및 래트를 포함한다. 용어 "개체"는 용어 "동물", "대상" 또는 "환자"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.

[0142] **본 발명에 유용한 일반적 기술**

[0143] 본 발명의 실행은 달리 기재되지 않으면 당업자에게 잘 알려져 있는 전형적인 분자생물학 (재조합 기술을 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 핵산 화학, 및 면역학 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 Methods of Enzymology, Vol. 194, Guthrie et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Biology and activities of yeasts, Skinner, et al., eds., Academic Press (1980); Methods in yeast genetics : a laboratory course manual, Rose et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology, Pringle et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); The Yeast Saccharomyces: Gene Expression, Jones et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, Broach et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001), (본원에서 "Sambrook"으로 공동으로 언급됨); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, 2001까지 보충판을 포함); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis

et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988), Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ("Harlow and Lane"으로 본원에서 공동으로 언급됨), Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, C. Klaassen, ed., 6th edition (2001), 및 Vaccines, S. Plotkin, W. Orenstein, and P. Offit, eds., Fifth Edition (2008)와 같은 문헌에 상세히 설명되어 있다.

[0144] **일반적 정의**

[0145] "TARMOGEN®" (GlobeImmune, Inc., Louisville, Colorado)는 일반적으로 하나 이상의 이중 항원을 세포 외 (표면 상에), 세포 내 (내부 또는 세포질) 또는 세포 외 및 세포 내 모두에 발현하는 효모 베타글로불린을 의미한다. TARMOGEN®은 일반적으로 기재되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제 5,830,463 호 참조). 몇몇 효모-기재 면역요법 조성물, 및 이를 이의 제조 및 일반적 이용 방법 또한 미국 특허 제 5,830,463호, 미국 특허 제. 7,083,787 호, 미국 특허 제. 7,736,642호, Stubbs et al., *Nat. Med.* 7:625-629 (2001), Lu et al., *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004), 및 Bernstein et al., *Vaccine* 2008 Jan 24;26(4):509-21에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다.

[0146] 본원에 사용되는 용어 "유사체"는 다른 화합물과 구조적으로 유사하나 조성에 있어서 약간 다른 (한 원자의 다른 원소의 원자로 대체 또는 특정 작용기의 존재, 또는 한 작용기의 다른 작용기로의 대체와 같은) 화합물을 의미한다. 따라서, 유사체는 표준 화합물에 대하여 그 작용 및 외관에 있어서 유사하거나 동등하나, 상이한 구조 또는 기원을 가지는 화합물이다.

[0147] 용어 "치환된", "치환된 유도체" 및 "유도체"는 화합물을 기재하는데 사용될 때, 미치환 화합물에 결합되는 적어도 하나의 수소가 상이한 원자 또는 화학적 모이어티로 대체됨을 의미한다.

[0148] 유도체는 모 화합물과 유사한 물리적 구조를 가지나, 상기 유도체는 그 모 화합물과 상이한 화학적 및/또는 생물학적 특성을 가질 수 있다. 그러한 특성은 이에 제한되지 않으나, 증가 또는 감소된 모 화합물의 활성, 모 화합물과 비교하여 새로운 활성, 증진된 또는 감소된 생물학적 이용 가능성, 증진된 또는 감소된 효능, 증진된 또는 감소된 시험관 내 및/또는 생체 내 안정성, 및/또는 증진된 또는 감소된 흡착 특성을 포함할 수 있다.

[0149] 일반적으로, 용어 "생물학적으로 활성인"은 화합물이 (단백질 또는 펩티드 포함) 생체 내 (즉, 천연 생리학적 환경에서) 또는 시험관 내 (즉, 실험실 조건 하에) 특정 또는 관찰시, 대사, 생리적, 화학적 또는 세포, 조직, 또는 유기체의 기타 과정에 영향을 미치는 적어도 하나의 감지가능한 활성을 가짐을 나타낸다.

[0150] 본 발명에 따르면, 용어 "조절하다"는 일반적으로 특정 활성의 상향조절 또는 하향조절을 의미한다. 본원에 사용되는 용어 "상향조절하다"는 일반적으로 특정 활성에 대한 유발, 개시, 증가, 증대, 부스팅, 개선, 증진, 증폭, 촉진 또는 제공 중 임의의 것을 기재하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 용어 "하향조절"은 일반적으로 특정 활성에 대한 감소, 저감, 억제, 완화, 약화, 줄임, 블로킹 또는 예방 중 임의의 것을 기재하는데 사용될 수 있다.

[0151] 본 발명의 일 구현예에서, 본원에 기재되는 임의의 아미노산 서열은 특정 아미노산 서열의 C- 및/또는 N-말단 각각을 플랭킹하는 적어도 하나 내지 약 20 이하의 부가적인 이중 아미노산으로 생산될 수 있다. 결과 형성되는 단백질 또는 폴리펩티드는 특정 아미노산 서열로 "필수적으로 구성되는" 것으로 언급될 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 이중 아미노산 서열은 상기 특정 아미노산 서열을 플랭킹하는 자연에서 발견되지 않는 (즉, 생체 내에서 자연적으로 발견되지 않는) 또는 특정 아미노산 서열의 기능과 관련되지 않는, 또는 자연 발생 서열 내 그러한 뉴클레오티드가 소정의 아미노산 서열이 유도되는 유기체에 대한 표준 코돈 사용법을 이용하여 번역된다면, 유전자 내 발생함에 따라 특정 아미노산 서열을 암호화하는 자연 발생 핵산 서열을 플랭킹하는 뉴클레오티드에 의하여 암호화될 수 없는 아미노산 서열이다. 유사하게, "문구 "필수적으로 구성되는"은 본원에서 핵산 서열에 대하여 사용될 때, 특정 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 5' 및/또는 3' 말단 각각에서 적어도 하나 내지 약 60 이하의 부가적 이중 뉴클레오티드에 의하여 플랭킹될 수 있는 특정 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 의미한다. 상기 이중 뉴클레오티드는 천연 유전자 내에 일어남에 따라 특정 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 플랭킹하는 자연에서 발견되지 않는 것이거나 (즉, 생체 내에서 자연적으로 발견되지 않는), 또는 특정 아미노산 서열을 가지는 단백질에 부가적 기능을 부여하거나 그 단백질의 기능을 변화시키는 단백질을 암호화하지 않는다.

- [0152] 본 발명에 따르면, 문구 "~에 선택적으로 결합하다"는 본 발명의 항체, 항원-결합 단편 또는 결합 파트너가 특정 단백질에 우선적으로 결합하는 능력을 의미한다. 보다 구체적으로, 문구 "선택적으로 결합하다"는 하나의 단백질의 다른 것 (예를 들어, 항체, 그의 단편, 또는 항원에의 결합 파트너)에의 특이적 결합을 의미하며, 표준 분석 (예를 들어, 면역분석)에 의하여 측정시 결합 수준이 그 분석에 대한 배경 대조군보다 통계학적으로 유의하게 높은 것을 의미한다. 예를 들어, 면역분석 수행시, 대조군은 전형적으로 항체 또는 항원 결합 단편만을 함유하는 (즉, 항원 부재) 반응 웰/튜브를 포함하고, 항원 부재시 상기 항체 또는 항원-결합 단편에 의한 반응성 (예를 들어, 웰에의 비특이적 결합)의 양이 배경으로서 간주된다. 결합은 효소 면역분석 (예를 들어, ELISA, 면역블롯 분석 등)을 포함하는 당업계에서 표준인 다양한 방법을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0153] 본 발명에 사용되는 단백질 또는 폴리펩티드에 대한 일반적 언급은 전장 단백질, 거의 전장 단백질 (상기한 바와 같은), 또는 임의의 단편, 도메인 (구조적, 기능적 또는 면역원성), 구조적 에피토프, 또는 소정의 단백질의 동족체 또는 변종을 포함한다. 융합 단백질 또한 단백질 또는 폴리펩티드로 언급될 수 있다. 본 발명에 따른 분리된 단백질은 그 천연 환경으로부터 제거된 (즉, 인간 조작이 가하여진) 단백질이고 (폴리펩티드 또는 펩티드를 포함), 예를 들어, 정제된 단백질, 부분적으로 정제된 단백질, 재조합에 의하여 생산된 단백질, 및 합성에 의하여 생산된 단백질을 포함할 수 있다. 이와 같이, "분리된"은 단백질이 정제된 정도를 반영하지 않는다. 바람직하게, 본 발명의 분리된 단백질은 재조합에 의하여 생산된다. 본 발명에 따르면, 용어 "변형" 및 "돌연변이"는 특히 본원에 기재되는 단백질 또는 그의 일부의 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)에 대한 변형/돌연변이에 대하여 상호교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0154] 본원에 사용되는 용어 "동족체" 또는 "변종"은 표준 단백질 또는 펩티드에 대하여 근소한 변형에 의하여 표준 단백질 또는 펩티드(즉, "프로토타입" 또는 "야생형" 단백질)와 상이하나, 자연 발생 형태의 기본적인 단백질 및 측쇄 구조를 유지하는 단백질 또는 펩티드를 의미한다. 이러한 변화는 이에 제한되지 않으나: 하나 또는 몇몇 아미노산 측쇄의 변화; 결실 (예를 들어, 단백질 또는 펩티드의 절단된 버전), 삽입 및/또는 치환을 포함하는, 하나 또는 몇몇 아미노산의 변화; 하나 또는 몇몇 원자의 입체 화학의 변화; 및/또는 이에 제한되지 않으나, 메틸화, 글리코실화, 인산화, 아세틸화, 미리스토일화, 프레닐화, 팔미트화, 아미드화 및/또는 글리코실포스파티딜 이노시톨의 첨가를 포함하는 유도체화를 포함한다. 동족체 또는 변종은 표준 단백질 또는 펩티드와 비교하여 증진된, 감소된 또는 실질적으로 유사한 특성을 가질 수 있다. 동족체 또는 변종은 단백질의 작용제 또는 단백질의 길항제를 포함할 수 있다. 동족체 또는 변종은 이에 제한되지 않으나, 분리된 표준 단백질에 대한 직접 변형, 직접 단백질 합성, 또는 예를 들어 무작위 또는 표적화 돌연변이 유발을 실행하여 단백질 변종 암호화를 가져오기 위한 전통적 또는 재조합 DNA 기술을 이용하는, 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 대한 변형을 포함하는 단백질 생산을 위한 당업계에서 공지된 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 또한, 표준 단백질의 자연 발생 변종이 존재할 수 있으며 (예를 들어, 이소폼, 대립유전자 변종 또는 개체마다 일어날 수 있는 기타 자연적 변종), 본 발명에서 분리, 생산 및/또는 이용될 수 있다.
- [0155] 소정의 단백질의 동족체 또는 변종은 표준 단백질의 아미노산 서열 (예를 들어, 본원에 특정된 아미노산 서열, 또는 특정 단백질의 아미노산 서열)에 대하여, 적어도 약 45%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 55%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 86% 동일하거나, 또는 적어도 약 87% 동일하거나, 또는 적어도 약 88% 동일하거나, 또는 적어도 약 89% 동일하거나, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 91% 동일하거나, 또는 적어도 약 92% 동일하거나, 또는 적어도 약 93% 동일하거나, 또는 적어도 약 94% 동일하거나, 또는 적어도 약 95% 동일하거나, 또는 적어도 약 96% 동일하거나, 또는 적어도 약 97% 동일하거나, 또는 적어도 약 98% 동일하거나, 또는 적어도 약 99% 동일한 (또는 정수 증가분으로 45% 내지 99% 사이의 임의의 백분율) 아미노산 서열로 구성되거나, 필수적으로 구성되거나, 이를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 동족체 또는 변종은 표준 단백질의 아미노산 서열에 대하여 100% 미만 동일, 약 99% 미만 동일, 약 98% 미만 동일, 약 97% 미만 동일, 약 96% 미만 동일, 약 95% 미만 동일할 등의 아미노산 서열로 구성되거나, 필수적으로 구성되거나, 이를 포함한다.
- [0156] 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용되는 백분율(%)에 대한 언급은 다음을 사용하여 수행되는 상동성 평가를 의미한다: (1) 표준 디폴트 파라미터로 아미노산 검색에 대하여 blastp 및 핵산 검색에 대하여 blastn을 이용하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 기본 상동성 검색, 여기서 쿼리 서열은 (본원에 참조로 그 전체로서 포함되는, Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST 및 PSI-BLAST: 단백질 데이터베이스 검색 프로그램의 새로운 생성." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402에 기재된 바와 같이) 디폴트에 의하여 낮은 복잡성 영역에 대하여 필터링됨; (2) 두 서열들의 BLAST 정렬 (예를 들어, 이하 기재하는 파라미터를 이용); 및/또는 (3) 표준 디폴트 파라미터로 PSI-BLAST

