(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0096711
(43) 공개일자 2024년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 14/47* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 14/4748* (2013.01)
*A61K 39/001184* (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7018738(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년12월13일
심사청구일자 2024년06월04일
(62) 원출원 특허 10-2020-7019769
원출원일자(국제) 2018년12월13일
심사청구일자 2020년07월09일
(85) 번역문제출일자 2024년06월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/065534
(87) 국제공개번호 WO 2019/118771
국제공개일자 2019년06월20일
(30) 우선권주장
62/598,329 2017년12월13일 미국(US)
62/598,612 2017년12월14일 미국(US)

(71) 출원인
**이노비오 파마수티컬즈, 인크.**
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트 110 저먼타운 파이크 660
(72) 발명자
**얀 지안**
미국 펜실베이니아주 19086, 월링포드 셰필드 드라이브 503
**슬래거 안나**
미국 펜실베이니아주 19446, 랜스데일 웨인코트 코트 205
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인엠에이피에스**

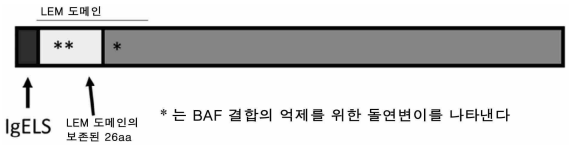
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **LEMD1을 표적화하는 암 백신 및 이의 용도**

## (57) 요 약

본원에는 돌연변이된 공통 LEMD1 항원을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 개시된다. 돌연변이된 공통 LEMD1 항원을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 벡터, 조성물, 및 백신이 개시된다. LEMD1-발현 종양이 있는 대상체를 치료하는 방법 및 LEMD1-발현 종양을 예방하는 방법이 개시된다. 돌연변이된 공통 LEMD1 항원이 개시된다.

*대 표 도* - 도2



(52) CPC특허분류
***A61P 35/00*** (2018.01)
*A61K 2039/53* (2013.01)
(72) 발명자
**가먼 브래들리**
미국 펜실베이니아주 19038, 글렌사이드 애빙턴 애비뉴 539
**쿠치 닐**
미국 펜실베이니아주 19075, 오어랜드 필버트 로드 525

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

서열번호: 3에 제시된 핵산 서열; 또는, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자:

(a) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84를 암호화하는 핵산 서열;

(b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84를 포함하는 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열;

(c) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 96% 초과 동일하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 포함하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열;

(d) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열;

(e) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258;

(f) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편;

(g) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 암호화하는 단편; 및

(h) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 암호화하는 단편.

### 청구항 2

제1항의 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 벡터가 플라스미드 또는 바이러스 벡터인, 벡터.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 핵산 분자가 프로모터 및 폴리-아데닐화 신호로부터 선택된 조절 요소에 작동가능하게 연결되는 것인, 벡터.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프로모터가 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터(hCMV 프로모터)인, 벡터.

### 청구항 6

제4항에 있어서, 상기 폴리-아데닐화 신호가 소 성장 호르몬 폴리-아데닐화 신호(bGH polyA)인, 벡터.

### 청구항 7

제1항에 제시된 하나 이상의 핵산 분자를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한, 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 9**

제2항에 제시된 하나 이상의 벡터를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한, 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 11**

서열번호: 4에 제시된 아미노산 서열; 또는, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 단백질:

(a) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84;

(b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편;

(c) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 96% 초과 동일하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 서열; 및

(d) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 포함하는 단편.

**청구항 12**

항원을 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한, 백신으로서, 상기 항원이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 백신:

(a) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84;

(b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편;

(c) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 서열; 및

(d) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 포함하는 단편.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 항원이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 암호화되는 것인, 백신:

(a) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258;

(b) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편;

(c) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 암호화하는 단편; 및

(d) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 암호화하는 단편.

**청구항 14**

핵산 분자를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한, 백신으로서,

상기 핵산 분자가 서열번호: 3에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 암호화하는 것인,

백신.

**청구항 15**

핵산 분자를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한, 백신으로서,

상기 핵산 분자가, 서열번호: 4에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐적어도 95.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 갖는 펩티드를 암호화하는 것인,

백신.

**청구항 16**

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 핵산 분자가 발현 벡터를 포함하는 것인, 백신.

**청구항 17**

제12항 또는 제13항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는, 백신.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 부형제가 애주번트인, 백신.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 애주번트가 IL-12, IL-15, IL-28, 또는 RANTES인, 백신.

**청구항 20**

펩티드를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한, 백신으로서,

상기 펩티드가, 서열번호: 4에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 각각 적어도 95.5% 동일성을 갖고 서열번호: 4의 위치 37 및 42에 대응하는 위치들에서 알라닌 아미노산 잔기를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인,

백신.

**청구항 21**

펩티드를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료 또는 예방하기 위한. 백신으로서,

상기 펩티드가 서열번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인,

백신.

**청구항 22**

치료 유효량의 제1항에 따른 핵산 분자를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료하기 위한, 약제학적 조성물.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 전기천공에 의한 투여를 위하여 제조되는 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 상기 대상체 상의 하나 이상의 부위에서 투여를 위하여 제조되는 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 25**

체액성 면역 반응을 유도하는데 효과적인 양의 제1항에 따른 핵산 분자를 포함하여 LEMD1-발현 암성 세포에 대

해 대상체를 백신접종하기 위한, 약제학적 조성물.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 전기천공에 의한 투여를 위하여 제조되는 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 상기 대상체 상의 하나 이상의 부위에서 투여를 위하여 제조되는 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 28**

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호: 8의 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2017년 12월 13일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 제62/598,329호 및 2017년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 제62/598,612호에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 2018년 12월 12일에 작성된 상기 ASCII 사본의 파일명은 104409_000449_sequence_listing.txt이며 크기는 25,040 바이트이다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 발명은 LEMD1 항원 및 이를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 LEMD1 면역원 및/또는 핵산 분자를 포함하는 백신에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 면역 반응을 유도하고 LEMD1을 발현하는 암 세포 또는 종양을 갖는 대상체를 예방 및/또는 치료하기 위해 백신을 사용하는 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0007] 암은 미국 및 전세계에서 주요 사망 원인으로 남아있다. 암 백신 시장은 빠르게 성장하고 있다. 효과적인 종양 백신은 종양 성장을 방지하는데 유용할 수 있고/있거나 진행성 암이 있는 환자에 대한 표준 치료에 보다 효과적이고, 독성이 적은 대안으로 유용할 수 있다. 암과 연관된 항원 및, 따라서, 항-종양 백신에 대한 표적은 LEMD1이다.

[0008] LEMD1은 내핵막(INM)에 국부화된 20 kD 단백질이다. 거기에서, LEMD1은 핵 라미나(nuclear lamina)와 회합하는 데, 핵 라미나는 핵 기계적 기능 및 이질염색질 조직화에 관련된다. LEMD1은 LAP2-에머린-MAN1(LEM) 도메인을 특징으로 하며, 초기에는 DNA 가교 단백질인 장벽-자동통합 인자(BAF)에 대한 결합을 부여하는 대략 40개 아미노산의 보존된 구형 모듈로서 기재되었다.

[0009] BAF-DNA 핵단백질 복합체는 라민과의 회합으로 핵 재조립(nuclear reassembly)에서 중요한 역할을 하고, 유사분열의 끝에서 염색질의 탈축합을 향상시킨다. LEMD1의 증가된 발현은 빠르게 성장하는 암 세포의 유사분열에 관련될 수 있다. Yuki, D. et al, Isolation of LEM Domain-Containing 1, a Novel Testis-specific Gene Expressed in Colorectal Cancers. *Oncology reports* **12**, 275-280(2004). 6개의 LEMD1 이소형(isoform)이 LEMD1A 내지 LEMD1F로 확인된 바 있다.

[0010] 암의 치료 및 예방을 위한 백신이 관심을 끌고 있다. 그러나, 종양 세포 항원을 표적화하는 기존 백신은 *생체 내* 불량한 항원 발현에 의해 제한된다. 따라서, 암을 앓고 있는 대상체에서 암을 예방 및/또는 치료하고 사망률을 감소시키기 위한 안전하고 효과적인 백신 및 이의 사용 방법에 대한 당업계의 요구가 남아있다.

## *발명의 내용*

[0011] 본원에는 (a) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198을 암호화하는 핵산 서열; (b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84를 암호화하는 핵산 서열; (c) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271을 암호화하는 핵산 서열; (d) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198을 포함하는 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열; (e) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84를 포함하는 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열; (f) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271을 포함하는 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열; (g) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 단백질을 암호화하는 핵산 서열; (h) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 단백질을 암호화하는 핵산 서열; (i) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 단백질을 암호화하는 핵산 서열; (j) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열; (k) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열; 및 (l) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 단백질의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편을 암호화하는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 개시된다.

[0012] (a) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600; (b) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258; (c) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819; (d) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819를 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 단편; (h) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 단편; (i) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 단편; (j) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 1, 3, 또는 5에 제시된 핵산 서열을 포함한다.

[0013] 또한 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자가 제공되며, 여기서 핵산 분자는 플라스미드 또는 벡터 내로 혼입된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 프로모터 및 폴리-아데닐화 신호로부터 선택된 조절 요소에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터(hCMV 프로모터)이다. 또 다른 구현예에서, 폴리-아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리-아데닐화 신호(bGH polyA)일 수 있다. 또 추가의 구현예에서, 핵산 분자는 바이러스 벡터 내로 혼입될 수 있다.

[0014] 또한 본원에 제시된 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 조성물이 개시된다. 일부 측면에서, 이들 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.

[0015] 또한 본원에는 (a) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198; (b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84; (c) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271; (d) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열; (h) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열; (i) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열; (j) 서열번호: 2의 아미노산 서열 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 6의 아미노산 서열 19 내지 198 및 206 및 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 펩티드가 제공된다.

[0016] 또한 항원을 포함하는 백신이 본원에 제공되며, 여기서 항원은 (a) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198; (b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84; (c) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271; (d) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 6의 아미노산 잔기

19 내지 198 및 206 내지 271의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열; (h) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열; (i) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열; (j) 서열번호: 2의 아미노산 서열 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 6의 아미노산 서열 19 내지 198 및 206 및 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 백신의 항원은 (a) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600; (b) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258; (c) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819; (d) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819를 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 단편; (h) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 단편; (i) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 단편; (j) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 암호화된다.

[0018] 핵산 분자를 포함하는 추가적인 백신이 제공되며 여기서 핵산 분자는 서열번호: 1, 3, 또는 5에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0019] 또한 핵산 분자를 포함하는 백신이 본원에 개시되며 여기서 핵산 분자는 서열번호: 2, 4, 또는 6에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 발현 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 백신은 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 애주번트(adjuvant)를 추가로 포함한다.

[0020] 또한 펩티드를 포함하는 백신이 개시되며, 여기서 펩티드는 서열번호: 2, 4, 또는 6에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] 또한 치료 유효량의 본원에 기재된 백신을 투여하는 단계를 포함하는, LEMD1-발현 암성 세포가 있는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0022] 체액성 면역 반응을 유도하는데 효과적인 본원에 기재된 바와 같은 백신의 양을 투여하는 단계를 포함하는, LEMD1-발현 암성 세포에 대해 대상체를 백신접종하는 방법.

## *도면의 간단한 설명*

[0023] **도 1a**는 합성 공통 LEMD1A(서열번호: 13)와 천연 인간 LEMD1A(서열번호: 14)의 아미노산 19-198의 서열 정렬이다. **도 1b**는 천연 및 합성 공통 LEMD1A 사이의 서열 동일성 및 분기(divergence)를 제시한다.