(포지션-특이적 반복 BLAST). 기본 BLAST와 두 서열에 대한 BLAST 사이의 표준 파라미터의 일부 차이로 인하여, BLAST 프로그램을 이용하여 두 개의 특정 서열이 상당한 상동성을 가지는 것을 인식될 수 있는 반면, 쿼리 서열로서 서열 중 하나를 이용하는 기본 BLAST로 수행되는 검색은 탐 매치 내에 두번째 서열을 확인하지 못할 것임을 주목한다. 또한, PSI-BLAST는 자동화된, 사용하기 쉬운 "프로필" 검색 버전을 제공하며, 이는 서열 동족체 검색을 위한 민감한 방식이다. 상기 프로그램은 먼저 gapped BLAST 데이터베이스 검색을 수행한다. PSI-BLAST 프로그램은 포지션-특이적 스코어 매트릭스 구성을 위하여 되돌려지는 임의의 상당한 정렬로부터 정보를 이용하며, 이는 다음 라운드의 데이터베이스 검색을 위하여 쿼리 서열을 교체한다. 따라서, 백분율 확인은 이들 프로그램 중 임의의 하나를 이용하여 결정될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0157] 두 개의 특정 서열들을 Tatusova and Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250에 기재되는 바와 같이 BLAST를 이용하여 서로 정렬할 수 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다. 이러한 서열 정렬은 상기 두 서열 간의 Gapped BLAST 검색 (BLAST 2.0) 을 수행하여 결과적인 정렬 내에 갭 (결실 및 삽입)의 도입을 허용하기 위하여 BLAST 2.0 알고리즘을 이용하여 blastp 또는 blastn으로 수행된다. 본원에서 명확성을 목적으로, 두 서열에 대한 BLAST 서열 정렬이 다음과 같은 표준 디폴트 파라미터를 이용하여 수행된다.

[0158] blastn에 대하여, 0 BLOSUM62 매트릭스 사용:

[0159] 매치에 대한 보상 = 1

[0160] 미스매치에 대한 페널티 = -2

[0161] 오픈 갭 (5) 및 연장 갭 (2) 페널티

[0162] (1) 워드 사이즈 (11) 필터 (은)을 제외하고 갭 x_드롭오프 (50)

[0163] 분리된 핵산은 상기 핵산 분자가 자연에서 발견되는 게놈 또는 염색체인 그 자연 환경으로부터 제거된 (즉, 인간 조작이 가하여진) 핵산 분자이다. 이와 같이, "분리된"은 핵산 분자가 정제된 정도를 반영하지 않으나, 그 분자가 전체 게놈 또는 전체 염색체 또는 2 이상의 유전자를 함유하는 게놈의 부분을 포함하지 않음을 나타내며, 상기 핵산 분자는 자연에서 발견된다. 분리된 핵산 분자는 완전한 유전자를 포함할 수 있다. 유전자를 포함하는 분리된 핵산 분자는 이와 같은 유전자를 포함하는 염색체의 단편이 아니라, 그 유전자와 관련되는 코딩 영역 및 조절 영역을 포함하나, 동일 염색에 상에 자연적으로 발견되는 부가적인 유전자를 포함하지 않는다. 분리된 핵산 분자는 또한 유전자 일부를 포함할 수 있다. 분리된 핵산 분자는 또한 자연에서 특정 핵산 서열을 (즉, 이중 서열) 정상적으로 플랭킹하지 않는 부가적인 핵산에 의하여 플랭킹되는 특정 핵산 서열 (즉, 상기 서열의 5' 및/또는 3'에서)을 포함한다. 분리된 핵산 분자는 DNA, RNA (e.g., mRNA), 또는 DNA 또는 RNA의 유도체 (e.g., cDNA)를 포함할 수 있다. 문구 "핵산 분자"는 주로 물리적 핵산 분자를 의미하고, 문구 "핵산 서열"을 주로 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 의미하며, 특히 단백질 또는 단백질의 도메인을 암호화할 수 있는, 핵산 분자, 또는 핵산 서열에 대하여, 상기 두 문구들은 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0164] 재조합 핵산 분자는 형질감염될 세포 내 핵산 분자(들)의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 전사 조절 서열 중 적어도 하나에 작동가능하게 연결되는, 본원에 기재되는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있는 분자이다. 문구 "핵산 분자"가 주로 물리적 핵산 분자를 의미하고 문구 "핵산 서열"이 주로 핵산 분자 상의 뉴클레오티드 서열을 의미하나, 특히 단백질을 암호화할 수 있는 핵산 분자 또는 핵산 서열에 대하여, 상기 두 문구들은 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 또한, 문구 "재조합 분자"는 주로 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 핵산 분자를 의미하나, 동물에 투여되는 문구 "핵산 분자"와 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0165] 재조합 핵산 분자는 임의의 핵산 서열, 전형적으로 이중 서열이고, 본 발명의 융합 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자에 작동가능하게 결합되며, 상기 융합 단백질의 재조합 생산을 가능케 할 수 있으며, 상기 핵산 분자를 본 발명에 따른 숙주 세포 내로 전달할 수 있는, 재조합 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는 상기 벡터 내로 삽입될 분리된 핵산 분자에 인접하는 자연적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 상기 벡터는 원핵 또는 진핵동물 RNA 또는 DNA일 수 있으며, 바람직하게 본 발명에서, 효모 형질감염에 유용한 플라스미드이다. 재조합 벡터는 핵산 분자의 클로닝, 시퀀싱 및/또는 그렇지 않으면 조작에 사용될 수 있으며, 이러한 분자의 전달에 사용될 수 있다 (예를 들어, DNA 조성물 또는 바이러스 벡터-기재-조성물 내에서도와 같이). 재조합 벡터는 바람직하게 핵산 분자의 발현에 사용되며, 또한 발현 벡터로서 언급될 수 있다. 바람직한 재조합 벡터는 효모와

같은 형질감염된 숙주 세포 내에 발현되고 있을 수 있다.

[0166] 본 발명의 재조합 분자 내에, 핵산 분자는 전사 조절 서열, 번역 조절 서열, 복제 기원, 및 숙주 세포와 상용가능하고 본 발명의 핵산 분자의 발현을 조절하는 기타 조절 서열과 같은 조절 서열을 함유하는 발현 벡터에 작동가능하게 연결된다. 특히, 본 발명의 재조합 분자는 하나 이상의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 핵산 분자를 포함한다. 문구 "작동가능하게 연결되는"은 핵산 분자가 숙주 세포 내로 형질감염될 때 (즉, 형질전환, 형질도입 또는 형질감염) 발현되도록 하는 방식으로 핵산 분자를 발현 조절 서열에 연결하는 것을 의미한다.

[0167] 본 발명에 따르면, 용어 "형질 감염"은 외인성 핵산 분자 (즉, 재조합 핵산 분자)가 세포 내로 삽입될 수 있는 임의의 방법을 의미하는데 사용된다. 용어 "형질전환"은 그러한 용어가 조류, 세균 및 효모와 같은 미생물 세포 내로 핵산 분자의 도입을 의미하는데 사용될 때, 용어 "형질감염"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 미생물계 내에서, 용어 "형질전환"은 그 미생물에 의한 외인성 핵산의 획득으로 인한 유전 변화를 기재하는데 사용되며, 용어 "형질감염"과 실질적으로 동의어이다. 따라서, 형질감염 기술은 이에 제한되지 않으나, 형질전환, 세포의 화학적 처리, 유전자총, 전기천공, 미세주입, 리포펙션, 흡착, 감염, 및 프로토플라스트 융합을 포함한다.

[0168] 이하 실험 결과는 예시 목적으로 제공되며 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0169] **실시예**

[0170] **실시예 1**

[0171] 이하 실시예는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 제조를 기재한다.

[0172] 이 실험에서, 효모 (사카로마이세스 세레비시에)를 구리-유도성 프로모터 *CUP1* 또는 구성적 프로모터 *TEF2*의 조절 하에 인간 브라큐리를 발현하도록 엔지니어링하여, 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 생산하였다. 각각의 경우, 브라큐리 항원을 포함하는 융합 단백질을 서열 번호 8로 표시되는, N-에서 C-말단의 프레임 내에 융합되는 다음 서열 요소들을 가지는 단일 폴리펩티드로서 생산하였다 (1) 단백질 분해 효소 분해에 내성을 부여하고 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩티드 (서열 번호 8의 포지션 1 내지 6, 상기 펩티드 서열은 또한 본원에서 서열 번호 11로도 표시됨); 2) 거의 전장 인간 브라큐리 단백질을 나타내는 서열 번호 6의 아미노산 2-435 (서열 번호 8의 포지션 7-440); 및 3) 헥사히스티딘 태그 (서열 번호 8의 포지션 441-446). 융합 단백질 내 사용되는 아미노산 서열은 원한다면 브라큐리 항원의 어느 한 말단을 플랭킹하는 부가적 또는 대안적 아미노산의 사용에 의하여 변경될 수 있으며, 브라큐리 항원의 더 짧은 부분 또한 사용될 수 있다. 서열 번호 8의 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열 (효모 발현에 대하여 최적화된 코돈)은 본원에서 서열 7로 표시된다.

[0173] 간략히, 국립 암 연구소 (Dr. Jeffrey Schlom)에 의하여 제공되는 브라큐리-PCRII 플라스미드로부터 전장 인간 브라큐리 단백질을 암호화하는 DNA를 PCR을 이용하여 증폭시킨 다음, 효모 2 μ m 발현 벡터 내에 *CUP1* 프로모터 (벡터 pGI-100) 또는 *TEF2* 프로모터 (벡터 plu011 또는 pGI-172) 뒤에 *EcoRI* 및 *SpeI* 클로닝 부위에 삽입하였다. 서열 번호 8로 표시되는 완전한 융합 단백질을 암호화하기 위하여, N-말단 안정화 펩티드 MADEAP (서열 번호 11) 및 C-말단 헥사히스티딘 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열들을 또한 상기 플라스미드 벡터에 첨가하였다. 결과 형성되는 플라스미드를 플라스미드 저장을 위하여 DH5 α 내로 및 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 제조를 위하여 사카로마이세스 세레비시에 W303 α 내로 형질전환시켰다.

[0174] 사카로마이세스 세레비시에 내로 형질전환을 리튬 아세테이트/폴리에틸렌 글리콜 형질감염에 의하여 수행하였으며, 1차 형질감염체를 우라실 결여 고체 최소 플레이트 (UDM: 우리딘 드롭아웃 배지) 상에서 선별하였다. U2 (우리딘 드롭아웃 배지) 또는 UL2 (우리딘 및 류신 드롭아웃 배지) 배지 내에서 30°C에서 성장시켜 콜로니를 선별하였다.

[0175] *CUP1* 프로모터 조절 하에 서열 번호 8로 표시되는 인간 브라큐리 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 또한 본원에서 GI-6301로 언급된다. (벡터 plu011 내) *TEF2* 프로모터 조절 하에 서열 번호 8로 표시되는 인간 브라큐리 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 또한 본원에서 GI-6302로 언급한다. (벡터 pGI-172 내) *TEF2* 프로모터 조절 하에 서열 번호 8로 표시되는 인간 브라큐리 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 또한 본원에서 GI-6303으로 언급한다.

[0176] 우리딘 결여 (U2) 또는 우리딘 및 류신 결여 (UL2) 배양액을 평판 및 스타터 배양을 이용하여 접종하고, 30°C, 250rpm에서 20 시간 동안 성장시켰다. 4.2g/L의 Bis-Tris (BT-U2; BT-UL2)를 함유하는 pH 완충 배지를 또한 접종하여 중성 pH 제조 조건 (데이터 나타내지 않음) 하에 생산되는 효모-브라큐리 면역요법체를 평가하였다. 동

일 제제의 최종 배양액을 집중하는데에 일차 배양액을 이용하였다.

[0177] U2 액체 배지에 대한 레시피:

[0178] · 글루코오스 15 g/L

[0179] · 황산암모늄 함유 효모 질소 베이스 6.7 g/L

[0180] · 히스티딘, 트립토판, 아데닌 각각 0.04 g/L, 및 류신 0.06 g/L

[0181] UL2 액체 배지에 대한 레시피:

[0182] · 글루코오스 15 g/L

[0183] · 황산암모늄 함유 효모 질소 기재 6.7 g/L

[0184] · 히스티딘, 트립토판 및 아데닌 각각 0.04 g/L

[0185] 상이한 프로모터의 조절 하에 효모-브라큐리 면역요법 조성물들을 비교하는 최초 실험에서, 효모-브라큐리 배양액이 대략 0.2 Y.U./ml의 밀도에 도달한 후 황산 구리 0.5 mM를 첨가하여 *CUP1*-주도 (유동성 발현) 효모-브라큐리 발현을 개시하고, 배양액이 0.5-1.5 Y.U.의 밀도에 도달할 때까지 계속하였다 (효모-브라큐리는 황산구리 첨가 후 약 1-1.5로만 배가되었으나, 다량의 브라큐리 단백질이 세포에 의하여 생산되었다). *TEF2*-주도 효모-브라큐리 발현은 구성적이며, 이들 세포들의 성장은 배양액이 1.1 내지 4.0 Y.U./ml의 밀도에 도달할 때까지 계속되었다. 그 다음, 각각의 배양액으로부터의 세포를 수확하고, 세척하고, PBS 내에서 56°C에서 1 시간 동안 열-사멸시켰다. 각각의 배양액으로부터 살아있는 세포를 또한 비교를 위하여 가공하였다.

[0186] 배양액의 열-사멸 후, 세포를 PB2 내에서 3회 세척하였다. 총 단백질 발현을 TCA 침전/니트로셀룰로오스 결합 분석에 의하여 및 항-his 태그 모노클로날 항체 및 항-브라큐리 항체(Abcam, Cambridge, MA)를 이용하는 웨스턴 블롯에 의하여 측정하였다. 단백질 함량을 반정량적 디지털 영상화법을 이용하여 정량하였다.

[0187] 최초 발현 실험 결과 (데이터 보이지 않음)는 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물 각각이 *CUP1* 프로모터 또는 *TEF2* 프로모터를 이용하여 브라큐리 융합 단백질을 발현하였음을 입증하였으며, 발현은 배지 (U2 및 UL2) 중 하나를 이용하여 감지되었다. 또한, 항원 발현은 열-사멸된 및 살아있는 효모 세포 모두에서 감지가 가능하였다 (데이터 보이지 않음). 브라큐리 발현은 *CUP1* 프로모터를 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물 (GI-6301) 내에서 현저히 더 높았으며, 따라서 이 조성물을 발현 최적화를 포함하는 추가 연구 및 시험관 내 및 생체 내 실험을 위하여 선택하였다 (이하 실시예 참조).

[0188] 도 1A는 감지를 위하여 항-브라큐리 항체를 이용하는, U2 및 UL2 배지 모두를 이용하는 GI-6301 내 브라큐리 발현을 도시한다. 비-브라큐리 항원을 발현하는 대조 효모는 항체로 염색하지 않았다. 도 1B는 브라큐리 융합 단백질 상에 헥사히스티딘 태그를 확인하기 위하여 항-His를 이용하는, 동일 GI-6301 제제 내 브라큐리 발현을 도시한다. 비-브라큐리 항원을 발현하나 헥사히스티딘 태그를 가지는 대조 효모 또한 도시한다. 이들 결과들은 UL2 배지 내 발현이 현저히 더 높았으나, 두 배지 모두를 사용하여 우수한 브라큐리 발현을 보였다.

[0189] 실시예 2

[0190] 이하 실시예는 항원 발현 및 효모-브라큐리 면역요법 조성물 GI-6301의 제조를 위한 조건의 확인을 기재한다.

[0191] GI-6301 항원 발현의 구리 유도를 위한 최적 밀도를 결정하기 위하여, 실시예 1에 기재한 UL2 배지 내 표준 성장 조건을 이용하여 GI-6301의 스타터 및 중간 배양액을 제조하였다. 그 다음, 상기 배양액의 분취액을 0.5 Y.U./ml, 1.0 Y.U./ml 및 1.5 Y.U./ml로 희석하고, 30°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 0.5 mM CuSO₄를 배양액에 첨가하여 브라큐리 발현을 유도하고, 배양을 계속하였다. 세포를 수집하고 세포 밀도 측정을 위하여 6 시간 및 14 시간에서 계수하였다. 각각의 조건으로부터 20 Y.U.의 열-사멸된 효모를 용해시키고, 총 단백질을 측정하고, 웨스턴 블롯을 항-His를 이용하여 생성하였다.

표 1

[0192]

세포 밀도 (Y.U./ml)	유도 시간		
	0 시간	6 시간	14 시간
	0.5	1.03	0.96
	1.0	1.88	1.74
	1.5	3.14	2.7

[0193]

표 1에 나타나는 바와 같이, 효모는 구리 유도 후 약 1 배 배가되었을 뿐이고 (다른 실험들은 1.5X 배가를 나타냄), 세포 밀도 및 생존률 (보이지 않음)은 구리 유도 6 시간 후 감소하였다. 도 2는 세 가지 유도 밀도 모두 상당한 브라큐리 발현을 가져왔으며, 유도 밀도가 높을수록 브라큐리 발현이 높은 경향이 있음을 보인다. 그러나, 2.1 Y.U./ml 및 2.8 Y.U./ml 및 375 μm CuSO₄의 유도 출발 밀도를 이용하는 부가적인 실험은 구리 유도 개시시 배양액의 밀도가 증가함에 따라 단백질 발현이 감소하기 시작하였으며, 약 6-8 시간 후 현저히 개선되지 않았음을 보였다 (데이터 도시하지 않음).

[0194]

다음, 브라큐리 발현에 대한 CuSO₄의 양의 영향을 조사하였다. GI-6301을 실시예 1에 기재된 바와 같이 UL2 배지 내에서 스타터 및 중간 배양액으로부터 성장시켰다. 그 다음, 상기 배양액의 분취액을 1.0 Y.U./ml로 희석시키고, 30°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. CuSO₄를 375 μM 또는 500 μM의 농도에서 각각의 배양액에 첨가하고, 단백질 발현 유도를 다양한 시간 지점 (2 시간, 4 시간, 6 시간, 8 시간, 24 시간)으로 진행되도록 하였으며, 그 지점에서 세포를 수확하고, 열-사멸시키고, 상기한 바와 같이 항-His 웨스턴 블롯을 이용하여 단백질 발현의 평가를 위하여 가공하였다. 두 농도의 CuO₄ 모두 우수한 브라큐리 발현을 가져왔으나, 375 μM를 이용하는 단백질 발현이 특히 더 늦은 시간 지점에서 약간 더 나은 것으로 보였다 (데이터 도시하지 않음).

[0195]

따라서, CUP1-주도 효모-브라큐리 (유도성 발현)에 있어서, 본 발명자들은 효모의 대수증식기 중기(mid-log growth phase)에서 항원 발현의 유도가 항원 생산에 최적이었음을 발견하였다. 다음 실시예에 사용되는 효모-브라큐리 면역요법 조성물 (GI-6301)의 생산을 위하여, 세포를 실시예 1에 기재한 바와 같이 UL2 배지 내에 1 내지 2 Y.U./ml로 성장시킨 다음, 30°C, 250 rpm에서 6-8 시간 동안 0.375-0.5 mM 황산구리의 첨가에 의하여 유도하였다. 세포를 수확하고, 세척하고, PBS 내에서 56°C에서 1 시간 동안 열 사멸시켰다.

[0196]

실시예 3

[0197]

다음 실시예는 브라큐리 항원이 T 세포 작용제 에피토프를 함유하는 부가적인 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 구성 및 제조에 대하여 기재한다.

[0198]

이 실험에서, 작용제 에피토프인 T 세포 에피토프 WLLPGTSTV (서열 번호 13)을 포함하는 거의 전장 브라큐리 단백질인 인간 브라큐리 항원을 발현하도록 효모 (사카로마이세스 세레비시에)를 엔지니어링하였다. 서열 번호 6 또는 8 내에 존재하는 천연 브라큐리 T 세포 에피토프는 예를 들어 WLLPGTSTL (서열 번호 12)이다. 인간 브라큐리 작용제 항원을 구리-유도성 프로모터 CUP1의 조절 하에 발현시켜 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 생산하였다. 보다 구체적으로, 브라큐리 작용제 항원(즉, 적어도 하나의 작용제 에피토프를 함유하는 브라큐리 항원)을 포함하는 융합 단백질을 서열 번호 20으로 표시되는, N-에서 C-말단 프레임 내에 다음 서열 요소들이 융합되는 단일 폴리펩티드로서 생산하였다 (1) 단백질 가수분해 효소 분해에 대한 내성을 부여하고 발현을 안정화하기 위한 N-말단 펩티드 (서열 번호 20의 포지션 1 내지 6, 상기 펩티드 서열은 본원에서 또한 서열 번호 11로 표시됨); 2) 서열 번호 18의 아미노산 2-435 (서열 번호 20의 포지션 7-440으로 표시됨; 서열 번호 18은 야생형 브라큐리 단백질과 비교하여 포지션 254에서 단일 아미노산 치환을 가지는 전장 인간 브라큐리 작용제 단백질을 나타냄); 및 3) 헥사히스티딘 태그 (서열 번호 20의 포지션 441-446). 상기 작용제 에피토프 (서열 번호 13)는 서열 번호 20의 포지션 251 내지 259 (서열 번호 18의 포지션 246 내지 254)에 위치한다. 이러한 융합 단백질 내에 사용되는 아미노산 서열은 원한다면 브라큐리 항원의 한 말단을 플랭킹하는 부가적 또는 대안적 아미노산의 사용에 의하여 변형될 수 있으며, 더 짧은 브라큐리 항원 부분 또한 사용될 수 있다. 서열 번호 20의 융합 단백질을 암호화하는 헥산 서열 (효모 발현에 대하여 최적화된 코돈)은 본원에서 서열 번호 19로 표시된다.

[0199]

간략히, 전장 브라큐리 단백질에 대하여 포지션 254에서 류신의 발린 치환을 도입하기 위하여 부위 지정 돌연변이에 의하여 변형되는, 실시예 1에 기재한 바와 같은 전장 인간 브라큐리 단백질을 암호화하는 DNA (즉, 전장 브라큐리 마이너스 N-말단 메티오닌)를 PCR을 이용하여 증폭시킨 다음, 효모 2 μm 발현 벡터 내에 CUP1 프로모

터 (벡터 pGI-100) 뒤에 *EcoRI* 및 *SpeI* 클로닝 부위에 삽입하였다. 서열 번호 20으로 표시되는 완전한 융합 단백질의 암호화하기 위하여, N-말단 안정화 펩티드 MADEAP (서열 번호 11) 및 C-말단 헥사히스티딘 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열들을 또한 상기 플라스미드 벡터에 첨가하였다. 결과 형성되는 플라스미드를 플라스미드 저장을 위하여 DH5 α 내로 및 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 제조를 위하여 사카로마이세스 세레비시에 W303 α 내로 형질전환시켰다.