**도 2**는 합성 공통 LEMD1A의 개략도이다.

**도 3**은 pGX1431을 생성하는데 이용되는 클로닝 전략을 예시한다.

**도 4a**는 합성 공통 LEMD1F(서열번호: 15)와 천연 인간 LEMD1F(서열번호: 16)의 아미노산 19-84의 서열 정렬이다. **도 4b**는 천연 및 합성 공통 LEMD1F 사이의 서열 동일성 및 분기를 제시한다.

**도 5**는 합성 공통 LEMD1F의 개략도이다.

**도 6**은 pGX1432를 생성하는데 이용되는 클로닝 전략을 예시한다.

**도 7**은 합성 공통 LEMD1AF의 개략도이다.

**도 8**은 pGX1433을 생성하는데 이용되는 클로닝 전략을 예시한다.

**도 9**는 횡문근육종 세포에서, 작제물 pGX1431, pGX1432, 및 pGX1433으로부터 생성된 각각 합성 공통 LEMD1A,

LEMD1F, 및 LEMD1AF의 발현을 결정하는 웨스턴 블롯(western blot)을 제시한다.

**도 10**은 세포성 면역 반응을 특징화하는데 사용되는 유동 세포분석 게이팅 전략을 도시한다.

**도 11a, 도 11b, 및 도 11c**는 각각 합성 공통 LEMD1A, 합성 공통 LEMD1F, 및 합성 공통 LEMD1AF의 면역원성을 그래프로 예시한다.

**도 12a, 도 12b, 및 도 12c**는 각각 합성 공통 LEMD1A, 합성 공통 LEMD1F, 및 합성 공통 LEMD1AF에 의해 유도된 CD4+ T-세포의 상대 빈도를 그래프로 예시한다. **도 12d**는 합성 공통 LEMD1A 및 합성 공통 LEMD1F에 의해 유도된 CD4+ T-세포의 상대 빈도를 비교한다. **도 12e**는 CD4+ T-세포 구획에서 합성 공통 LEMD1A, LEMD1F, 및 LEMD1AF에 의해 유도된 사이토카인 프로파일을 예시한다.

**도 13a, 도 13b, 및 도 13c**는 각각 합성 공통 LEMD1A, 합성 공통 LEMD1F, 및 합성 공통 LEMD1AF에 의해 유도된 항원 특이적 CD4+ CD107a+ T-세포의 세포용해 가능성을 그래프로 예시한다. **도 13d**는 합성 공통 LEMD1A 및 합성 공통 LEMD1F에 의해 유도된 CD4+ CD107a+ T-세포의 상대 빈도를 비교한다. **도 13e**는 pGX1431, pGX1432, 및 pGX1433에 의해 CD4+ CD107a+에서 유도된 사이토카인 프로파일을 예시한다.

**도 14a, 도 14b, 및 도 14c**는 LEMD1A(합성 공통 pGX1431), LEMD1F(합성 공통 pGX1432), 및 LEMD1AF(합성 공통 pGX1433)에 의해 유도된 CD8+ T-세포의 상대 빈도를 그래프로 예시한다. **도 14d**는 합성 공통 LEMD1A 및 합성 공통 LEMD1F에 의해 유도된 CD8+ T-세포의 상대 빈도를 비교한다. **도 14e**는 CD8+ T-세포 구획에서 합성 공통 LEMD1A, LEMD1F, 및 LEMD1AF에 의해 유도된 사이토카인 프로파일을 예시한다.

**도 15a, 도 15b, 및 도 15c**는 각각 합성 공통 LEMD1A, 합성 공통 LEMD1F, 및 합성 공통 LEMD1AF에 의해 유도된 항원 특이적 CD8+ CD107a+ T-세포의 세포용해 가능성을 그래프로 예시한다. **도 15d**는 합성 공통 LEMD1A 및 합성 공통 LEMD1F에 의해 유도된 CD8+ CD107a+ T-세포의 상대 빈도를 비교한다. **도 15e**는 LEMD1A(합성 공통 pGX1431), LEMD1F(합성 공통 pGX1432), 및 LEMD1AF(합성 공통 pGX1433)에 의해 CD8+ CD107a+에서 유도된 사이토카인 프로파일을 예시한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0024] 본 발명은 LEMD1 항원을 포함하는 백신에 관한 것이다. LEMD1은 많은 종양에서 발현된다. 따라서, 백신은 LEMD1을 발현하는 암 또는 암-기반 종양에 대한 치료를 제공한다. 본 발명의 백신은 치료를 필요로 하는 대상체의 암의 특정한 예방 또는 치료를 위한 특정한 암 항원의 임의의 조합을 제공할 수 있다.

[0025] 재조합 암 항원의 핵산 및 이의 암호화된 아미노산 서열을 설계하는 한 가지 방법은 천연 암 항원의 전체 아미노산 서열에서 특정한 아미노산을 변화시키는 돌연변이를 도입하는 것이다. 돌연변이의 도입은 포유류 대상체, 및 바람직하게는 인간 또는 개 대상체에 걸쳐 보편적으로 적용될 수 없을 정도로 암 항원을 그렇게 많이 변경시키지 않지만, 생성된 아미노산 서열이 내성을 파괴하거나 또는 면역 반응을 생성하기 위해 외부 항원으로 간주되기에 충분히 변화시킨다. 다른 방식은 상응하는 천연 암 항원에 대해 적어도 85% 및 최대 99% 아미노산 서열 동일성; 바람직하게는 적어도 90% 및 최대 98% 서열 동일성; 보다 바람직하게는 적어도 93% 및 최대 98% 서열 동일성; 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 95% 및 최대 98% 서열 동일성을 갖는 공통 재조합 암 항원을 생성하는 것일 수 있다. 일부 경우에 재조합 암 항원은 그의 상응하는 천연 암 항원에 대해 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아미노산 서열 동일성이다. 천연 암 항원은 특정한 암 또는 암 종양과 정상적으로 연관된 항원이다. 암 항원에 따라, 암 항원의 공통 서열은 포유류 종에 걸쳐 또는 종의 아형 내에서 또는 바이러스 균주 또는 혈청형에 걸쳐 있을 수 있다. 일부 암 항원은 암 항원의 야생형 아미노산 서열과 크게 다르지 않다. 일부 암 항원은 종에 걸쳐 매우 다양한 핵산/아미노산 서열을 가지며, 공통 서열이 생성될 수 없다. 이러한 경우에, 상응하는 천연 암 항원에 대해 적어도 85% 및 최대 99% 아미노산 서열 동일성; 바람직하게는 적어도 90% 및 최대 98% 서열 동일성; 보다 바람직하게는 적어도 93% 및 최대 98% 서열 동일성; 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 95% 및 최대 98% 서열 동일성을 갖는, 내성을 파괴하고 면역 반응을 생성하는 재조합 암 항원이 생성된다. 일부 경우에 재조합 암 항원은 상응하는 천연 암 항원에 대해 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아미노산 서열 동일성이다. 상기 언급된 접근법은 최종 재조합 암 항원이 상기 논의된 바와 같은 천연 암 항원 아미노산 서열에 대해 퍼센트 유사성을 갖도록 조합될 수 있다.

[0026] LEMD1 항원은 상이한 또는 종 내의 상이한 이소형으로부터 LEMD1의 서열로부터 유래된 공통 LEMD1 항원일 수 있고, 따라서, 공통 LEMD1 항원은 비-천연이다. 재조합 LEMD1은 항원-특이적 T 세포 및/또는 높은 역가 항체 반응을 유도함으로써, 항원을 발현하는 암 또는 종양에 대해 지시되거나 또는 반응성인 면역 반응을 유도 또는 도

출할 수 있다. 일부 구현예에서, 유도 또는 도출된 면역 반응은 세포성, 체액성, 또는 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다일 수 있다. 일부 구현예에서, 유도 또는 도출된 세포성 면역 반응은 인터페론-감마(IFN-γ) 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNF-α)의 유도 또는 분비를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 유도 또는 도출된 면역 반응은 항원을 발현하는 종양 또는 암의 성장을 촉진하는 하나 이상의 면역 저해 인자, 예를 들어, 비제한적으로, MHC 제시를 하향 조절하는 인자, 항원-특이적 조절 T 세포(Treg)를 상향 조절하는 인자, PD-L1, FasL, 사이토카인 예컨대 IL-10 및 TFG-β, 종양 연관 대식세포, 종양 연관 섬유아세포, 면역 저해 세포에 의해 생산된 가용성 인자, CTLA-4, PD-1, MDSC, MCP-1, 및 면역 체크포인트 분자를 감소 또는 저해할 수 있다.

[0027] 백신은 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다의 자극을 증가시키기 위해 PD-1 및 PDL-1과 같은 체크포인트 억제제에 대한 항체와 추가로 조합될 수 있다. 항-PD-1 또는 항-PDL-1 항체를 사용하면 PD-1 또는 PDL-1이 T-세포 및/또는 B-세포 반응을 저해하는 것을 방지한다. 전반적으로, 면역계에 의해 인식될 암 항원을 설계함으로써 종양 세포에 의한 다른 형태의 면역 저해를 극복하는데 도움이 되고, 이들 백신은 T-세포 및/또는 B-세포 반응을 추가로 증가시키기 위해 저해 또는 억제 요법(예컨대 항-PD-1 및 항-PDL-1 항체 요법)과 조합하여 사용될 수 있다.

[0028] 정의

[0029] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충하는 경우에, 정의를 포함한 본 문서가 우선한다. 바람직한 방법 및 물질이 하기에 기재되어 있지만, 본원에 기재된 것들과 유사하거나 또는 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참조문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 본원에 개시된 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것은 아니다. 본원에 사용된 용어는 특정구현예만을 기재하기 위한 것이며 제한하려는 것은 아니다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포함하다", "포함한다", "갖는", "갖는다", "할 수 있다", "함유하다", 및 이들의 변이는 추가적인 작용 또는 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형 전이 어구, 용어, 또는 단어인 것으로 의도된다. 단수형은 문맥상 명백하게 달리 지시되지 않는 한 복수의 참조대상을 포함한다. 본 개시내용은 또한, 명시적으로 제시되든 아니든, 본원에 제시된 구현예 또는 요소를 "포함하고", "그로 이루어지고", "그로 본질적으로 이루어진" 다른 구현예를 고려한다.

[0031] 본원에서 수치 범위의 인용을 위해, 인용된 범위의 최소 및 최대와 동일한 정밀도를 갖는 각각의 사이값이 명시적으로 고려된다. 예를 들어, 6-9의 범위의 경우, 6 및 9 이외에 숫자 7 및 8이 고려되고, 범위 6.0-7.0의 경우, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 및 7.0이 명시적으로 고려된다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같은 "애주번트"는 본원에 기재된 DNA 플라스미드 백신에 첨가되어 DNA 플라스미드 및 본원에 기재된 암호화 핵산 서열에 의해 암호화된 항원의 면역원성을 향상시키는 임의의 분자를 의미한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"는 클래스 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE의 항체, 또는 이의 단편, 또는 유도체, 예를 들어 Fab, F(ab')2, Fd, 및 단일 쇄 항체 디아바디(diabody), 이중특이적 항체, 이작용성 항체, 및 이의 유도체를 의미한다. 항체는 포유동물의 혈청 샘플로부터 단리된 항체, 폴리클로날 항체, 친화성 정제된 항체, 또는 이들의 임의의 혼합물일 수 있으며, 이들은 원하는 에피토프 또는 이로부터 유래된 서열에 대해 충분한 결합 특이성을 나타낸다.