[0200] 사카로마이세스 세레비시에 내로 형질전환을 리튬 아세테이트/폴리에틸렌 글리콜 형질감염에 의하여 수행하였으며, 1차 형질감염체를 우라실 결여 고체 최소 플레이트 (UDM: 우리딘 트립아웃 배지) 상에서 선별하였다. UL2 (우리딘 및 류신 트립아웃 배지) 배지 내에서 30°C에서 성장시켜 콜로니를 선별하였다.

[0201] *CUP1* 프로모터의 조절 하에 서열 번호 20으로 표시되는 인간 브라큐리 작용제 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 또한 본원에서 GI-6305로 언급한다.

[0202] GI-6305 세포를 실시예 1에 기재한 바와 같이 UL2 배지 내에서 1 내지 2 Y.U./ml로 성장시킨 다음, 실시예 2에 기재한 GI-6301에 대하여 본 발명자들에 의하여 개발된 조건을 이용하여, 30°C, 250 rpm에서 6-8 시간 동안 0.375-0.5 mM 황산 구리의 첨가에 의하여 유도하였다. 세포를 수확하고, 세척하고, PBS 내에서 56°C에서 1 시간 동안 열-사멸시켰다.

[0203] 배양액의 열-사멸 후, 세포를 PBS 내에서 3회 세척하였다. 총 단백질 발현을 TCA 침전/니트로셀룰로오스 결합 분석에 의하여 및 항-his 태그 모노클로날 항체 및 항-브라큐리 항체(Abcam, Cambridge, MA)를 이용하는 웨스턴 블롯에 의하여 측정하였다. 단백질 함량을 반정량적 디지털 영상화법을 이용하여 정량하였다.

[0204] 도 1C는 브라큐리 융합 단백질 상에 헥사히스티딘 태그를 확인하기 위하여 항-His를 이용하는 GI-6305 내 브라큐리 작용제 항원의 강력한 발현을 도시한다. 이 실험에서 UL2 배지 내 성장한 GI-6305에 대한 대략적 항원 함량은 >22615 ng/Y.U.였다.

[0205] **실시예 4**

[0206] 다음 실시예는 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 이용하는 브라큐리-특이적 T 세포의 확대를 입증한다.

[0207] 정상적인 기증자로부터 T 세포가 브라큐리 항원 특이적인 T 세포를 생성할 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 수지상 세포 (DCs)를 두 정상적인 기증자의 말초혈액 단핵구 (PBMCs)로부터 제조하였다. 간략히, 분리된 PBMCs를 GM-CSF 및 IL-4의 존재하에 5 일 동안 배양하고, 연이어 대조 효모(빈 벡터 또는 항원-암호화 삽입물을 함유하지 않는 벡터로 형질전환되는 사카로마이세스 세레비시에 효모인 "YVEC"로도 나타냄) 또는 브라큐리 효모 (실시예 1 및 2에 기재한 GI-6301)와 함께 효모:DCs=1:1의 비율로 인큐베이션하였다. 48 시간 동시 배양 후, DCs를 자가 T 세포의 자극을 위하여 APCs로서 사용하였다. IVS (실험관 해 자극)로 표시되는 각각의 자극 사이클은 IL-2 부재 하에 3일 배양 후, 재조합 IL-2 (20 U/ml) 존재 하에 추가적으로 4일로 구성되었다. IVS 2의 후반에, T 세포를 대조 테트라머 또는 브라큐리 펩티드 Tp2 (WLLPGTSTL, 서열 번호 2 또는 서열 번호 6의 포지션 246 내지 254)에 특이적인 테트라머로 스테이닝하였다. 표 2는 각각의 테트라머로 양성 스테이닝된 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다.

표 2

[0208]

기증자	자극	대조 테트라머	브라큐리 테트라머
07706	대조 효모	0.21	0.30
	브라큐리 효모	0.28	0.67
17663	대조 효모	0.04	0.29
	브라큐리 효모	0.05	0.54

[0209] 두번째 실험에서, CM-CSF 및 IL-4 존재 하에 5-일 배양을 이용하여 수지상 세포 (DCs)를 9 명의 정상적인 기증자의 PBMCs로부터 제조하고, 이어서 상기한 바와 같이 효모:DCs=1:1의 비율로 브라큐리 효모 (GI-6301)와 함께 인큐베이션하였다. 동시 배양에서 48 시간 후, 상기 DCs를 자가 T 세포 자극을 위한 APCs로서 사용하였다. 각각의 IVS 사이클을 상기한 바와 같이 수행하였다. IVS 2 후반에, T 세포를 대조 테트라머 또는 브라큐리 펩티드 Tp2에 특이적인 테트라머로 스테이닝하였다. 표 3은 각각의 테트라머로 양성 스테이닝된 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다.

표 3

[0210]

기증자	자극	대조 테트라머	브라큐리 테트라머
07706	브라큐리 효모	0.28	0.67
17663	브라큐리 효모	0.05	0.54
32249	브라큐리 효모	0.01	1.24
29004	브라큐리 효모	0.02	0.36
19063	브라큐리 효모	0.10	2.57
06852	브라큐리 효모	0.05	0.33
26532	브라큐리 효모	0.07	0.11
12172	브라큐리 효모	0.01	0.11
26725	브라큐리 효모	0.01	0.20

[0211]

표 2 및 3의 결과는 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법제로 정상적인 기증자 T 세포의 자극은 대조군과 비교하여 대부분의 정상적 기증자 내 테트라머-양성 CD8+ T 세포의 백분율을 증가시킴을 보이며, 이는 정상적인 인간 T 세포가 면역원성으로서 브라큐리를 인지할 능력을 가짐을 나타내는 것이다.

[0212]

실시예 5

[0213]

다음 실시예는 브라큐리-발현 표적을 용해시키는 정상적인 기증자 PBMCs로부터 브라큐리-특이적 CTLs를 생성하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 능력을 입증한다.

[0214]

이 실험에서, 상기 표 2에서 정상적인 기증자 중 세 명으로부터의 브라큐리-특이적 T 세포를 2 사이클의 IVS (실시예 4에 기재한 바와 같은) 동안 브라큐리 효모 (GI-6301)와 함께 인큐베이션된 DCs를 이용하여 시험관 내 확대시켰다. CDL40L의 존재 하에 성숙한 DCs를 이용하여 세번째 IVS를 수행하였으며, 브라큐리-특이적 Tp2 펩티드 (WLLPGTSTL, 서열 번호 2 또는 서열 번호 5의 포지션 246 내지 254)로 펄스하였다. 5일째에, CD8+ T 세포를 분리하고, 지시된 이펙터:표적 (ET) 비율로 밤새 SW480 (HLA-A2⁺ / 브라큐리 높음) 및 MCF7 (HLA-A2⁺ / 브라큐리 낮음) 종양 세포 표적에 대하여 세포독성 T 림프구 (CTL) 분석에 사용하였다 (도 3 참조). 표 4에 대조 테트라머 대 브라큐리-특이적 Tp2 테트라머로 양성 스테이닝된 CD8+ T 세포의 백분율을 보인다.

표 4

[0215]

정상적 기증자	자극	대조 테트라머	브라큐리 테트라머
07706	브라큐리 효모/Tp2	0.33	1.84
17663	브라큐리 효모/Tp2	0.11	0.65
26532	브라큐리 효모/Tp2	0.05	0.11

[0216]

도 3A (기증자 07706), 3B (기증자 17663) 및 3C (기증자 26532)는 세 명 중 두 명의 정상적 기증자로부터의 PBMCs가 브라큐리를 발현하는 표적을 사멸할 수 있는 CD8+ CTLs를 생성할 수 있었음을 보인다. 이들 데이터는 함께, 효모-브라큐리 면역요법 조성물이 브라큐리-발현 종양 세포를 사멸할 수 있는 브라큐리-특이적 CTLs를 생성할 수 있음을 입증한다.

[0217]

효모-브라큐리 면역요법이 특정 펩티드로 펄스의 부재 하에 (즉, 잠재적으로 복수의 상이한 CTL 에피토프에 대하여 CTLs를 생성함으로써) 브라큐리-특이적 CTLs를 유도할 수 있음을 보이기 위하여, 효모-브라큐리 면역요법 조성물 GI-6301만을 이용하여 (즉, 펩티드 펄스 없음) 시험관 내 확대된 정상적 기증자 T 세포를 이용하여 부가적 실험을 수행하였다. 간략히, 2 사이클의 IVS (실시예 4에 기재한 바와 같은) 동안 GI-6301로 인큐베이션된 DCs를 이용함으로써 정상적 기증자 PBMCs (기증자 19063)로부터 효모-특이적 T 세포를 확대시켰다. 5일째에, CD8+ T 세포를 분리하고, 15:1의 이펙터:표적 (ET) 비율로, 밤새 SW480 (HLA-A2 양성/브라큐리 높음) 및 H226 (HLA-A2 음성/브라큐리 높음)에 대한 CTL 분석에 사용하였다. 도 4A는 SW480 및 H226 종양 세포의 특이적 용균의 백분율을 도시한다. 도 4B는 실시간 RT-PCR에 의한 SW480 및 H226 종양 세포 내 GAPDH에 대한 브라큐리 mRNA 발현을 도시한다. 이들 시험은 효모-브라큐리 면역요법 조성물이 브라큐리-발현 종양 세포를 사멸할 수 있는 브라큐리-특이적 CTLs를 생성할 수 있음을 추가로 입증한다.

[0218] **실시예 6**

[0219] 다음 실시예는 본 발명의 효모-브라큐리 조성물이 암 환자로부터 브라큐리-특이적 T 세포를 확대시킬 수 있음을 입증한다.

[0220] 이 실험에서, PBMCs, CEA 및 MUC-1 항원을 포함하는 바이러스 벡터 백신으로 예방접종후 두 명의 유방암 환자의 PBMCs로부터 DCs를 제조하였다. 상기 DCs를 실시예 4에 기재된 바와 같이 GM-CSF 및 IL-4의 존재하에 5-일 배양으로 제조한 후, 효모:DCs=1:1의 비율로 브라큐리 효모 (GI-6301)의 존재 하에 인큐베이션하였다. 48-시간 동시 배양 후, 상기 DCs를 자가 T 세포의 자극을 위한 APCs로서 사용하였다. 각각의 IVS 사이클은 IL-2 부재 하에 3일 후, 20 U/ml의 재조합 IL-2의 존재 하에 부가적인 4일로 구성되었다. 표 5에 대조 테트라머 또는 브라큐리 펩티드 Tp2에 특이적인 테트라머로 양성 스테이닝된 CD8+ T 세포 (IVS1)의 백분율을 나타낸다.

표 5

환자	자극	대조 테트라머	브라큐리 테트라머
유방 Pt 01	브라큐리 효모	0.11	0.42
유방 Pt 10	브라큐리 효모	0.23	0.91

[0222] 표 5의 결과는 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법제로 유방암 기증자로부터의 T 세포 자극이 대부분의 대조군과 비교하여 대부분의 기증자에서 테트라머-양성 CD8+ T 세포의 백분율을 증가시킴을 입증하며, 이는 암이 진행중인 기증자로부터의 T 세포가 면역원으로 브라큐리를 인식하는 능력을 가짐을 나타낸다.

[0223] **실시예 7**

[0224] 다음 실시예는 효모-브라큐리 면역요법을 이용하는 생체 내 브라큐리에 특이적인 CD4+ T 세포 반응의 생성을 입증한다.

[0225] 이 실험에서, C57BL/6 마우스를 4 YU의 효모-h브라큐리 (GI-6301), 부위 당 1 YU로 네 개의 별개 주사 부위에 투여됨)로 총 4 회 매주 예방접종하였다. 최종 부스트 후 2 주에, 마우스를 희생시키고, CD4+ T 세포를 정제하고 다양한 농도의 브라큐리 정제 단백질 (곤충 세포로부터 얻음)의 존재 하에 증식에 대하여 분석하였다. 대조군으로서, β-Gal을 40 μg/ml로 사용하였다.

[0226] 효모-대조군 (YVEC, 실시예 4 참조) 및 효모-h브라큐리 (GI-6301)로 예방접종된 동물의 비장으로부터 분리된 CD4+ T 세포의 증식을 보이는 결과를 도 5에 도시한다. 도 5는 효모-브라큐리 (GI-6301)로 면역화가 브라큐리-특이적 CD4+ T 세포를 발생시킴을 보인다.

[0227] **실시예 8**

[0228] 다음 실시예는 효모-브라큐리 면역요법 조성물로 면역화가 생체 내 브라큐리-발현 종양을 감소시킴을 입증한다.

[0229] 이 실험에서, C57BL/6 마우스에 1×10^6 MC38-ph브라큐리 세포(재조합 인간 브라큐리를 발현하는 종양 세포)를 꼬리 정맥을 통하여 투여하였다 (0일). 종양 이식 4일 후, 동물은 효모 대조군 (YVEC, 실시예 4 참조) vs. 효모-h브라큐리 (GI-6301)로 매주 예방접종을 받기 시작하였으며, 이는 4 개의 다른 부위에 부위 당 1YU의 투여량으로 투여되었다 (투여 당 총 4YU). 종양 이식 40일 후, 동물을 희생시키고, 폐종양 결절의 수를 산출하였다. 두 개의 조합 실험으로부터의 결과를 도 6에 나타낸다. 표 6은 평균 폐종양 수 (±SEM) 및 ≥5 폐 결절을 가지는 동물의 수 (및 백분율)을 보인다.

표 6

백신 처리	폐 종양 (평균±SEM)	≥5 폐 결절을 가지는 동물 (%)
효모-대조군 (YVEC)	4.1±1.2	7/15(46.7%)
효모-브라큐리 (GI-6301)	1.9±0.5	2/15(13.3%)

[0231] 도 6 및 표 6의 결과는 본 발명의 효모-브라큐리 면역요법 조성물의 투여가 효모를 단독 투여받은 마우스와 비교하여 (브라큐리 항원 없음) 마우스 내 브라큐리-발현 종양을 감소시킬 수 있음을 입증한다.

[0232] **실시예 9**

[0233] 다음 실시예는 건강한 기증자로부터 얻은 인간 말초 혈액 단핵구(PBMCs) 내 효모-브라큐리 면역요법을 이용하는 시험관 내 브라큐리-특이적 CD4+ T 세포 반응의 생성을 입증한다.

[0234] 다음 실시예에서, 전장 인간 브라큐리 단백질을 곤충 세포 내에서 바칼로바이러스 발현을 통하여 발현시키고 이어서 정제하였다.

[0235] 수지상 세포(DCs)를 GM-CSF 및 IL-4와 5-일 배양에 의하여 건강한 기증자의 PBMCs로부터 제조하고, 이어서 효모-대조군 (YVEC, 실시예 4 참조) 또는 효모-브라큐리 (GI-6301, 실시예 1 및 2 참조) (효모:DCs = 1:1)로 시험관 내 처리하였다. 48 시간 후, DCs를 수확하고, 방사선 조사하고 (30 Gy), DC:PBMCs = 1:10dml 비율로 자가 PBMCs의 자극에 사용하였다. 3 일에, IL-2 (10 U/ml)를 배양액에 첨가하였다. 7 일에, 자극된 T 세포를 수확하고, 이어서 10 µg/ml의 정제된 브라큐리 단백질 또는 대조 인간 혈청 알부민 단백질의 존재 하에 또는 자가, 방사선 조사된 PBMCs (T 세포:PBMCs = 1:3) 단독에 대한 IFN-γ 생산에 대하여 시험하였다. 96 시간 자극 후, 상청액을 수집하고 ELISA 분석에 의하여 IFN-γ 수준에 대하여 평가하였다. 총 9 명의 건강한 기증자를 평가하였으며, 3/9 기증자는 효모-브라큐리-처리된 DCs로 시험관 내 자극 후 브라큐리-특이적 CD4+ T 세포 반응을 나타냈다. 3 개의 양성 경우에 대한 결과를 표 7에 제시한다 (수치는 대조 인간 혈청 알부민 단백질 자극에 의하여 유도되는 배경 수준을 감한 후, 브라큐리 단백질에 대한 IFN-γ 수준을 나타낸다); 기증자 3에 대하여, 브라큐리 단백질에 대한 반응을 평가하기 전에 2 자극 사이클을 수행하였다).

표 7

[0236]

기증자 ID	DC 자극	ΔIFN-γ (pg/ml)
1	효모-대조군	1500.0
	효모-브라큐리	2950.0
2	효모-대조군	13.4
	효모-브라큐리	889.0
3	효모-대조군	17.4
	효모-브라큐리	102.8

[0237]

여섯 명의 추가적인 건강한 기증자를 CD4+ 세포 내 IFN-γ의 세포내 사이토카인 스테이닝에 의하여 효모-브라큐리 (GI-6301)-처리된 DCs로 시험관 내 자극 후, 브라큐리 단백질에 대한 CD4+ T 세포 반응에 대하여 평가하였다. 수지상 세포를 GMCSF 및 IL-4로 5-일 배양에 의하여 건강한 기증자의 PBMCs로부터 제조하고, 이어서 효모-대조군 (YVEC) 또는 효모-브라큐리 (GI-6301) (효모:DCs= 1:1)로 시험관 내 처리하였다. 48 시간 후, DCs를 수확하고, 방사선 조사하고 (30 Gy), DC:PBMCs = 1:10의 비율로 자가 PBMCs의 자극을 위하여 사용하였다. 3일에, IL-2 (10 U/ml)를 배양액에 첨가하였다. 7일에, 자극된 T 세포를 수확하고, 이어서 자가 PBMCs (T 세포:PBMCs = 1:3) 단독에 대한 또는 10 µg/ml의 정제된 브라큐리 단백질 또는 대조 인간 혈청 알부민 단백질의 존재 하에 IFN-γ 생산에 대하여 시험하였다. 2 시간 자극 후, BD GOLGISTOP™ 단백질 수송 억제제 (BD Biosciences)를 배양액에 첨가하였다. 4 시간 자극 후, 세포를 수확하고, 투과화하고, 항-CD4 PerCP-Cy5.5 및 항-IFN-γ FITC 항체 (BD Biosciences)를 이용하여 CD4 및 IFN-γ에 대하여 스테이닝하였다. 총 6 명의 건강한 기증자를 평가하였으며, 2/6 기증자가 효모-브라큐리 처리된 DCs로 시험관 내 자극 후 브라큐리-특이적 CD4+ T 세포 반응을 나타냈다. 양성 경우에 대한 결과를 표 8에 나타낸다 (수치는 PBMCs 단독으로 자극에 의하여 유도되는 배경 수준을 감한 후, 대조 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 브라큐리 단백질에 대하여 CD4 및 세포내 IFN-γ에 대하여 동시에 양성되었던 T 세포의 백분율을 나타낸다).

표 8

[0238]

기증자	시험관 내 자극 수	% CD4 ⁺ /IFN-γ 세포	
		HSA	브라큐리
4	1	0.07	0.24
5	2	0.00	1.00

[0239] **실시예 10**

[0240] 다음 실시예는 브라큐리 작용제 항원을 발현하는 효모-브라큐리 면역요법 조성물이 전립선암 환자로부터 브라큐리-특이적 T 세포를 발생시킬 수 있음을 입증한다.

[0241] 브라큐리-특이적 T 세포주를 발생시키기 위하여, 미성숙 자가 수지상 세포 (DCs)를 GI-6305 (실시예 3 참조)로 알려진 효모-브라큐리 면역요법 조성물에 DCs:GI-6305 = 1:1의 비율로 48 시간 동안 노출시키고, 이어서 10:1의 이펙터-대-APC 비율로 자가 비-부착 세포를 자극하기 위하여 항원 제시 세포 (APCs)로 사용하였다. 배양액을 5% CO₂를 함유하는 습윤 대기 내에서 37°C에서 3 일 동안 인큐베이션하고, 이어서 추가적인 7 일 동안 재조합 인간 IL-2로 20 U/ml의 농도로 보충하였다. 상기 10-일 배양은 하나의 시험관 내 자극 (IVS) 사이클을 구성하였다. T 세포를 11일에 상기한 바와 같은 GI-6305-노출된 자가 DCs로 재자극하여, 다음 IVS 사이클을 시작하였다. GI-6305-노출된 자가 DCs를 3 IVS 사이클을 위한 APCs로서 사용하였다. 세번째 IVS 후, 작용제 브라큐리 펩티드 WLLPGTSTV (서열 번호 13)로 펄스된, 방사선 조사된 (23,000 rads) 자가 EBV-형질감염된 B 세포를 APCs로 사용하였다. T-2-BR-A로 표시되는 브라큐리-특이적 세포주를 확립하였다. 이러한 T 세포주를 이하 기재하는 면역분석에 사용하였다.

[0242] 표 9는 GI-6305로 처리된 동종이계 DCs로 자극 후 브라큐리-특이적 T 세포 (T-2-BR-A)가 상당한 수준의 IFN- γ 를 방출하는 반면, 대조 효모 (YVEC, 실시예 4 참조)는 T-2-BR-A 세포에 의하여 IFN- γ 의 방출을 자극하지 않았음을 입증한다. 결과를 pg/ml/10⁵ T 세포로 나타낸다. 간략히, 정상적 기증자로부터 동종이계 HLA-A2-양성 DCs를 GI-6305로 48 시간 동안 다양한 효모 대 DC 비율 (표 9에 나타냄)로 처리한 다음, 브라큐리 작용제 에피토프-특이적 T 세포 (T-2-BR-A)를 자극하는데 사용하였다. 이 실험에서, DC 대 T 세포 비율은 1:1이었다.

표 9

[0243]

수지상 세포	처리	효모/DC 비율	T 세포	IFN- γ
+	대조 효모	10:1	-	<15.6
+	대조 효모	10:1	+	<15.6
-	-	-	+	52.1
+	GI-6305	10:1	-	<15.6
+	GI-6305	10:1	+	589.0
+	GI-6305	5:1	-	<15.6
+	GI-6305	5:1	+	661.1
+	GI-6305	2.5:1	-	<15.6
+	GI-6305	2.5:1	+	341.3
+	GI-6305	1:1	-	<15.6
+	GI-6305	1:1	+	388.2

[0244] 표 10은 GI-6305 처리 DCs를 사용함으로써 확립된 브라큐리-특이적 T 세포가 HLA-A2 양성/브라큐리 양성인 MDA-MB-231 유방암 세포를 효과적으로 용해시킬 수 있으나, HLA-A2 음성/브라큐리 양성인 ASPC-1 췌장암 세포를 용해시키지 않음을 입증한다. 간략히, 상기 브라큐리-특이적 T 세포주 T-2-BR-A를 지시된 이펙터:표적 (ET)< 비율로 (표 10 참조), MDA-MB-231 (HLA-A2⁺/브라큐리⁺) 및 ASPC-1 (HLA-A2⁻/브라큐리⁺) 종양 세포 표적에 대한 암세포독성 T 림프구 (CTL) 분석에서 IVS-6에서 사용하였다. 결과를 특이적 용해의 백분율로 나타냈다.

표 10

[0245]

E:T 비율	MDA-MB-231	ASPC-1
25:1	52.2 (2.8)	-5.1 (2.6)
12.5:1	23.8 (1.4)	0.2 (5.6)
6.25:1	13.9 (4.4)	2.3 (3.3)

[0246] 다른 실험에서, T-2-BR-A 세포주가 브라큐리-특이적 HLA-A2 테트라머에 결합하는 능력을 평가하였다. 간략히, T-2-BR-A 세포 (IVS-R에 사용됨)를 대조 테트라머 또는 브라큐리 작용제 펩티드에 대하여 특이적인 테트라머로

스테이닝하였다. 도 7A 및 7B는 GI-6305-처리된 DCs를 이용하여 생성된 T-2-BR-A 세포주 내 CD8+ T 세포의 10.8%가 브라큐리-HLA-A2 테트라머에 특이적으로 결합하고 (도 7B), 대조 테트라머에 그러하지 않음을 (도 7A) 나타낸다.