[0034] "항원"은 서열번호: 2를 포함한 돌연변이된 LEMD1 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 서열번호:2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 같이 본원에 제시된 길이의 이의 단편; 변이체, 즉 본원에 제시된 바와 같이, 서열번호: 2에 대해 동일성을 갖는 서열을 갖는 단백질 및 본원에 제시된 길이를 갖는 변이체의 단편, 및 이의 조합을 지칭한다. "항원"은 또한 서열번호: 4를 포함한 돌연변이된 LEMD1 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 같이 본원에 제시된 길이의 이의 단편; 변이체, 즉 본원에 제시된 바와 같이 서열번호: 4에 대해 동일성을 갖는 서열을 갖는 단백질 및 본원에 제시된 길이를 갖는 변이체의 단편, 및 이의 조합을 지칭한다. "항원"은 또한 서열번호: 6을 포함한 돌연변이된 LEMD1 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 서열번호:6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 같이 본원에 제시된 길이의 이의 단편; 변이체, 즉 본원에 제시된 바와 같이 서열번호: 6에 대해 동일성을 갖는 서열을 갖는 단백질 및 본원에 제시된 길이, 서열번호: 6을 갖는 변이체의 단편, 및 이의 조합을 지칭한다. 항원은 임의적으로 다른 단백질로부터의 것들과 같은 신호 펩티드를 포함할 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같은 "코딩 서열" 또는 "암호화 핵산"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하

는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미한다. 코딩 서열은 핵산이 투여되는 대상체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함한 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같은 "상보체" 또는 "상보적"은 핵산이 핵산 분자의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick)(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 후그스틴(Hoogsteen) 염기 쌍형성을 의미할 수 있음을 의미한다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같은 "공통" 또는 "공통 서열"은 상이한 유기체로부터 동일한 유전자에 대한 다수의 서열의 정렬 분석에 기초한 폴리펩티드 서열을 의미한다. 공통 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산 서열이 제조될 수 있다. 공통 서열을 포함하는 단백질 및/또는 이러한 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 백신은 항원에 대해 광범위한 면역을 유도하는데 사용될 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같은 "정전류"는 동일한 조직으로 전달되는 전기 펄스의 지속기간 동안, 조직, 또는 상기 조직을 정의하는 세포에 의해 받거나 또는 경험한 전류를 기재한다. 전기 펄스는 본원에 기재된 전기천공법 장치로부터 전달된다. 본원에 제공된 전기천공법 장치는 바람직하게는 순간 피드백을 갖는 피드백 요소를 갖기 때문에, 이 전류는 전기 펄스의 수명에 걸쳐 상기 조직에서 일정한 암페어로 유지된다. 피드백 요소는 펄스의 지속시간 내내 조직(또는 세포)의 저항을 측정하고 전기천공법 장치가 전기 에너지 출력을 변경시켜(예를 들어, 전압 증가) 동일한 조직에서의 전류가 전기 펄스 전체에 걸쳐(마이크로초의 수준으로), 펄스에서 펄스로 일정하게 유지되도록 할 수 있다. 일부 구현예에서, 피드백 요소는 제어기를 포함한다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같은 "전류 피드백" 또는 "피드백"은 상호교환가능하게 사용될 수 있고 제공된 전기천공법 장치의 능동 반응을 의미할 수 있으며, 이는 조직에서 전극 사이의 전류를 측정하고 이에 따라 전류를 일정한 수준으로 유지하기 위해 EP 장치에 의해 전달된 에너지 출력을 변경하는 것을 포함한다. 이 일정한 수준은 펄스 연쇄 또는 전기 처리의 개시 전에 사용자에 의해 미리 설정한다. 피드백은 전기천공법 장치의 전기천공법 구성요소, 예를 들어, 제어기에 의해 달성될 수 있는데, 그 안에 있는 전기 회로가 조직에서 전극 사이의 전류를 계속해서 모니터링하고 그 모니터링된 전류(또는 조직 내의 전류)를 미리 설정한 전류와 비교하고 계속해서 에너지-출력 조정을 수행하여 모니터링된 전류를 미리 설정한 수준에서 유지할 수 있기 때문이다. 피드백 루프는 아날로그 폐쇄-루프 피드백이므로 순간적일 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같은 "분산화된 전류"는 본원에 기재된 전기천공법 장치의 다양한 바늘 전극 어레이로부터 전달된 전기 전류의 패턴을 의미할 수 있으며, 여기서 패턴은 전기천공되는 조직의 임의의 영역에서 전기천공법 관련 열 스트레스의 발생을 최소화하거나, 또는 바람직하게는 제거한다.

[0041] 본원에서 상호교환가능하게 사용된 바와 같은 "전기천공법", "전기-투과화," 또는 "동전기 향상"("EP")은 생체막에서 미세한 경로(기공)를 유도하기 위한 막횡단 전계 펄스의 사용을 의미하며; 이들의 존재는 플라스미드, 올리고뉴클레오티드, siRNA, 약물, 이온, 및 물과 같은 생체분자가 세포막의 한쪽에서 다른 쪽으로 통과할 수 있게 한다.

[0042] 핵산 서열과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 "단편"은 핵산 서열 또는 이의 일부를 의미하며, 본원에 개시된 항원과 교차 반응하는 포유동물에서 면역 반응을 도출할 수 있는 폴리펩티드를 암호화한다. 단편은 하기 제시된 단백질 단편을 암호화하는 다양한 뉴클레오티드 서열 중 적어도 하나로부터 선택된 DNA 단편일 수 있다. 단편은 첨가된 이종 신호 펩티드를 제외하고, 하기 제시된 핵산 서열 중 하나 이상의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%를 포함할 수 있다. 단편은 하기 제시된 핵산 서열 중 하나 이상의 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%를 포함할 수 있고 추가적으로 퍼센트 동일성을 계산할 때 포함되지 않는 이종 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 임의적으로 포함한다. 단편은 면역글로불린 신호 펩티드와 같은 신호 펩티드, 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 펩티드에 대한 코딩 서열을 추가로 포함할 수 있다. N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩티드를 암호화하는 코딩 서열은 코딩 서열의 단편에 연결될 수 있다.

[0043] 일부 구현예에서, 단편은 하기 제시된 핵산 서열 중 적어도 하나의 적어도 20개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 30개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 40개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 50개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 60개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 70개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 80개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 90개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 100개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 150개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 200개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 250개 뉴클레오티

드 또는 그 이상, 적어도 300개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 350개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 400개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 450개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 500개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 550개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 600개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 650개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 700개 뉴클레오티드 또는 그 이상, 적어도 750개 뉴클레오티드 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0044] 폴리펩티드 서열과 관련하여 "단편" 또는 "면역원성 단편"은 본원에 개시된 항원과 교차 반응하는 포유동물에서 면역 반응을 도출할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 단편은 하기 다양한 아미노산 서열 중 적어도 하나로부터 선택된 폴리펩티드 단편일 수 있다. 공통 단백질의 단편은 첨가된 임의의 이종 신호 펩티드를 제외하고, 공통 단백질의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%를 포함할 수 있다. 단편은 하기 제시된 아미노 서열 중 하나 이상의 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%를 포함할 수 있고 추가적으로 퍼센트 동일성을 계산할 때 포함되지 않는 이종 신포 펩티드를 임의적으로 포함한다. 단편은 면역글로불린 신호 펩티드와 같은 신호 펩티드, 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 일부 구현예에서, 공통 단백질의 단편은 본원에 개시된 단백질 서열 중 적어도 20개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 30개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 40개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 50개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 60개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 70개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 80개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 90개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 100개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 110개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 120개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 130개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 140개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 150개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 160개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 170개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 180개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 190개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 200개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 210개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 220개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 230개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 240개 아미노산 또는 그 이상, 적어도 250개 아미노산 또는 그 이상, 또는 적어도 260개 아미노산 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 작제물"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 코딩 서열은 핵산 분자가 투여되는 대상체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현가능한 형태"는 대상체의 세포에 존재할 때, 코딩 서열이 발현되도록 단백질을 암호화하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 필요한 조절 요소를 함유하는 유전자 작제물을 지칭한다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상동성"은 상보성 정도를 지칭한다. 부분적 상동성 또는 완전한 상동성(즉, 동일성)이 있을 수 있다. 완전히 상보적인 서열이 표적 핵산으로 혼성화하는 것을 적어도 부분적으로 억제하는 부분 상보적 서열은 기능 용어 "실질적으로 *상동*"을 사용하여 지칭된다. cDNA 또는 게놈 클론과 같은 이중-가닥 핵산 서열과 관련하여 사용될 때, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 *상동*"은 낮은 엄격도의 조건 하에 이중-가닥 핵산 서열의 가닥에 혼성화할 수 있는 프로브를 지칭한다. 단일-가닥 핵산 서열과 관련하여 사용될 때, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 *상동*"은 낮은 엄격도의 조건 하에 단일-가닥 핵산 주형 서열에 혼성화할 수 있는(즉, 이의 상보체인) 프로브를 지칭한다.

[0048] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 맥락에서 본원에 사용된 바와 같은 "동일한" 또는 "동일성"은 서열이 명시된 영역에 걸쳐 동일하게 있는 명시된 백분율의 잔기를 가짐을 의미한다. 백분율은 2개의 서열을 최적으로 정렬하고, 명시된 영역에 걸쳐 2개의 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 명시된 영역의 총 위치의 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 2개의 서열의 길이가 상이하거나 또는 정렬이 하나 이상의 엇갈린 단부를 생산하고 명시된 비교 영역이 단일 서열만을 포함하는 경우에, 단일 서열의 잔기는 분모에 포함되지만 계산 분자에는 포함되지 않는다. DNA 및 RNA를 비교할 때, 티민(T) 및 우라실(U)은 등가물로 간주될 수 있다. 동일성은 수동으로 또는 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 서열 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같은 "임피던스"는 피드백 메커니즘을 논의할 때 사용될 수 있고 옴(Ohm)의 법칙에 따라 전류 값으로 변환될 수 있으며, 따라서 미리 설정한 전류와의 비교를 가능하게 한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같은 "면역 반응"은 항원의 도입에 반응하여, 숙주의 면역계, 예를 들어, 포유동물의 면역계의 활성화를 의미한다. 면역 반응은 세포성 또는 체액성 반응, 또는 둘 다의 형태일 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 함께 공유적으로 연결된 적어도 2개의 뉴클레오티드를 의미한다. 단일 가닥의 묘사는 또한 상보적 가닥의 서열을 정의한다. 따라서, 핵산은 또한 도시된 단일 가닥의 상보적 가닥을 포함한다. 핵산의 많은 변이체는 주어진 핵산과 동일한 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 상보체를 포함한다. 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건 하에 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화하는 프로브를 포함한다.

[0052] 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 이중 가닥 및 단일 가닥 서열 둘 다의 부분을 함유할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA 둘 다, RNA, 또는 하이브리드일 수 있으며, 이 경우 핵산은 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오티드의 조합, 및 우라실, 아데닌, 티민, 사이토신, 구아닌, 이노신, 크산틴 하이포크산틴, 이소사이토신 및 이소구아닌을 포함한 염기의 조합을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 "작동가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 유전자와 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있음을 의미한다. 프로모터는 제어 하에 유전자의 5'(상류) 또는 3'(하류)에 위치될 수 있다. 프로모터와 유전자 사이의 거리는 프로모터가 유래되는 유전자에서 해당 프로모터와 해당 프로모터가 제어하는 유전자 사이의 거리와 대략 동일할 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 이 거리의 변동은 프로모터 기능의 상실 없이 수용될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 "펩티드", "단백질", 또는 "폴리펩티드"는 아미노산의 연결된 순서를 의미할 수 있고 자연, 합성, 또는 자연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은 "프로모터"는 세포에서 핵산의 발현을 부여, 활성화, 또는 향상시킬 수 있는 합성 또는 자연적으로 유래된 분자를 의미한다. 프로모터는 발현을 추가로 향상시키고/시키거나 세포에서 핵산의 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경시키는 하나 이상의 특이적 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 원위 인핸서 또는 억제 요소를 포함할 수 있으며, 이는 전사 출발 부위로부터 수천개 정도의 염기 쌍에 위치할 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 발생하는 세포, 조직, 또는 기관에 관하여, 또는 발현이 발생하는 발단 단계에 관하여, 또는 생리적 스트레스, 병원체, 금속 이온, 또는 유도제와 같은 외부 자극에 반응하여 유전자 구성요소의 발현을 구성적으로 또는 차등적으로 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 작동자-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 또는 SV40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함한다.

[0056] "신호 펩티드" 및 "리더 서열(leader sequence)"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며 본원에 제시된 단백질의 아미노 말단에 연결될 수 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 신호 펩티드/리더 서열은 전형적으로 단백질의 국부화를 지시한다. 본원에 사용된 신호 펩티드/리더 서열은 바람직하게는 단백질이 생산되는 세포로부터 단백질의 분비를 촉진한다. 신호 펩티드/리더 서열은 종종 세포로부터 분비시, 종종 성숙 단백질로 지칭되는, 나머지 단백질로부터 절단된다. 신호 펩티드/리더 서열은 단백질의 아미노 말단(즉, N 말단)에 연결된다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은 "엄격한 혼성화 조건"은 제1 핵산 서열(예를 들어, 프로브)이 예컨대 핵산의 복합 혼합물에서 제2 핵산 서열(예를 들어, 표적)에 혼성화하는 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고 상이한 상황에서 다를 것이다. 엄격한 조건은 정의된 이온성 강도 pH에서 특이적 서열에 대한 열 융점(Tm)보다 약 5-10℃ 낮도록 선택될 수 있다. Tm은 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형시 표적 서열과 혼성화하는 온도(정의된 이온성 강도, pH, 및 핵 농도하)일 수 있다(표적 서열이 과도하게 존재함에 따라, Tm에서, 프로브의 50%가 평형시 점유된다). 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 1.0 M 나트륨 이온 미만, 예컨대 약 0.01-1.0 M 나트륨 이온 농도(또는 다른 염)이고 온도가 짧은 프로브(예를 들어, 약 10-50개 뉴클레오티드)에 대해 적어도 약 30℃ 및 긴 프로브(예를 들어, 약 50개 뉴클레오티드 초과)에 대해 적어도 약 60℃인 것들일 수 있다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 탈안정화제를 첨가하여 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화를 위해, 양의 신호는 배경 혼성화의 적어도 2 내지 10배일 수 있다. 예시적인 엄격한 혼성화 조건은 다음을 포함한다: 50% 포름아미드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42℃에서 인큐베이션, 또는, 5x SSC, 1% SDS, 65℃에서 인큐베이션, 65℃에서 0.2x SSC, 및 0.1% SDS에서 세척.

[0058] 본원에 사용된 바와 같은 "대상체"는 본원에 기재된 백신으로 면역화 되기를 원하거나 또는 필요로 하는 포유동

물을 의미할 수 있다. 포유동물은 인간, 침팬지, 개, 고양이, 말, 소, 마우스, 또는 래트일 수 있다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 상보적"은 제1 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540개, 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산의 영역에 걸쳐 제2 서열의 상보체와 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 또는 2개의 서열이 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화하는 것을 의미한다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산의 영역에 걸쳐 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 또는 핵산에 관하여, 제1 서열이 제2 서열의 상보체에 실질적으로 상보적인 경우를 의미한다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같은 "치료하다", "치료", 또는 "치료하는"은 질환을 예방, 저해, 억제, 또는 완전히 제거하는 수단을 통해 질환으로부터 동물을 보호하는 것을 의미할 수 있다. 질환을 예방하는 것은 질환의 발병 전에 본 발명의 백신을 동물에 투여하는 것을 수반한다. 질환을 저해하는 것은 질환의 도입 후이지만 질환의 임상 출현 전에 본 발명의 백신을 동물에 투여하는 것을 수반한다. 질환을 억제하는 것은 질환의 임상 출현 후에 본 발명의 백신을 동물에 투여하는 것을 수반한다.

[0062] 핵산과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 "변이체"는 (i) 참조된 뉴클레오티드 서열의 일부 또는 단편; (ii) 참조된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부의 상보체; (iii) 참조된 핵산 또는 이의 상보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 엄격한 조건 하에 참조된 핵산, 이의 상보체, 또는 그와 실질적으로 동일한 서열을 혼성화하는 핵산을 의미한다.

[0063] 펩티드 또는 폴리펩티드와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 아미노산 서열을 갖는 참조된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 아미노산을 유사한 특성(예를 들어, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로 대체하는 것은 전형적으로 사소한 변화를 수반하는 것으로 당업계에서 인식된다. 이들 사소한 변화는, 당업계에서 이해되는 바와 같이, 아미노산의 소수성 지표(hydropathic index)를 고려함으로써, 부분적으로, 확인될 수 있다. Kyte et al, J. Mol. Biol. 157: 105-132(1982). 아미노산의 소수성 지표는 소수성 및 전하의 고려에 기초한다. 유사한 소수성 지표의 아미노산이 치환되고 여전히 단백질 기능을 유지할 수 있음이 당업계에 알려져 있다. 일 측면에서, ±2의 소수성 지표를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 초래하는 치환을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 펩티드의 맥락에서 아미노산 친수성의 고려는 항원성 및 면역원성과 널리 상관관계가 있는 것으로 보고된 바 있는 유용한 척도인, 해당 펩티드의 가장 큰 국부 평균 친수성의 계산을 허용한다. 본원에 참조로 완전히 포함된, 미국 특허 번호 제4,554,101호. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같이, 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 유지하는 펩티드를 초래할 수 있다. 치환은 서로 ±2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지표 및 친수성 값 둘 다는 해당 아미노산의 특정한 측쇄에 의해 영향을 받는다. 해당 관찰과 일치하게, 생물학적 기능과 호환되는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기, 및 다른 특성에 의해 나타낸 바와 같이, 아미노산의 상대적 유사성, 특히 그러한 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다.

[0064] 변이체는 전체 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 핵산 서열일 수 있다. 핵산 서열은 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다. 변이체는 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같은 "벡터"는 복제 기점을 함유하는 핵산 서열을 의미한다. 벡터는 바이러스 벡터, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체, 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자기-복제 염색체외 벡터일 수 있고, 바람직하게는, DNA 플라스미드이다. 벡터는 하나 이상의 이종 핵산 서열을 함유하거나 포함할 수 있다.

[0066] 백신

[0067] 본원에는 LEMD1 항원 또는 본원에 기재된 바와 같은 LEMD1 항원을 암호화하는 핵산을 포함하는 백신이 제공된다. 일부 구현예에서, 백신은 본원에 기재된 바와 같은 LEMD1 항원을 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 아미노산을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 핵산 분자는 항원을 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 (a) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600; (b) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258; (c) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819; (d) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819를 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 단편; (h) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 단편; (i) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 단편; (j) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 핵산 분자는 (a) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198; (b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84; (c) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271; (d) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열; (h) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열; (i) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열; (j) 서열번호: 2의 아미노산 서열 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 6의 아미노산 서열 19 내지 198 및 206 및 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 펩티드를 암호화한다.

[0068] 본 개시내용의 일부 측면에서, 백신은 항원을 포함하며, 여기서 항원은 (a) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198; (b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84; (c) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271; (d) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열; (h) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열; (i) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열; (j) 서열번호: 2의 아미노산 서열 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 6의 아미노산 서열 19 내지 198 및 206 및 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0069] 본 개시내용의 일부 측면에서 백신은 핵산 분자를 포함하며, 여기서 핵산 분자는 서열번호: 1, 3, 또는 5에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 백신은 핵산 분자를 포함하며, 여기서 핵산 분자는 서열번호: 2, 4, 또는 6에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 각각 적어도 약 95.6%, 95.5%, 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 암호화한다.

[0070] 본 발명의 일부 구현예에서 백신에 존재하는 핵산 분자는 발현 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 백신은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하고, 일부 구현예에서 백신은 애주번트를 추가로 포함하며, 이는 구현예의 일부 측면에서 IL-12, IL-15, IL-28, 또는 RANTES일 수 있다.

[0071] 일부 구현예에서, 백신은 펩티드를 포함하며, 여기서 펩티드는 서열번호: 2, 4, 또는 6에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 각각 적어도 약 95.6%, 95.5%, 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 다른

구현예에서, 백신은 펩티드를 포함하며, 여기서 펩티드는 서열번호: 2, 4, 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0072] 백신은 대상체에서 항원에 대해 면역 반응을 생성할 수 있다. 면역 반응은 치료적 또는 예방적 면역 반응일 수 있다.

[0073] 백신은 암, 예를 들어, LEMD1을 발현하는 암 또는 종양에 대해 보호하는데 사용될 수 있다. 백신은 이를 필요로 하는 대상체에서 LEMD1을 발현하는 종양을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 백신은 LEMD1 및 LEMD1을 발현하는 종양에 대해 세포성 및/또는 항체 반응을 유도할 수 있다.

[0074] 본원에 기재된 바와 같은 암 백신의 개발은 면역계에 의해 인식되지 않고 자기-항원인 암 항원, 예를 들어, LEMD1을 확인하는 것을 포함한다. 확인된 암 항원은 면역계에 의해 인식되도록 하기 위해 자기-항원에서 외부 항원으로 변하게 된다. 자기 항원에서 외부 항원으로 재조합 암 항원의 핵산 및 아미노산 서열의 재설계는 면역계에 의해 항원의 내성을 파괴한다. 내성을 파괴하기 위해, 여러 재설계 조치가 하기 기재된 바와 같이 암 항원에 적용될 수 있다.

[0075] 백신의 재조합 암 항원은 자기 인식되지 않아서, 내성을 파괴한다. 내성의 파괴는 항원-특이적 T 세포 및/또는 높은 역가 항체 반응을 유도해서, 항원을 발현하는 암 또는 종양에 대해 지시되거나 또는 반응성인 면역 반응을 유도 또는 도출할 수 있다. 일부 구현예에서, 유도 또는 도출된 면역 반응은 세포성, 체액성, 또는 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다일 수 있다. 일부 구현예에서, 유도 또는 도출된 세포성 면역 반응은 인터페론-감마(IFN-γ) 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNF-α)의 유도 또는 분비를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 유도 또는 도출된 면역 반응은 항원을 발현하는 종양 또는 암의 성장을 촉진하는 하나 이상의 면역 저해 인자, 예를 들어, 비제한적으로, MHC 제시를 하향 조절하는 인자, 항원-특이적 조절 T 세포(Treg)를 상향 조절하는 인자, PD-L1, FasL, 사이토카인 예컨대 IL-10 및 TFG-β, 종양 연관 대식세포, 종양 연관 섬유아세포, 면역 저해 세포에 의해 생산된 가용성 인자, CTLA-4, PD-1, MDSC, MCP-1, 및 면역 체크포인트 분자를 감소 또는 억제할 수 있다.

[0076] 백신은 무종양 생존을 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 및 45%까지 증가시킬 수 있다. 백신은 면역화 후 종양 질량을 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60%까지 감소시킬 수 있다. 백신은 골수 유래 저해 세포에 의해 분비된 사이토카인인 단핵구 화학유인물질 단백질 1(MCP-1)의 증가를 방지 및 차단할 수 있다. 백신은 종양 생존을 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60%까지 증가시킬 수 있다.

[0077] 백신은 백신이 투여된 대상체에서의 세포성 면역 반응을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 약 50-배 내지 약 6000-배, 약 50-배 내지 약 5500-배, 약 50-배 내지 약 5000-배, 약 50-배 내지 약 4500-배, 약 100-배 내지 약 6000-배, 약 150-배 내지 약 6000-배, 약 200-배 내지 약 6000-배, 약 250-배 내지 약 6000-배, 또는 약 300-배 내지 약 6000-배까지 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서 백신은 백신이 투여된 대상체에서의 세포성 면역 반응을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 약 50-배, 100-배, 150-배, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배, 400-배, 450-배, 500-배, 550-배, 600-배, 650-배, 700-배, 750-배, 800-배, 850-배, 900-배, 950-배, 1000-배, 1100-배, 1200-배, 1300-배, 1400-배, 1500-배, 1600-배, 1700-배, 1800-배, 1900-배, 2000-배, 2100-배, 2200-배, 2300-배, 2400-배, 2500-배, 2600-배, 2700-배, 2800-배, 2900-배, 3000-배, 3100-배, 3200-배, 3300-배, 3400-배, 3500-배, 3600-배, 3700-배, 3800-배, 3900-배, 4000-배, 4100-배, 4200-배, 4300-배, 4400-배, 4500-배, 4600-배, 4700-배, 4800-배, 4900-배, 5000-배, 5100-배, 5200-배, 5300-배, 5400-배, 5500-배, 5600-배, 5700-배, 5800-배, 5900-배, 또는 6000-배까지 증가시킬 수 있다.

[0078] 백신은 백신이 투여된 대상체에서의 인터페론 감마(IFN-γ) 수준을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 IFN-γ 수준과 비교하여 약 50-배 내지 약 6000-배, 약 50-배 내지 약 5500-배, 약 50-배 내지 약 5000-배, 약 50-배 내지 약 4500-배, 약 100-배 내지 약 6000-배, 약 150-배 내지 약 6000-배, 약 200-배 내지 약 6000-배, 약 250-배 내지 약 6000-배, 또는 약 300-배 내지 약 6000-배까지 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서 백신은 백신이 투여된 대상체에서의 IFN-γ 수준을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 IFN-γ 수준과 비교하여 약 50-배, 100-배, 150-배, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배, 400-배, 450-배, 500-배, 550-배, 600-배, 650-배, 700-배, 750-배, 800-배, 850-배, 900-배, 950-배, 1000-배, 1100-배, 1200-배, 1300-배, 1400-배, 1500-배,

1600-배, 1700-배, 1800-배, 1900-배, 2000-배, 2100-배, 2200-배, 2300-배, 2400-배, 2500-배, 2600-배, 2700-배, 2800-배, 2900-배, 3000-배, 3100-배, 3200-배, 3300-배, 3400-배, 3500-배, 3600-배, 3700-배, 3800-배, 3900-배, 4000-배, 4100-배, 4200-배, 4300-배, 4400-배, 4500-배, 4600-배, 4700-배, 4800-배, 4900-배, 5000-배, 5100-배, 5200-배, 5300-배, 5400-배, 5500-배, 5600-배, 5700-배, 5800-배, 5900-배, 또는 6000-배까지 증가시킬 수 있다.

[0079] 백신은 DNA 백신일 수 있다. DNA 백신은 미국 특허 번호 제5,593,972호, 제5,739,118호, 제5,817,637호, 제5,830,876호, 제5,962,428호, 제5,981,505호, 제5,580,859호, 제5,703,055호, 및 제5,676,594호에 개시되어 있으며, 이들은 본원에 참조로 완전히 포함된다. DNA 백신은 염색체 내로의 통합을 억제하는 요소 또는 시악을 추가로 포함할 수 있다.

[0080] 백신은 하나 이상의 암 항원의 RNA일 수 있다. RNA 백신은 세포 내로 도입될 수 있다.

[0081] 백신은 약화된 생 백신, 항원을 전달하기 위해 재조합 벡터를 사용하는 백신, 서브유닛 백신, 및 당단백질 백신, 예를 들어, 비제한적으로, 미국 특허 번호 제4,510,245호; 제4,797,368호; 제4,722,848호; 제4,790,987호; 제4,920,209호; 제5,017,487호; 제5,077,044호; 제5,110,587호; 제5,112,749호; 제5,174,993호; 제5,223,424호; 제5,225,336호; 제5,240,703호; 제5,242,829호; 제5,294,441호; 제5,294,548호; 제5,310,668호; 제5,387,744호; 제5,389,368호; 제5,424,065호; 제5,451,499호; 제5,453,3 64호; 제5,462,734호; 제5,470,734호; 제5,474,935호; 제5,482,713호; 제5,591,439호; 제5,643,579호; 제5,650,309호; 제5,698,202호; 제5,955,088호; 제6,034,298호; 제6,042,836호; 제6,156,319호 및 제6,589,529호에 기재된 백신일 수 있으며, 이들은 각각 본원에 참조로 포함된다.

[0082] 일부 구현예에서, 백신은 분자 애주번트를 추가로 포함할 수 있으며, 일부 경우에 분자 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33, 및/또는 RANTES일 수 있고, 일부 경우에 분자 애주번트는 항-세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4), 항-프로그램화된 사멸 수용체-1(PD-1) 및 항-림프구-활성화 유전자(LAG-3)를 포함한 체크포인트 억제제이다. 일부 구현예에서, 핵산 백신은 분자 애주번트에 대한 코딩 서열을 추가로 포함할 수 있으며, 일부 경우에 분자 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33, 및/또는 RANTES일 수 있고, 일부 경우에 분자 애주번트는 항-세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4), 항-프로그램화된 사멸 수용체-1(PD-1) 및 항-림프구-활성화 유전자(LAG-3)를 포함한 체크포인트 억제제이다. IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33 및/또는 RANTES에 대한 코딩 서열은 하나 이상의 항원에 대한 코딩 서열을 포함하는 하나 이상의 핵산 분자 상에 포함될 수 있다. IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33 및/또는 RANTES에 대한 코딩 서열은 별개의 플라스미드와 같은 별개의 핵산 분자 상에 포함될 수 있다.

[0083] 본 발명의 백신은 백신 자체가 질병 또는 사망을 유발하지 않도록 안전하고; 질병에 대해 보호하고; 중화 항체를 유도하고; 보호 T 세포 반응을 유도하고; 투여 용이성, 적은 부작용, 생물학적 안정성, 및 용량 당 낮은 비용을 제공하는 것과 같은 효과적인 백신에 필요한 특징을 가질 수 있다. 백신은 하기 논의된 바와 같은 암 항원을 함유함으로써 이들 특징 중 일부 또는 전부를 달성할 수 있다.

[0084] 백신은 하나 이상의 면역 체크포인트 분자의 하나 이상의 억제제(즉, 면역 체크포인트 억제제)를 추가로 포함할 수 있다. 면역 체크포인트 분자는 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다. 면역 체크포인트 억제제는 MHC 클래스 제시, T 세포 제시 및/또는 분화, B 세포 제시 및/또는 분화, 면역 세포 증식 및/또는 분화를 위한 임의의 사이토카인, 케모카인 또는 신호전달과 같은 면역계에서의 임의의 구성요소의 저해를 방지하는 임의의 핵산 또는 단백질이다. 또한 하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 백신은 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다의 자극을 증가시키기 위해 PD-1 및 PDL-1과 같은 체크포인트 억제제에 대한 항체와 추가로 조합될 수 있다. 항-PD-1 또는 항-PDL-1 항체를 사용하면 PD-1 또는 PDL-1이 T-세포 및/또는 B-세포 반응을 저해하는 것을 방지한다.

[0085] 항원

[0086] 상기 기재된 바와 같이, 백신은 LEMD1 항원 또는 LEMD1 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 항원은 LEMD1, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0087] 백신은 LEMD1-발현 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다. 백신은 또한 LEMD1을 발현하는 암 또는 종양이 있는 대상체를 치료하거나 또는 대상체에서 이러한 종양의 발달을 예방하는데 사용될 수 있다. LEMD1 항원은 천연, "정상" LEMD1 유전자와 상이할 수 있고, 따라서 LEMD1 항원-발현 종양에 대해 요법 또는 예방법을 제공한다. 따라서, 천연 LEMD1 유전자와 상이한 LEMD1 항원 서열(즉, 돌연변이된 LEMD1 유전자 또는 서열)이 본원에 제공된다. 예를 들어, 본 개시내용의 일부 측면은 서열번호: 1, 3, 또는 5에 제시된 핵산 서열을

포함하는 핵산 분자를 포함하는 백신을 제공하고, 일부 측면은 서열번호: 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 백신을 제공한다. 핵산 분자를 포함하는 백신의 일부 측면에서, 핵산 분자는 (a) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600; (b) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258; (c) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819; (d) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258을 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819를 포함하는 핵산 분자의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 단편; (h) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 단편; (i) 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 단편; (j) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258과 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819와 적어도 95% 동일한 핵산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다.

[0088] 상기 기재된 이종 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다. 상기 기재된 이종 서열로 이루어진 단리된 핵산 분자가 제공된다. 상기 기재된 이종 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자는 벡터 예컨대 플라스미드, 바이러스 벡터 및 하기 기재된 바와 같은 다른 형태의 핵산 분자 내로 혼입될 수 있다. 본원에는 LEMD1 항원을 암호화하는 핵산 서열이 제공된다. LEMD1 항원을 암호화하는 코딩 서열은 상기 기재된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0089] 상기 기재된 이종 아미노산 서열을 포함하는 단백질 분자가 제공된다. 상기 기재된 이종 아미노산 서열로 이루어진 단백질 분자가 제공된다. 본원에는 상기 기재된 서열을 갖는 단백질 및 폴리펩티드가 제공된다. 본 개시 내용의 일부 구현예는 (a) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198; (b) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84; (c) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271; (d) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (e) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (f) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (g) 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열; (h) 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열; (i) 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열; (j) 서열번호: 2의 아미노산 서열 19 내지 198과 95.6% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; (k) 서열번호: 4의 아미노산 서열 19 내지 84와 95.5% 초과 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편; 및 (l) 서열번호: 6의 아미노산 서열 19 내지 198 및 206 및 271과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 90%를 포함하는 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 제공한다.

[0090] 단백질 및 폴리펩티드는 LEMD1 항원 및 LEMD1 면역원으로서 지칭될 수 있다. LEMD1 항원은 LEMD1 항원을 발현하는 암 세포 및 종양에 대해 면역 반응을 도출할 수 있다.

[0091] 본 발명의 일 측면에서, 공통 항원은 다음 중 하나 이상을 갖는 것을 포함하여, 개선된 전사 및 번역을 제공하는 것이 바람직하다: 전사를 증가시키는 낮은 GC 함량 리더 서열; mRNA 안정성 및 코돈 최적화 및 가능한 시스-작용 서열 모티프(즉, 내부 TATA-박스) 정도로 제거하는 것.

[0092] 본 발명의 일부 측면에서, 다음 중 하나 이상을 갖는 것을 포함하여, 다수의 균주에 걸쳐 광범위한 면역 반응을 생성하는 공통 항원을 생성하는 것이 바람직하다: 모든 이용가능한 전장 서열 포함; 각각의 위치에서 가장 흔히 발생하는 아미노산을 활용하는 컴퓨터 생성된 서열; 및 균주 사이의 교차-반응성 증가.

[0093] LEMD1 항원은 2개 이상의 종으로부터 유래된 공통 항원(또는 면역원) 서열일 수 있다. LEMD1 항원은 개선된 발현을 위한 공통 서열 및/또는 변형(들)을 포함할 수 있다. 변형은 코돈 최적화, RNA 최적화, 증가된 번역 개시를 위한 코작(kozak) 서열(예를 들어, GCC ACC)의 첨가 및/또는 LEMD1 항원의 면역원성을 증가시키는 면역글로불린 리더 서열의 첨가를 포함할 수 있다. LEMD1 항원은 신호 펩티드 예컨대 면역글로불린 신호 펩티드, 예를 들어, 비제한적으로, 면역글로불린 E(IgE) 또는 면역글로불린 G(IgG) 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 헤마글루티닌(HA) 태그를 포함할 수 있다. LEMD1 공통 항원은 상응하는 코돈 최적화된 LEMD1 항원보다 더 강하고 더 광범위한 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 도출하도록 설계될 수 있다.

[0094] LEMD1 공통 항원은 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있어서, 상응하는 코돈 최적화된 LEMD1 항원보다 더 강하

고 더 광범위한 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 도출한다.

[0095] LEMD1 공통 항원은 핵산 서열번호: 1의 뉴클레오티드 55 내지 600일 수 있으며, 이는 서열번호: 2의 아미노산 잔기 19 내지 198을 암호화한다. 일부 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 서열번호: 1에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열일 수 있다. 다른 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 서열번호: 2에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열일 수 있다.

[0096] LEMD1 공통 항원은 핵산 서열번호: 3의 뉴클레오티드 55 내지 258일 수 있으며, 이는 서열번호: 4의 아미노산 잔기 19 내지 84를 암호화한다. 일부 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 서열번호: 3에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열일 수 있다. 다른 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 서열번호: 4에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열일 수 있다.

[0097] LEMD1 공통 항원은 핵산 서열번호: 5의 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819일 수 있으며, 이는 서열번호: 6의 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206 내지 271을 암호화한다. 일부 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 서열번호: 5에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열일 수 있다. 다른 구현예에서, LEMD1 공통 항원은 서열번호: 6에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열일 수 있다.

[0098] LEMD1 항원은 개선된 발현을 위한 변형을 포함할 수 있다. 변형은 코돈 최적화, RNA 최적화, 증가된 번역 개시를 위한 코작 서열(예를 들어, GCC ACC)의 첨가 및/또는 항원의 면역원성을 증가시키는 면역글로불린 리더 서열의 첨가를 포함할 수 있다. LEMD1 항원은 신호 펩티드 예컨대 면역글로불린 신호 펩티드, 예를 들어, 비제한적으로, 면역글로불린 E(IgE) 또는 면역글로불린 G(IgG) 신호 펩티드를 포함할 수 있다.

[0099] LEMD1 항원은 에피토프 최적화를 위한 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 절단 부위가 다수의 LEMD1 항원 서열 사이에 삽입될 수 있다. 절단 부위는 푸린 절단 부위일 수 있다.

[0100] 면역 체크포인트 억제제와 조합한 백신

[0101] 백신은 하나 이상의 면역 체크포인트 분자의 하나 이상의 억제제(즉, 면역 체크포인트 억제제)를 추가로 포함할 수 있다. 면역 체크포인트 분자는 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다. 면역 체크포인트 억제제는 MHC 클래스 제시, T 세포 제시 및/또는 분화, B 세포 제시 및/또는 분화, 임의의 사이토카인, 케모카인 또는 면역 세포 증식 및/또는 분화에 대한 신호 전달과 같은 면역계의 임의의 성분의 억제를 방지하는 임의의 핵산 또는 단백질이다.

[0102] 이러한 억제제는 핵산 서열, 아미노산 서열, 소분자, 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산 서열은 DNA, RNA, cDNA, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산은 또한 펩티드 결합에 의해 면역 체크포인트 억제제에 연결된 링커 또는 태그 서열을 암호화하는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 소분자는 효소 기질, 단백질 또는 핵산에 의해 결합된 리간드(또는 이의 유사체), 또는 생물학적 과정의 조절기로서 작용할 수 있는 저분자량, 예를 들어, 800 달톤 미만의, 유기 또는 무기 화합물일 수 있다. 아미노산 서열은 단백질, 펩티드, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0103] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항체, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열일 수 있다. 다른 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항체, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0104] 1. 면역 체크포인트 분자

[0105] 면역 체크포인트 분자는 핵산 서열, 아미노산 서열, 소분자, 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산 서열은 DNA, RNA, cDNA, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산은 또한 펩티드 결합에 의해 면역 체크포

인트 억제제에 연결된 링커 또는 태그 서열을 암호화하는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 소분자는 효소 기질, 단백질 또는 핵산에 의해 결합된 리간드(또는 이의 유사체), 또는 생물학적 과정의 조절기로서 작용할 수 있는 저분자량, 예를 들어, 800 달톤 미만의, 유기 또는 무기 화합물일 수 있다. 아미노산 서열은 단백질, 펩티드, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0106] a. PD-1 및 PD-L1

[0107] 면역 체크포인트 분자는 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램화된 세포 사멸 리간드 1(PD-L1), 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합일 수 있다. PD-1은 *PDCD1* 유전자에 의해 암호화된 세포 표면 단백질이다. PD-1은 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이며 T 세포 및 전구-B 세포 상에서 발현되고, 따라서 이들 세포의 운명 및/또는 분화에 기여한다. 특히, PD-1은 T 세포 조절기의 CD28/CTLA-4 패밀리의 유형 1 막 단백질이며 T 세포 수용체(TCR) 신호를 음으로 조절하여, 면역 반응을 음으로 조절한다. PD-1은 CD8+ T 세포 반응을 음으로 조절할 수 있고, 따라서 CD8-매개 세포독성을 억제하고 종양 성장을 향상시킨다.

[0108] PD-1은 B7 패밀리의 구성원인 2개의 리간드, PD-L1 및 PD-L2를 갖는다. PD-L1은 LPS 및 GM-CSF 처리에 반응하여 대식세포 및 수지상 세포(DC) 상에서 상향조절되고 TCR 및 B 세포 수용체 신호전달시 T 세포 및 B 세포 상에서 상향조절된다. PD-L1은 골수종, 비만세포, 및 흑색종을 포함한 많은 종양 세포주에 의해 발현된다.

[0109] 2. 항-면역 체크포인트 분자 항체

[0110] 상기 기재된 바와 같이, 면역 체크포인트 억제제는 항체일 수 있다. 항체는 항원(즉, 상기 기재된 면역 체크포인트 분자)에 결합하거나 또는 그와 반응할 수 있다. 따라서, 항체는 항-면역 체크포인트 분자 항체 또는 면역 체크포인트 분자 항체로서 간주될 수 있다. 항체는 포함된 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다

[0111] 항체는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄(VH) 영역 및/또는 적어도 하나의 불변 중쇄(CH) 영역을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 불변 중쇄 영역은 불변 중쇄 영역 1(CH1), 불변 중쇄 영역 2(CH2), 및 불변 중쇄 영역 3(CH3), 및/또는 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[0112] 일부 구현예에서, 중쇄 폴리펩티드는 VH 영역 및 CH1 영역을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 중쇄 폴리펩티드는 VH 영역, CH1 영역, 힌지 영역, CH2 영역, 및 CH3 영역을 포함할 수 있다.

[0113] 중쇄 폴리펩티드는 상보적 결정 영역("CDR") 세트를 포함할 수 있다. CDR 세트는 VH 영역의 3개의 초가변 영역을 함유할 수 있다. 중쇄 폴리펩티드의 N-말단으로부터 진행하여, 이들 CDR은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 나타낸다. 중쇄 폴리펩티드의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항원의 결합 또는 인식에 기여할 수 있다.

[0114] 경쇄 폴리펩티드는 가변 경쇄(VL) 영역 및/또는 불변 경쇄(CL) 영역을 포함할 수 있다. 경쇄 폴리펩티드는 상보적 결정 영역("CDR") 세트를 포함할 수 있다. CDR 세트는 VL 영역의 3개의 초가변 영역을 함유할 수 있다. 경쇄 폴리펩티드의 N-말단으로부터 진행하여, 이들 CDR은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 나타낸다. 경쇄 폴리펩티드의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항원의 결합 또는 인식에 기여할 수 있다.

[0115] 항체는 중쇄 및 경쇄 상보적 결정 영역("CDR") 세트를 포함할 수 있으며, 각각 중쇄 및 경쇄 프레임워크("FR") 세트 사이에 개재되어 CDR에 대한 지지를 제공하고 서로에 관한 CDR의 공간적 관계를 정의한다. CDR 세트는 중쇄 또는 경쇄 V 영역의 3개의 초가변 영역을 함유할 수 있다. 중쇄 또는 경쇄의 N-말단으로부터 진행하여, 이들 영역은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 나타낸다. 따라서, 항원-결합 부위는 중쇄 및 경쇄 V 영역 각각으로부터의 CDR 세트를 포함하는 6개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0116] 항체는 면역글로불린(Ig)일 수 있다. Ig는, 예를 들어, IgA, IgM, IgD, IgE, 및 IgG일 수 있다. 면역글로불린은 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 면역글로불린의 중쇄 폴리펩티드는 VH 영역, CH1 영역, 힌지 영역, CH2 영역, 및 CH3 영역을 포함할 수 있다. 면역글로불린의 경쇄 폴리펩티드는 VL 영역 및 CL 영역을 포함할 수 있다.

[0117] 추가적으로, 단백질분해 효소 파파인은 우선적으로 IgG 분자를 절단하여 여러 단편을 생성하며, 이 중 2개(F(ab) 단편)는 각각 온전한 항원-결합 부위를 포함하는 공유 이종이량체를 포함한다. 효소 펩신은 IgG 분자를 절단하여 항원-결합 부위 둘 다를 포함하는, $F(ab')_2$ 단편을 포함한 여러 단편을 제공할 수 있다. 따라서, 항체는 Fab 또는 $F(ab')_2$일 수 있다. Fab는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다. Fab의 중쇄 폴리펩티드는 VH 영역 및 CH1 영역을 포함할 수 있다. Fab의 경쇄는 VL 영역 및 CL 영역을 포함할 수 있다.

[0118] 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 단일 쇄 항체, 친화도 성숙 항체,

인간 항체, 인간화 항체, 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 인간화 항체는 비-인간 종으로부터의 하나 이상의 상보적 결정 영역(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 갖는 원하는 항원에 결합하는 비-인간 종으로부터의 항체일 수 있다.

[0119] a. PD-1 항체

[0120] 항-면역 체크포인트 분자 항체는 항-PD-1 항체(또한 본원에서 "PD-1 항체"로도 지칭됨), 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다. PD-1 항체는 니볼루맙(Nivolumab)일 수 있다. 항-PD-1 항체는 PD-1 활성을 억제하여, 종양 또는 암에 대해 면역 반응을 유도, 도출, 또는 증가시키고 종양 성장을 감소시킬 수 있다.

[0121] b. PD-L1 항체

[0122] 항-면역 체크포인트 분자 항체는 항-PD-L1 항체(또한 본원에서 "PD-L1 항체"로도 지칭됨), 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다. 항-PD-L1 항체는 PD-L1 활성을 억제하여, 종양 또는 암에 대해 면역 반응을 유도, 도출, 또는 증가시키고 종양 성장을 감소시킬 수 있다.

[0123] 벡터

[0124] 백신은 LEMD1 항원을 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함할 수 있다. 하나 이상의 벡터는 항원을 포유동물에서 면역 반응을 도출하는데 효과적인 양으로 발현할 수 있다. 벡터는 항원을 암호화하는 이종 핵산을 포함할 수 있다. 벡터는 복제 기점을 함유하는 핵산 서열을 가질 수 있다. 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체, 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 자기-복제 염색체외 벡터, 또는 숙주 게놈 내로 통합하는 벡터일 수 있다.

[0125] 하나 이상의 벡터는 발현 작제물일 수 있으며, 이는 일반적으로 특이적 유전자를 표적 세포 내로 도입하는데 사용되는 플라스미드이다. 일단 발현 벡터가 세포 내부에 있으면, 유전자에 의해 암호화된 단백질은 세포성-전사 및 번역 기구 리보솜 복합체에 의해 생산된다. 플라스미드는 인핸서 및 프로모터 영역으로 작용하고 발현 벡터 상에 전달된 유전자의 효율적인 전사를 야기하는 조절 서열을 함유하도록 빈번하게 조작된다. 본 발명의 벡터는 다량의 안정한 메신저 RNA, 및 따라서 단백질을 발현한다.

[0126] 벡터는 강한 프로모터, 강한 종결 코돈, 프로모터와 클로닝된 유전자 사이의 거리 조정, 및 전사 종결 서열 및 PTIS(이동식 번역 개시 서열)의 삽입과 같은 발현 신호를 가질 수 있다.

[0127] 벡터는 프로모터 및 폴리-아데닐화 신호로부터 선택된 조절 요소에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터(hCMV 프로모터)이다. 일부 구현예에서, 폴리-아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리-아데닐화 신호(bGH polyA)이다.

[0128] 벡터는 원형 플라스미드 또는 선형 핵산일 수 있다. 원형 플라스미드 및 선형 핵산은 적절한 대상체 세포에서 특정한 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시할 수 있다. 벡터는 항원-암호화 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 가질 수 있으며, 이는 종결 신호에 작동가능하게 연결될 수 있다. 벡터는 또한 뉴클레오티드 서열의 적절한 번역에 필요한 서열을 함유할 수 있다. 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 키메라일 수 있으며, 이는 그의 구성요소 중 적어도 하나가 그의 다른 구성요소 중 적어도 하나에 대해 이종임을 의미한다. 발현 카세트에서 뉴클레오티드 서열의 발현은 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있으며, 이는 숙주 세포가 일부 특정한 외부 자극에 노출될 때만 전사를 개시한다. 다세포 유기체의 경우, 프로모터는 또한 특정한 조직 또는 기관 또는 발단 단계에 특이적일 수 있다. 벡터는 플라스미드일 수 있다. 플라스미드는 항원을 암호화하는 핵산으로 세포를 감염시키는데 유용할 수 있으며, 형질전환된 숙주 세포는 항원의 발현이 일어나는 조건 하에 배양 및 유지된다.

[0129] 플라스미드는 항원에 대해 면역 반응을 도출할 수 있는 합성, 공통 항원, 이러한 단백질의 단편, 이러한 단백질의 변이체, 공통 단백질의 조합으로 구성된 변이체 또는 융합 단백질의 단편 및/또는 공통 단백질의 단편 및/또는 공통 단백질의 변이체 및/또는 변이체 공통 단백질의 단편을 암호화하는 코딩 서열을 포함한 상기 개시된 다양한 항원 중 하나 이상을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0130] 단일 플라스미드는 단일 항원에 대한 코딩 서열, 2개의 항원에 대한 코딩 서열, 3개의 항원에 대한 코딩 서열 또는 4개의 항원에 대한 코딩 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 플라스미드는 CCR20을 단독으로 또는 이들 플라스미드 중 하나의 일부로서 암호화하는 코딩 서열을 추가로 포함할 수 있다. 유사하게, 플라스미드는 IL-12, IL-15 및/또는 IL-28에 대한 코딩 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0131] 플라스미드는 정지 코돈을 추가로 포함할 수 있으며, 이들은 코딩 서열의 상류일 수 있는 개시 코돈, 및 코딩 서열의 하류일 수 있다. 개시 및 종결 코돈은 코딩 서열로 프레임화될 수 있다.

[0132] 플라스미드는 또한 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터는 유인원 바이러스 40(SV40)으로부터의 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 프로모터 예컨대 소 면역결핍 바이러스(BIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈병 바이러스(ALV) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 예컨대 CMV 급초기 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 또는 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 또는 인간 메탈로티오네인과 같은 인간 유전자로부터의 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 조직 특이적 프로모터, 예컨대 자연 또는 합성 근육 또는 피부 특이적 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터의 예는 미국 특허 출원 공개 번호 US20040175727에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0133] 플라스미드는 또한 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있으며, 이는 코딩 서열의 하류일 수 있다. 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호, 또는 인간 β-글로빈 폴리아데닐화 신호일 수 있다. SV40 폴리아데닐화 신호는 pCEP4 플라스미드(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)로부터의 폴리아데닐화 신호일 수 있다.

[0134] 플라스미드는 또한 코딩 서열의 상류의 인핸서를 포함할 수 있다. 인핸서는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 또는 바이러스 인핸서 예컨대 CMV, FMDV, RSV 또는 EBV로부터의 것일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 기능 인핸서는 미국 특허 번호 제 5,593,972호, 제5,962,428호, 및 WO94/016737에 기재되어 있으며, 각각의 내용은 참조로 완전히 포함된다.

[0135] 플라스미드는 또한 플라스미드를 염색체외로 유지하고 세포에서 플라스미드의 다수의 카피를 생산하기 위해 포유류의 복제 기점을 포함할 수 있다. 플라스미드는 Invitrogen(캘리포니아주 샌디에이고 소재)으로부터의 p V AXI, pCEP4 또는 pREP4일 수 있으며, 이는 엡스타인 바 바이러스의 복제 기점 및 핵 항원 EBNA-1 코딩 영역을 포함할 수 있으며, 통합 없이 높은 카피 에피솜 복제를 생산할 수 있다. 플라스미드의 백본(backbone)은 pA V0242일 수 있다. 플라스미드는 복제 결함 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 플라스미드일 수 있다.

[0136] 플라스미드는 또한 조절 서열을 포함할 수 있으며, 이는 플라스미드가 투여된 세포에서 유전자 발현에 매우 적합할 수 있다. 코딩 서열은 숙주 세포에서 코딩 서열의 보다 효율적인 전사를 허용할 수 있는 코돈을 포함할 수 있다.

[0137] 코딩 서열은 또한 Ig 리더 서열을 포함할 수 있다. 리더 서열은 코딩 서열의 5'일 수 있다. 이 서열에 의해 암호화된 공통 항원은 N-말단 Ig 리더 이어서 공통 항원 단백질을 포함할 수 있다. N-말단 Ig 리더는 IgE 또는 IgG일 수 있다.

[0138] 플라스미드는 pSE420(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있으며, 이는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)(E.coli)에서 단백질 생산에 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한 p YES2(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있으며, 이는 효모의 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 균주에서 단백질 생산에 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한 MAXBAC™ 완전 배큘로바이러스 발현 시스템(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있으며, 곤충 세포에서 단백질 생산에 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한 pcDNA I 또는 pcDNA3(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있으며, 이는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유류 세포에서 단백질 생산에 사용될 수 있다. 벡터는 원형 플라스미드일 수 있으며, 이는 세포 게놈 내로의 통합에 의해 표적 세포를 형질전환시키거나 또는 염색체외로 존재할 수 있다(예를 들어, 복제 기점을 갖는 자율적 복제 플라스미드).

[0139] 벡터는 pVAX, pcDNA3.0, 또는 프로박스(provax), 또는 항원을 암호화하는 DNA를 발현하고 세포가 서열을 면역계에 의해 인식된 항원으로 번역하도록 할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

[0140] 또한 선형 핵산 백신, 또는 전기천공법을 통해 대상체에 효율적으로 전달되고 하나 이상의 원하는 항원을 발현할 수 있는 선형 발현 카세트("LEC")가 본원에 제공된다. LEC는 임의의 포스페이트 백본이 없는 임의의 선형 DNA일 수 있다. DNA는 하나 이상의 항원을 암호화할 수 있다. LEC는 프로모터, 인트론, 정지 코돈, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다. 항원의 발현은 프로모터에 의해 제어될 수 있다. LEC는 임의의 항생제 내성 유전자 및/또는 포스페이트 백본을 함유하지 않을 수 있다. LEC는 원하는 항원 유전자 발현과 관련이 없는 다른 핵산 서열을 함유하지 않을 수 있다.

[0141] LEC는 선형화될 수 있는 임의의 플라스미드로부터 유래될 수 있다. 플라스미드는 항원을 발현할 수 있다. 플라스미드는 pNP(Puerto Rico/34) 또는 pM2(New Caledonia/99)일 수 있다. 플라스미드 WLV009, pVAX, pcDNA3.0, 또는 프로박스, 또는 항원을 암호화하는 DNA를 발현하고 세포가 서열을 면역계에 의해 인식된 항원으로 번역할 수 있게 하는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다. LEC는 pcrM2일 수 있다. LEC는 pcrNP일 수 있다. pcrNP 및 pcrMR은 각각 pNP(Puerto Rico/34) 및 pM2(New Caledonia/99)로부터 유래될 수 있다.

[0142] 벡터는 프로모터를 가질 수 있다. 프로모터는 유전자 발현을 유도하고 단리된 핵산의 발현을 조절할 수 있는 임의의 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 DNA 의존적 RNA 폴리머라제를 통한 전사에 필요한 시스-작용 서열 요소이며, 본원에 기재된 항원 서열을 전사시킨다. 이종 핵산의 발현을 지시하는데 사용되는 프로모터의 선택은 특정한 적용에 의존한다. 프로모터는 자연적 설정에서 전사 개시 부위로부터와 벡터에서 전사 개시로부터 거의 동일한 거리에 위치할 수 있다. 그러나, 이 거리의 변화는 프로모터 기능의 상실 없이 수용될 수 있다.

[0143] 프로모터는 항원 및 전사체의 효율적인 폴리아데닐화, 리보솜 결합 부위, 및 번역 종결에 필요한 신호를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0144] 프로모터는 CMV 프로모터, SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 뮤린(murine) 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, 또는 진핵 세포에서 발현에 효과적인 것으로 제시된 다른 프로모터일 수 있다.

[0145] 벡터는 기능적 스플라이스 공여자 및 수용자 부위를 갖는 인핸서 및 인트론을 포함할 수 있다. 벡터는 효율적인 종결을 제공하기 위해 구조적 유전자의 하류의 전사 종결 영역을 함유할 수 있다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 수득될 수 있거나 또는 상이한 유전자로부터 수득될 수 있다.

[0146] 벡터를 제조하는 방법

[0147] 본원에서는 본원에 논의된 LEMD1 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제조하는 방법이 제공된다. 벡터는, 포유류 발현 플라스미드 내로 최종 서브클로닝 단계 후에, 당업계에 알려진 방법을 사용하여, 대규모 발효 탱크에서 세포 배양물을 접종하는데 사용될 수 있다.

[0148] 하기에 보다 상세하게 기재된 EP 장치와 함께 사용하기 위한 벡터는 알려진 장치 및 기술의 조합을 사용하여 제형화 또는 제조될 수 있지만, 바람직하게는 이들은 2007년 5월 23일자로 출원된 허가된 동시-계류중인 미국 가출원 미국 일련 번호 제60/939,792호에 기재된 최적화된 플라스미드 제조 기술을 사용하여 제조된다. 일부 예에서, 이들 연구에 사용되는 DNA 플라스미드는 10 mg/mL 이상의 농도로 제형화될 수 있다. 제조 기술은 또한 2007년 7월 3일자로 허여된 라이선싱된 특허인 미국 특허 번호 제7,238,522호에 기재된 것들을 포함하여, 미국 일련 번호 제60/939792호에 기재된 것들 이외에, 당업자에게 통상적으로 알려진 다양한 장치 및 프로토콜을 포함하거나 혼입한다. 상기 참조된 출원 및 특허, 각각 미국 일련 번호 제60/939,792호 및 미국 특허 번호 제7,238,522호는 그 전문이 본원에 포함된다.

[0149] 백신의 부형제 및 다른 구성요소

[0150] 백신은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 비히클, 담체, 또는 희석제와 같은 기능적 분자일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 형질감염 촉진제일 수 있으며, 이는 표면 활성제, 예컨대 면역-자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 애주번트, 모노포스포릴 지질 A를 포함한 LPS 유사체, 뮤라밀 펩티드, 퀴논 유사체, 소포 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 히알루론산, 지질, 리포솜, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다가음이온, 다가양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 알려진 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다.

[0151] 형질감염 촉진제는 다가음이온, 폴리-L-글루타메이트(LGS)를 포함한 다가양이온, 또는 지질이다. 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트이고, 폴리-L-글루타메이트는 6 mg/ml 미만의 농도로 백신에 존재할 수 있다. 형질감염 촉진제는 또한 표면 활성제 예컨대 면역-자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 애주번트, 모노포스포릴 지질 A를 포함한 LPS 유사체, 뮤라밀 펩티드, 퀴논 유사체 및 소포 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 및 히알루론산을 포함할 수 있으며 또한 유전자 작제물과 함께 투여될 수 있다. DNA 플라스미드 백신은 또한 지질, DNA-리포솜 혼합물(예를 들어 WO9324640 참조)로서, 레시틴 리포솜 또는 당업계에 알려진 다른 리포솜을 포함한 리포솜, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다가음이온, 다가양이온, 또는 나노입자와 같은 형질감염 촉진제, 또는 다른 알려진 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다. 형질감염 촉진제는 다가음이온, 폴리-L-글루타메이트(LGS)를 포함

한 다가양이온, 또는 지질이다. 백신에서 형질감염제의 농도는 4 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 0.750 mg/ml 미만, 0.500 mg/ml 미만, 0.250 mg/ml 미만, 0.100 mg/ml 미만, 0.050 mg/ml 미만, 또는 0.010 mg/ml 미만이다.

[0152] 약제학적으로 허용되는 부형제는 하나 이상의 애주번트일 수 있다. 애주번트는 대안적인 플라스미드에서 발현된 다른 유전자일 수 있거나 또는 백신에서 상기 플라스미드와 조합된 단백질로서 전달된다. 하나 이상의 애주번트는 CCL20, α-인터페론(IFN-α), β-인터페론(IFN-β), γ-인터페론, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNFα, TNRβ, GM-CSF, 표피 성장 인자(EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인(CTACK), 상피 흉선-발현 케모카인(TECK), 점막-연관 상피 케모카인(MEC), IL-12, IL-15, , IL-28, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1~, IL-8, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DRS, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-I, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAPI, TAP2, 신호 서열 또는 결실된 신호 서열을 암호화하고 임의적으로 IgE로부터의 것과 같은 상이한 신호 펩티드를 포함하는 코딩 서열 또는 IgE로부터의 것과 같은 상이한 신호 펩티드를 암호화하는 코딩 서열, 및 이의 기능적 단편, 또는 이의 조합을 갖는 IL-15로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNFα, TNRβ, GM-CSF, 표피 성장 인자(EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0153] 일부 구현예에서 애주번트는 하나 이상의 단백질 및/또는 CCL-20, IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, MEC 또는 RANTES로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 암호화하는 핵산 분자일 수 있다. IL-12 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US1997/019502 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 제08/956,865호, 및 2011년 12월 12일자로 출원된 미국 가출원 일련 번호 제61/569600호에 개시되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. IL-15 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US04/18962 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 제10/560,650호, 및 PCT 출원 번호 PCT/US07/00886 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 제12/160,766호, 및 PCT 출원 번호 PCT/USI0/048827에 개시되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. IL-28 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US09/039648 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 제12/936,192호에 개시되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. RANTES 및 다른 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US1999/004332 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 및 제09/622452호에 개시되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. RANTES 작제물 및 서열의 다른 예는 PCT 출원 번호 PCT/US11/024098에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. RANTES 및 다른 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US1999/004332 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 제09/622452호에 개시되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. RANTES 작제물 및 서열의 다른 예는 PCT 출원 번호 PCT/US11/024098에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 케모카인 CTACK, TECK 및 MEC 작제물 및 서열의 예는 PCT 출원 번호 PCT/US2005/042231 및 상응하는 미국 출원 일련 번호 제11/719,646호에 개시되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. OX40 및 다른 면역조절제의 예는 미국 출원 일련 번호 제10/560,653호에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. DR5 및 다른 면역조절제의 예는 미국 출원 일련 번호 제09/622452호에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0154] 애주번트로서 유용할 수 있는 다른 유전자는 MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, IL-22, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이의 기능성 단편을 암호화하는 것들을 포함한다.

[0155] 백신은 1994년 4월 1일자로 출원된 미국 일련 번호 제021,579호에 기재된 바와 같은 유전자 백신 촉진제를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 참조로 완전히 포함된다.

[0156] 백신은 항원 및 플라스미드를 약 1 나노그램 내지 100 밀리그램; 약 1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 또는 바람직하게는 약 0.1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 또는 보다 바람직하게는 약 1 밀리그램 내지 약 2 밀리그램의 양으로 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 백신은 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 백신은 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 백신은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 백신은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 백신은 약 25 내지 약 250 마이크로그램, 약 100 내지 약 200 마이크로그램, 약 1 나노그램 내지 100 밀리그램; 약 1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 약 0.1 마이크로그램 내지 약 10 밀리그램; 약 1 밀리그램 내지 약 2 밀리그램, 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램, 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램, 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램, 약 1 내지 약 350 마이크로그램, 약 25 내지 약 250 마이크로그램, 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 항원 또는 이의 플라스미드를 함유할 수 있다.

[0157] 백신은 사용될 투여 방식에 따라 제형화될 수 있다. 주사가능한 백신 약제학적 조성물은 멸균성이고, 발열원이 없으며 미립자가 없을 수 있다. 등장성 제형 또는 용액이 사용될 수 있다. 등장성을 위한 첨가제는 염화나트륨, 덱스트로스, 만니톨, 소르비톨, 및 락토스를 포함할 수 있다. 백신은 혈관수축제를 포함할 수 있다. 등장성 용액은 포스페이트 완충 염수를 포함할 수 있다. 백신은 젤라틴 및 알부민을 포함한 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 안정화제는 제형이 LGS 또는 다가양이온 또는 다가음이온을 포함하여 실온 또는 주위 온도에서 연장된 기간 동안 안정되게 할 수 있다.

[0158] 백신의 약제학적 조성물

[0159] 백신은 약제학적 조성물의 형태일 수 있다. 약제학적 조성물은 백신을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 약 5 나노그램(ng) 내지 약 10 밀리그램(mg)의 백신의 DNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약 25 ng 내지 약 5 mg의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 50 ng 내지 약 1 mg의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5 내지 약 250 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10 내지 약 200 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 15 내지 약 150 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 20 내지 약 100 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 75 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 30 내지 약 50 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 35 내지 약 40 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10 마이크로그램 내지 약 100 마이크로그램의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 20 마이크로그램 내지 약 80 마이크로그램의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 25 마이크로그램 내지 약 60 마이크로그램의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 30 ng 내지 약 50 마이크로그램의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 35 ng 내지 약 45 마이크로그램의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 250 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다. 일부 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 백신의 DNA를 함유한다.

[0160] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ng의 백신의 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95,100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895. 900, 905, 910, 915,

920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 또는 1000 마이크로그램의 백신의 DNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 mg 또는 그 이상의 백신의 DNA를 포함할 수 있다.

[0161] 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ng 이하의 백신의 DNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95,100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895. 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, 또는 1000 마이크로그램 이하의 백신의 DNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 mg 이하의 백신의 DNA를 포함할 수 있다.

[0162] 약제학적 조성물은 사용될 투여 방식에 따라 제형화 목적을 위한 다른 제제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적 조성물이 주사가능한 약제학적 조성물인 경우에, 이들은 멸균성이고, 발연원이 없으며 미립자가 없다. 바람직하게는 등장성 제형이 사용된다. 일반적으로, 등장성을 위한 첨가제는 염화나트륨, 덱스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 포스페이트 완충 염수와 같은 등장성 용액이 바람직하다. 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 혈관수축제가 제형에 첨가된다.

[0163] 백신은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 비히클, 애주번트, 담체, 또는 희석제와 같은 기능적 분자일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 형질감염 촉진제일 수 있다.

[0164] 일부 구현예에서, 형질감염 촉진제는 다가음이온, 폴리-L-글루타메이트(LGS)를 포함한 다가양이온, 또는 지질이다. 일 구현예에서, 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트이고, 보다 바람직하게는, 폴리-L-글루타메이트는 6 mg/ml 미만의 농도로 백신에 존재한다. 형질감염 촉진제는 또한 표면 활성제 예컨대 면역-자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 애주번트, 모노포스포릴 지질 A를 포함한 LPS 유사체, 뮤라밀 펩티드, 퀴논 유사체 및 소포 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 및 히알루론산을 포함할 수 있고 또한 유전자 작제물과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 형질감염 촉진제는 지질, DNA-리포솜 혼합물(예를 들어 WO9324640 참조)로서 레시틴 리포솜 및 당업계에 알려진 다른 리포솜을 포함한 리포솜, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다가음이온, 다가양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 알려진 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다. 백신에서 형질감염제의 농도는 4 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 0.750 mg/ml 미만, 0.500 mg/ml 미만, 0.250 mg/ml 미만, 0.100 mg/ml 미만, 0.050 mg/ml 미만, 또는 0.010 mg/ml 미만일 수 있다.

[0165] 약제학적으로 허용되는 부형제는 애주번트일 수 있다. 애주번트는 하나 이상의 대안적인 플라스미드에서 발현된 다른 유전자일 수 있거나 또는 백신에서 상기 플라스미드와 조합된 단백질로 전달된다. 애주번트는 α-인터페론(IFN-α), β-인터페론(IFN-β), γ-인터페론, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNFα, TNRβ, GM-CSF, 표피 성장 인자(EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인(CTACK), 상피 흉선-발현 케모카인(TECK), 점막-연관 상피 케모카인(MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80,CD86 예컨대 결실된 신호 서열을 갖고 임의적으로 IgE로부터의 신호 펩티드를 포함하는 IL-15로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNFα, TNRβ, GM-CSF, 표피 성장 인자(EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 또는 이의 조합일 수 있다. 예시적인 구현예에서, 애주번트는 IL-12이다.

[0166] 유용한 애주번트일 수 있는 다른 유전자는 MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL,

TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이의 기능적 단편을 암호화하는 것들을 포함한다.

[0167] 백신접종 방법

[0168] 본원에는 상기 기재된 약제학적 제형을 사용하여 LEMD1-발현 암을 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공된다. 또한 대상체에서 암의 치료 및/또는 예방에서 상기 기재된 약제학적 제형을 사용하는 방법이 본원에 기재된다. 또한 대상체를 백신접종하는 방법이 본원에 기재된다. 또한 본원에 기재된 약제학적 제형을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 방법이 본원에 기재된다. 본원에 기재된 약제학적 제형을 사용하는 치료 방법으로 집합적으로 지칭되는 본원에 기재된 방법은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 백신을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하여 치료적 및/또는 예방적 면역 반응을 유도하는 단계를 포함할 수 있다. 백신은 대상체의 면역계 활성을 조절하고 면역 반응을 향상시키기 위해 대상체에 투여될 수 있다. 백신의 투여는 세포에서 발현되고 세포의 표면에 전달되는 핵산 분자로서 본원에 개시된 바와 같은