[0247] T-2-BR-A T 세포주의 퍼포린 발현을 유세포분석에 의하여 분석하였다 (퍼포린은 세포독성 T 림프구 (CTLs)의 세포용해 활성의 중재자이다). 간략히, T 세포를 브라큐리 작용제 펩티드-펄스된 자가 EBV 형질전환된 B 세포로 재자극 후 5 일째에 시험하였다. 도 8은 브라큐리 작용제 펩티드-펄스된 자가 B 세포로 자극 후 T-2-BR-A 세포주 내 퍼포린 발현을 도시하며, 이는 나아가 GI-6305-처리된 DCs를 이용하여 생성된, 브라큐리-특이적 T 세포주의 세포독성 능력을 입증한다.

[0248] **실시예 11**

[0249] 다음 실시예는 브라큐리-양성 암을 가지는 대상 내에서 제 1 임상 실험을 기재한다.

[0250] 실시예 1, 2 및 4-9에 기재된, GI-6301로 알려진 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 사용하여 개방 표지, 순차 투여-확대, 제1 임상 실험을 개시하였다. 이러한 임상 실험 프로토콜 하에, 9-18 명의 암 환자 (투여 집단 당 3-6명의 환자)에 GI-6301로 알려진 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 4 Y.U.(1 Y.U. x 4 부위, 1 Y.U.의 GI-6301이 각각의 방문에서 환자 신체 상의 4 개의 상이한 부위에 투여됨을 의미함), 16 Y.U. (4 Y.U x 4 부위) 및 40 Y.U. (10 Y.U. x 4 부위)의 투여량 범위를 사용하여 순차적 투여량 집단 확대 프로토콜로 피하 투여하였다. GI-6301을 총 7 방문 동안 (~ 3 개월) 2 주 간격으로, 그 다음, 환자가 오프-스터디 기준을 충족시킬 때까지 매 월 투여한다. 최대 내약 용량 (MTD) 또는 관찰된 최상의 투여량에서 환자의 확대 집단 (n=10)을 추가적 연구를 위하여 선별하였다. 결과는 1차 엔드포인트로서 안전성 및 허용가능성, 및 확대된 집단 내에, ELISpot 분석에서 브라큐리-특이적 T 세포 증가 및 브라큐리 단백질에 대한 증식 (예를 들어, 처리시 출현 또는 확대되는 브라큐리-특이적 CD8+ 또는 CD4+ T 세포)에 의하여 측정되는, T 세포 전구체 내 현저한 변화가 감지가능한지 여부를 모니터링하는 것이다. 2차 엔드포인트로서, 말초 혈액 (CD8⁺ 메모리/이펙터 T 세포, CD4⁺ 메모리/이펙터 T 세포, Tregs, NK 세포, DCs) 내 면역 세포 서브세트의 주기 및 사이토카인(예를 들어, IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-2, IL-4, TGF- β , 등)의 혈청 수준 변화를 포함하는 일반적 면역 활성화의 파라미터뿐 아니라, 무진행 생존기간, 임상적 방사선 반응, 혈청 마커 감소, 및/또는 순환 종양 세포 감소와 같은 임상적 이점을 측정한다.

[0251] GI-6301은 상당한 독성없이 안전하고 내성일 것으로 예상된다. 또한, GI-6301은 적어도 환자의 일부 또는 다수에서 이미 존재하는 브라큐리-특이적 기준 세포 반응의 개선 또는 처리-유발성 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 생산할 것으로 예상된다. 일부 환자는 또한 안정화된 질병을 가질 것으로 예상된다.

[0252] 부가적인 연구 또는 이 연구의 확대에서, GI-6305 (실시예 3 참조)로 알려진 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 상기 결정된 최대 내약 용량 또는 관찰된 최상의 투여량을 이용하여 환자의 부가적 집단에 투여하고, 동일한 1차 및 2차 엔드포인트를 측정한다. GI-6305 또한 환자의 적어도 일부 또는 다수에서 이미 존재하는 브라큐리-특이적 기준 T 세포 반응의 개선 또는 처리-유발성 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 생산할 뿐 아니라, 상당한 독성 없이 안전하고 내성일 것으로 예상된다. 일부 환자는 또한 안정화된 질병을 가질 것으로 예상된다.

[0253] **실시예 12**

[0254] 다음 실시예는 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 이용하는 제2 임상 실험을 기재한다.

[0255] 유방암 환자 내 무작위 제2 임상 실험을 실시예 1 및 2 (예를 들어 GI-6301) 또는 실시예 3 (GI-6305)에 기재된 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 사용하여 수행한다. 단계 I, II 또는 III 브라큐리-양성 유방암을 가지는 적어도 100 명 이상의 대상이 참가한다. 대상 포함 기준은 "삼중 음성" 유방암을 가지는 대상을 또한 포함할 수 있다 (에스트로젠 수용체 (ER), 프로세스테론 수용체 (PR) 및 HER2 각각에 대하여 음성인 암). 대상 포함 기준은 또한 림프 결절-음성 암을 가지는 환자를 포함할 수 있다.

[0256] 상기 실험은 이중 맹검 또는 개방 표지, 위약-조절, 다기관 실험으로서 수행한다. 모든 환자는 치료 중 효모-브라큐리 면역요법 조성물을 환자 팔에 수차례 연속 주사하는 표준 치료를 받았다. 1차 엔드포인트는 재발이 없는 생존기간 또는 총 생존기간이다. 부가적 엔드포인트는 항원-특이적 T 세포 반응 (예를 들어, 치료시 출현 또는 확대되는 브라큐리-특이적 CD8+ T 세포), 림프 결절 음성 유지, 전이로 진행, 및 종양 세포 내 브라큐리 발현을 포함할 수 있다.

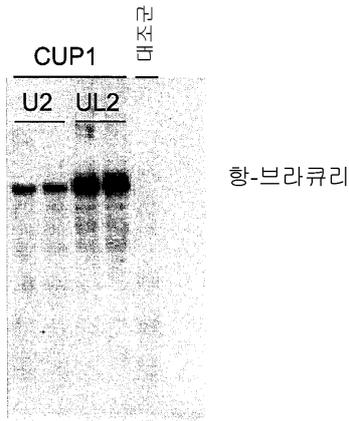
[0257] 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 상당한 독성없이 안전하고 내성이 있을 것으로 예상된다. 또한, 상기 효모-브라큐리 면역요법 조성물은 적어도 환자의 일부 또는 다수에서 이미 존재하는 브라큐리-특이적 기준 T 세포

반응의 개선 및, 또는 처리-유발성 브라큐리-특이적 T 세포 반응을 생산할 것으로 예상된다. 환자의 일부 또는 다수는 또한 안정화된 질병을 가지고, 림프 결절 음성을 유지하고, 및/또는 전이성 진행이 예방, 감소 또는 저지될 것으로 예상된다.

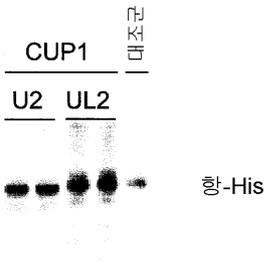
[0258] 본 발명의 다양한 구현예가 상세히 기재되었으나, 이러한 구현예의 변형 및 각색이 일어날 수 있음이 당업자에게 분명하다. 그러나, 그러한 변형 및 각색은 이하 모범적 청구범위에 기재되는 바와 같은 본 발명의 범위 내인 것으로 분명히 이해될 것이다.

도면

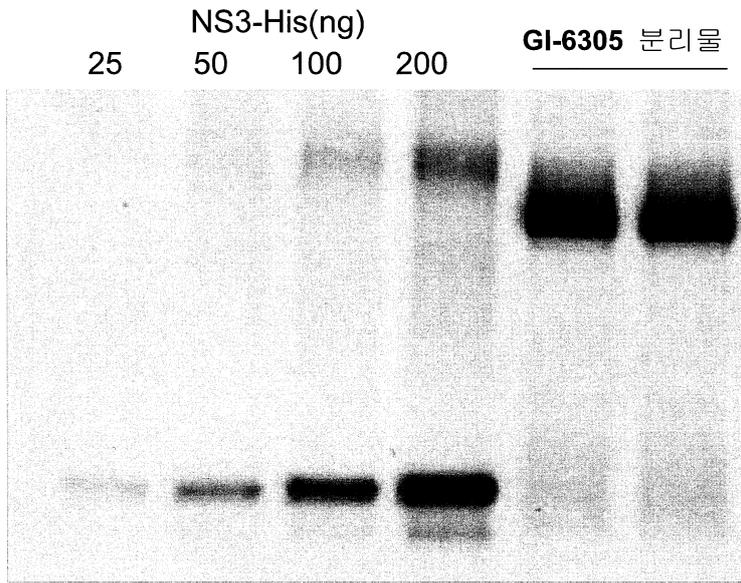
도면1a



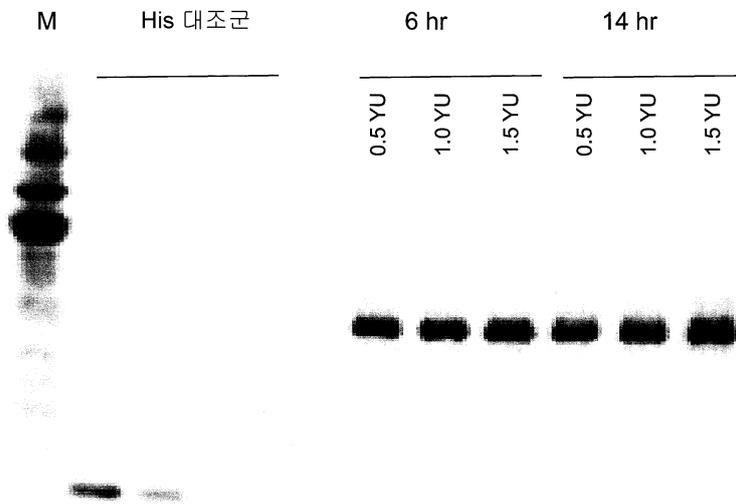
도면1b



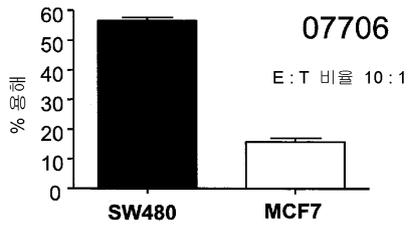
도면1c



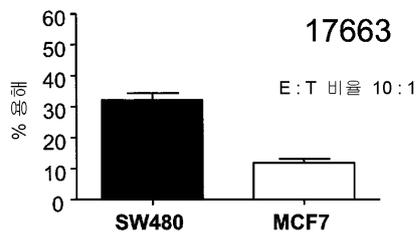
도면2



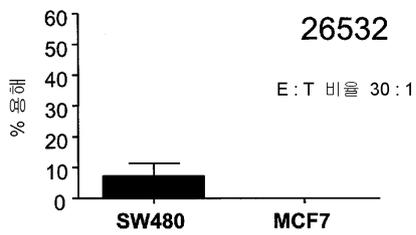
도면3a



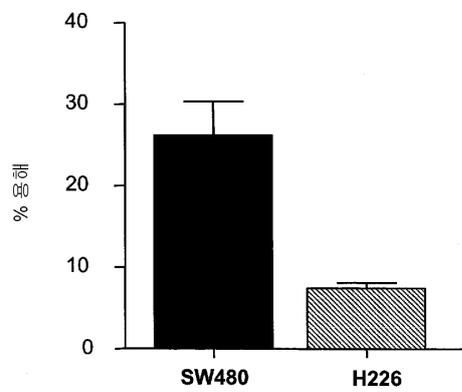
도면3b



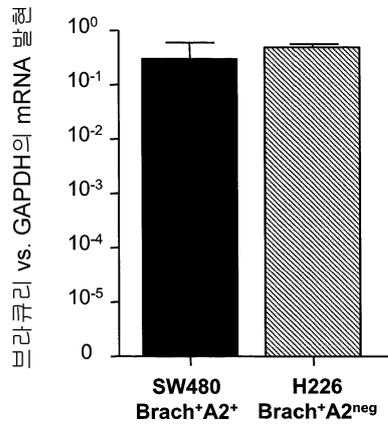
도면3c



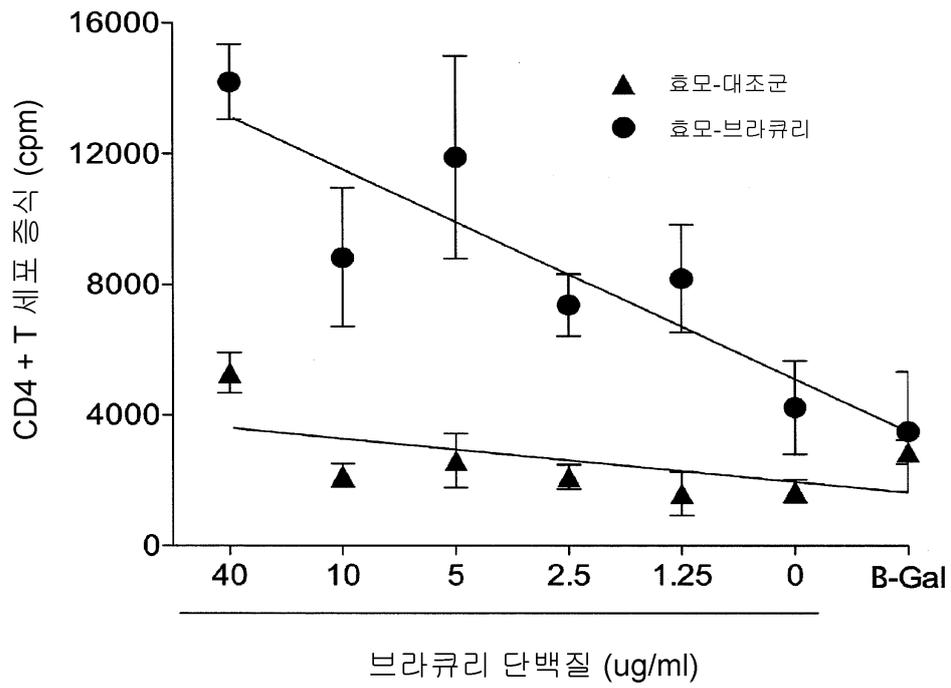
도면4a



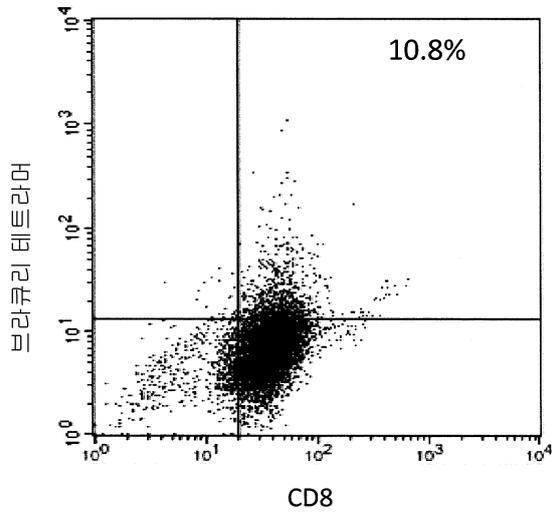
도면4b



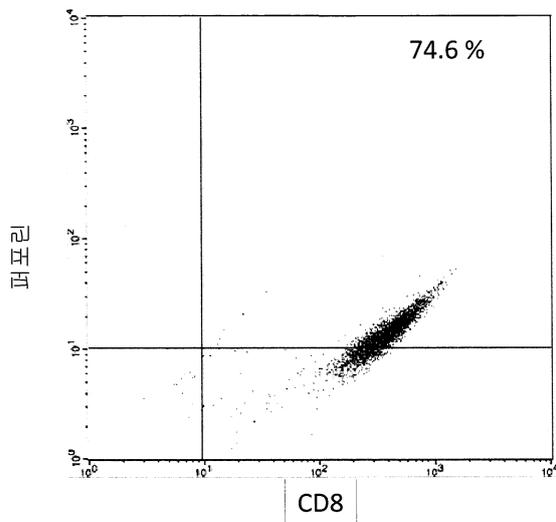
도면5



도면7b



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by the
Secretary, Department of Health
GlobeImmune, Inc.
Palena, Claudia
Guo, Zhimin
Apelian, David

Schlom, Jeffrey

<120> Yeast-Brachyury Immunotherapeutic Compositions for Cancer

<130> 3923-34-PCT

<150> 61/453,656

<151> 2011-03-17

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2518

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221

> CDS

<222> (494)..(1801)

<400> 1

tttgcctttg cttatttccg tccatttccc tctctgcgcg cggaccttcc ttttccagat 60
 ggtgagagcc gcggggacac ccgacgccgg ggcaggctga tccacgatcc tgggtgtgcg 120
 taacccgcc tggggctccg tgggcgaggg acgtgtgggg acaggtgcac cggaaactgc 180
 cagactggag agttgaggca tccgagggcg gagaacagca ctactactgc ggcgagacga 240
 gcgcggcgca tcccaaagcc cggcctaatg cgctcgtccc tgggagggga gggaggcgcg 300
 cctggagcgg ggacagtctt ggtccgcgcc ctctcccgg gtctgtgccg ggacccggga 360
 cccgggagcc gtcgcaggtc tcggccaag gggccccttt tctcggaagg gcggcgcca 420

agagcagga aggtgatct cagtagcga gtctgggctt cggggacggc ggggagggga 480
 gccggacggg agg atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc 529

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

1 5 10

ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg 577

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

15 20 25

cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg 625

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

30 35 40

ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat 673
 Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn
 45 50 55 60
 gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag 721

 Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys
 65 70 75
 gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg 769
 Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu
 80 85 90
 gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa 817
 Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu

 95 100 105
 tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac 865
 Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr
 110 115 120
 atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc 913
 Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro
 125 130 135 140

 gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc 961
 Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly
 145 150 155
 cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata 1009
 Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile
 160 165 170
 gtg aga gtt ggg ggt cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct 1057

 Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro
 175 180 185
 gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca 1105
 Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr
 190 195 200
 gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca 1153

Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala

205 210 215 220

aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc 1201

Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser

 225 230 235

cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc 1249

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

 240 245 250

acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc 1297

Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu

 255 260 265

tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc 1345

Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser

 270 275 280

cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct 1393

His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser

285 290 295 300

cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc 1441

Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser

 305 310 315

cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc 1489

His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu

 320 325 330

ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc 1537

Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro

 335 340 345

agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca 1585

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

 350 355 360

gca gcc gtg tcc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc 1633
 Ala Ala Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro
 365 370 375 380
 gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gcg ccc tct tcc tcg 1681
 Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser
 385 390 395
 gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca gac atc gtg gac 1729

 Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp
 400 405 410
 agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca 1777
 Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr
 415 420 425
 cct gtg tcg cca cct tcc atg tga agcagcaagg cccaggtccc gaaagatgca 1831
 Pro Val Ser Pro Pro Ser Met

 430 435
 gtgacttttt gtcgtggcag ccagtgggta ctggattgac ctactaggtta cccagtggca 1891
 gtctcagggtt aagaaggaaa tgcagcctca gtaacttctt tttcaaagca gtggaggagc 1951
 acacggcacc tttccccaga gccccagcat cccttgctca cacctgcagt agcgggtgctg 2011
 tcccaggtgg cttacagatg aacccaactg tggagatgat gcagttggcc caacctcact 2071
 gacggtgaaa aaatgtttgc caggggtccag aaactttttt tggtttattt ctcatacagt 2131
 gtattggcaa ctttggcaca ccagaatttg taaactccac cagtcctact ttagtgagat 2191

 aaaaagcaca ctcttaatct tcttcttgt tgetttcaag tagttagagt tgagctgtta 2251
 aggacagaat aaaatcatag ttgaggacag caggttttag ttgaattgaa aatttgactg 2311
 ctctgcccc tagaatgtgt gtattttaag catatgtagc taatctcttg tgttgttaaa 2371
 ctataactgt ttcataatct tcttttgaca aagtagccaa agacaatcag cagaaagcat 2431
 tttctgcaaa ataaacgcaa tatgcaaat gtgattcgtc cagttattag tgaagcccct 2491
 ccttttgtga gtatttactg tttattg 2518

 <210> 2
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1 5 10 15
 Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30
 Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45
 Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50 55 60

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

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

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

<400> 3

ggctccgcag agtgaccctt tttcttggaa aagcgggtggc gagagaagtg aaggtggctg 60
 ttgggtaggg agtcaagact cctggaaggt ggagaggggtg gcgggagg atg agc tcg 117
 Met Ser Ser
 1
 ccg ggc aca gag agc gca ggg aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac 165
 Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His
 5 10 15
 ctg ctc agc gcc gtg gag agc gag ctg cag gcg ggc agc gag aag gga 213
 Leu Leu Ser Ala Val Glu Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly
 20 25 30 35
 gac ccc acc gaa cgc gaa ctg cga gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg 261
 Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu
 40 45 50
 tgg ctg cgc ttc aag gag cta act aac gag atg att gtg acc aag aac 309
 Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn
 55 60 65
 ggc agg agg atg ttc ccg gtg ctg aag gta aat gtg tca ggc ctg gac 357
 Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp
 70 75 80
 ccc aat gcc atg tac tct ttc ttg ctg gac ttc gtg acg gct gac aac 405
 Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr Ala Asp Asn
 85 90 95
 cac cgc tgg aaa tat gtg aac ggg gag tgg gta cct ggg ggc aaa cca 453
 His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro
 100 105 110 115
 gag cct cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac cca gac tcg ccc aat 501
 Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn
 120 125 130
 ttt ggg gcc cac tgg atg aag gcg cct gtg tct ttc agc aaa gtc aaa 549
 Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys

tct gct tgt ctg tcc atg ctg cag tcc cat gat aac tgg tct agc etc 1077
 Ser Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu

310 315 320
 gga gtg cct ggc cac acc agc atg ctg cct gtg agt cat aac gcc agc 1125
 Gly Val Pro Gly His Thr Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser

325 330 335
 cca cct act ggc tct agc cag tat ccc agt ctc tgg tct gtg agc aat 1173
 Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn

340 345 350 355

ggt acc atc acc cca ggc tcc cag aca gct ggg gtg tcc aac ggg ctg 1221
 Gly Thr Ile Thr Pro Gly Ser Gln Thr Ala Gly Val Ser Asn Gly Leu

360 365 370
 gga gct cag ttc ttt cga ggc tcc cct gca cat tac aca cca ctg acg 1269
 Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr

375 380 385
 cac acg gtc tca gct gcc acg tcc teg tct tct ggt tct ccg atg tat 1317

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

390 395 400
 gaa ggg gct gct aca gtc aca gac att tct gac agc cag tat gac acg 1365
 Glu Gly Ala Ala Thr Val Thr Asp Ile Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Thr

405 410 415
 gcc caa agc ctc ctc ata gcc teg tgg aca cct gtg tca ccc cca tct 1413
 Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser

420 425 430 435
 atg tga attgaacttt cctccatgtg ctgagacttg taacaaccgg tgtcaactgg 1469
 Met

atcttctagg ctcaaagtgg caggctcttg ggacaaggga aaaataaata aataaaagct 1529
 agatactaac aactccattt tcaaataaga gcaataatac atgtcctata atcatgttct 1589

acagcctctt gtttgatacc tacagtagtg atatgtgtcc tacattatga agccaaggac 1649

agagagacgg ctgiggcca gttttttgtg actggcagtt aatcagagtc ctttgctagg 1709

tagggctcta tatcttgtgt ttctetacaa catatatgtg actttgaaat cctggaattc 1769

gtccaccccc tgcctactt tagtgagaca caaggtacac ctctaattgc ctcccttggt 1829

gccttagagt agttaacttt gaggacagaa aaaagcatag ccagaagatt gtaactgaac 1889

cgtcaactgt tctgcccttg gaacatgcct actttaagca cacgtagctt tttgtgttgg 1949

gaagtcaact gtatggatac ttttctgttg acaaagtagc caaagacaat ctgcagaaag 2009

tgttttctgc acaataaagg caatatatag cacctgg 2046

<210> 4

<211> 436

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1 5 10 15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50 55 60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr
 85 90 95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
 100 105 110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
 115 120 125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
 130 135 140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
 165 170 175
 Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
 180 185 190
 Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
 195 200 205
 Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn
 210 215 220
 Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro Gly Asp Cys Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro Gly Ala Gly Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly Gly Ser Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala Leu Arg Asn His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Ser Ser Pro Thr Tyr Ala
 290 295 300
 Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly Ser Gln Thr Ala Gly Val Ser
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ser

385 390 395 400
Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val Thr Asp Ile Ser Asp Ser Gln
 405 410 415
Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser
 420 425 430
Pro Pro Ser Met
 435
<210> 5

<211> 1305
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(1305)
<400> 5
atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga 48
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
1 5 10 15
gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg cag gcg ggc agc 96
Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30

gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg ggc ctg gag gag 144
Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45
agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat gag atg atc gtg 192
Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50 55 60
acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag gtg aac gtg tct 240

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
65 70 75 80
ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg 288
Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
 85 90 95

gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg 336
 Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly

100 105 110

ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac ccc gac 384
 Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp

115 120 125

tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc gtc tcc ttc agc 432
 Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser

130 135 140

aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc cag atc atg ctg 480
 Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu

145 150 155 160

aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata gtg aga gtt ggg 528
 Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly

165 170 175

gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc 576

Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe

180 185 190

ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att 624
 Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile

195 200 205

aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt 672
 Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser

210 215 220

gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg 720
 Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly

225 230 235 240

tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc ctg tgt cca 768
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro

245	250	255	
cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc			816
Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser			
260	265	270	
acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca			864
Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser			
275	280	285	
ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct			912
Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser			
290	295	300	
gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg			960
Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp			
305	310	315	320
tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac			1008
Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His			
325	330	335	
aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct			1056
Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser			
340	345	350	
gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc			1104
Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr			
355	360	365	
aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc gcg cac tac aca			1152
Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr			
370	375	380	
ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gca ccc tct tcc tcg gga tcc cca ctg			1200
Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu			
385	390	395	400
tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac			1248

Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
 405 410 415
 gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tcg cca 1296
 Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
 420 425 430
 cct tcc atg 1305
 Pro Ser Met

 435
 <210> 6
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1 5 10 15
 Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30
 Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45

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

 Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
 115 120 125
 Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
 130 135 140
 Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu

145 150 155 160
 Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
 165 170 175

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

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

 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr
 355 360 365

 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400

ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg 339

 Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val
 95 100 105 110
 aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc 387
 Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser
 115 120 125
 tgc gtc tac atc cac ccc gac tgc ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg 435
 Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met
 130 135 140
 aag gct ccc gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac 483
 Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn
 145 150 155
 gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga 531
 Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg
 160 165 170

 atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac 579
 Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His
 175 180 185 190
 tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag 627
 Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu
 195 200 205
 gag atc aca gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc 675

 Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe
 210 215 220
 ctt gat gca aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc 723
 Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro
 225 230 235
 gga gac agc cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct 771
 Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro

atc gtg gac agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc 1299
 Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala
 415 420 425 430
 tca tgg aca cct gtg tgc cca cct tcc atg cat cac cat cac cat cac 1347

Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
 435 440 445
 tgagactagt 1357

<210> 8
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 8

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu
 20 25 30
 Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg
 35 40 45
 Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr
 50 55 60
 Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu
 85 90 95
 Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly
 100 105 110
 Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val
 115 120 125
 Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala
 130 135 140

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

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

 275 280 285
 Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn
 290 295 300
 Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met
 325 330 335
 Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr

 340 345 350
 Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln
 355 360 365
 Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser
 370 375 380
 Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser

385 390 395 400
 Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val

 405 410 415
 Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp

 420 425 430
 Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His

 435 440 445

<210> 9
 <211> 1360
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> CDS
 <222> (10)..(1353)
 <400> 9

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcg ccg ggc aca gag agc gca 51

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

 1 5 10

ggg aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctc agc gcc gtg gag 99
 Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu

15 20 25 30

agc gag ctg cag gcg ggc agc gag aag gga gac ccc acc gaa cgc gaa 147
 Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu

 35 40 45

ctg cga gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag 195
 Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu

 50 55 60

cta act aac gag atg att gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttc ccg 243
 Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro

 65 70 75

gtg ctg aag gta aat gtg tca ggc ctg gac ccc aat gcc atg tac tct 291

Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser
80 85 90
ttc ttg ctg gac ttc gtg acg gct gac aac cac cgc tgg aaa tat gtg 339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val
95 100 105 110
aac ggg gag tgg gta cct ggg ggc aaa cca gag cct cag gcg ccc agc 387

Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser
115 120 125
tgc gtc tac atc cac cca gac tgc ccc aat ttt ggg gcc cac tgg atg 435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met
130 135 140
aag gcg cct gtg tct ttc agc aaa gtc aaa ctc acc aac aag ctc aat 483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn
145 150 155
gga ggg gga cag atc atg tta aac tcc ttg cat aag tat gaa cct cgg 531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg
160 165 170
att cac atc gtg aga gtt ggg ggc ccg caa cgc atg atc acc agc cac 579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His
175 180 185 190
tgc ttt ccc gag acc cag ttc ata gct gtg act gcc tac cag aat gag 627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu
195 200 205
gag att aca gcc ctt aaa att aaa tac aac cca ttt gct aaa gcc ttc 675
Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe
210 215 220
ctt gat gcc aaa gaa aga aac gac cac aaa gat gta atg gag gaa ccg 723

Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro
225 230 235
ggg gac tgc cag cag ccg ggg tat tcc caa tgg ggg tgg ctt gtt cct 771
Gly Asp Cys Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro

240	245	250	
ggt gct ggc acc ctc tgc ccg cct gcc agc tcc cac cct cag ttt gga			819
Gly Ala Gly Thr Leu Cys Pro Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly			
255	260	265	270
ggc tcg ctc tct ctc ccc tcc aca cac ggc tgt gag agg tac cca gct			867
Gly Ser Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala			
	275	280	285
cta agg aac cac cgg tca tcg ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg			915
Leu Arg Asn His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg			
	290	295	300
aac agc tet cca acc tac gcg gac aat tca tct gct tgt ctg tcc atg			963
Asn Ser Ser Pro Thr Tyr Ala Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met			
	305	310	315
ctg cag tcc cat gat aac tgg tct agc ctc gga gtg cct ggc cac acc			1011
Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr			
	320	325	330
agc atg ctg cct gtg agt cat aac gcc agc cca cct act ggc tct agc			1059
Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser			
335	340	345	350
cag tat ccc agt ctc tgg tct gtg agc aat ggt acc atc acc cca ggc			1107
Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly			
	355	360	365
tcc cag aca gct ggg gtg tcc aac ggg ctg gga gct cag ttc ttt cga			1155
Ser Gln Thr Ala Gly Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg			
	370	375	380
ggc tcc cct gca cat tac aca cca ctg aca cac acg gtc tca gct gcc			1203
Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala			
	385	390	395
acg tcc tcg tct tct ggt tct ccg atg tat gaa ggg gct gct aca gtc			1251
Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val			

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

Ile Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser
 420 425 430
 Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
 435 440 445

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 11

Met Ala Asp Glu Ala Pro

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val

1 5 10

<210> 17

<211> 1305

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> CDS

<222> (1)..(1305)

<400> 17

atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga 48

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

1 5 10 15

gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg cag gcg ggc agc 96

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

20	25	30	
gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg ggc ctg gag gag			144
Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu			
35	40	45	
agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat gag atg atc gtg			192
Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val			
50	55	60	
acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag gtg aac gtg tct			240
Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser			
65	70	75	80
ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg			288
Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala			
85	90	95	
gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg			336
Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly			
100	105	110	
ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac ccc gac			384
Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp			
115	120	125	
tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc gtc tcc ttc agc			432
Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser			
130	135	140	
aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc cag atc atg ctg			480
Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu			
145	150	155	160
aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata gtg aga gtt ggg			528
Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly			
165	170	175	
gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc			576
Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe			
180	185	190	

ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att 624
 Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
 195 200 205

aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt 672
 Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser
 210 215 220

gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg 720
 Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240

tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc gtg tgt cca 768

Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro
 245 250 255

cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc 816
 Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270

acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca 864
 Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
 275 280 285

ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct 912
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300

gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg 960
 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320

tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac 1008
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335

aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct 1056
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350

gtg agc aac ggc gcc gtc acc cgg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc 1104

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

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

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

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

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

tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac 1248

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

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

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

cct tcc atg 1305

Pro Ser Met
 435

<210> 18
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 18

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1 5 10 15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45

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

50 55 60
 Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
 65 70 75 80
 Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala

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

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

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

 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300

Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
 405 410 415
 Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
 420 425 430
 Pro Ser Met
 435
 <210> 19
 <211> 1370
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> CDS
 <222> (10)..(1350)
 <400> 19
 gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg 51
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala
 1 5 10
 gga aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag 99
 Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu
 15 20 25 30

aat gag ctg cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa 147
 Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu
 35 40 45

 ctg cgc gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag 195
 Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu
 50 55 60

 ctc acc aat gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg 243
 Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro
 65 70 75

 gtg ctg aag gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc 291

 Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser
 80 85 90

 ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg 339
 Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val
 95 100 105 110

 aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc 387
 Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser
 115 120 125

 tgc gtc tac atc cac ccc gac teg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg 435
 Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met
 130 135 140

 aag get ccc gtc tcc ttc age aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac 483
 Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn
 145 150 155

 gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga 531
 Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg
 160 165 170

 atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag gcg atg atc acc agc cac 579
 Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His
 175 180 185 190

tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag 627

Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu
 195 200 205

gag atc aca gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc 675

Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe
 210 215 220

ctt gat gca aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc 723

Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro
 225 230 235

gga gac agc cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct 771

Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro
 240 245 250

gga acc agc acc gtg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga 819

Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly
 255 260 265 270

ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc 867

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

ctg agg agc cac egg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg 915

Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg
 290 295 300

aac aat tet cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg 963

Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met
 305 310 315

ctg caa tcc cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc 1011

Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro
 320 325 330

agc atg ctc ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt 1059

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

335 340 345 350
 cag tac ccc agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc 1107
 Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly
 355 360 365
 tcc cag gca gca gcc gtg acc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg 1155
 Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg
 370 375 380

 ggc tcc ccc gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gca ccc 1203
 Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro
 385 390 395
 tct tcc tcg gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac 1251
 Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn
 400 405 410
 atc gtg gac agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc 1299

 Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala
 415 420 425 430
 tca tgg aca cct gtg tcg cca cct tcc atg cat cac cat cac cat cac 1347
 Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
 435 440 445
 tga gactagtccc gggcggccgc 1370

 <210> 20
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 20
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu
 20 25 30
 Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg
 35 40 45

Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr
 50 55 60

Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu
 65 70 75 80

Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu
 85 90 95

Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly
 100 105 110

Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val
 115 120 125

Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala
 130 135 140

Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His
 165 170 175

Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe
 180 185 190

Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile
 195 200 205

Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp
 210 215 220

Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp
 225 230 235 240

Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr
 245 250 255

Ser Thr Val Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala
 260 265 270

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

Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn

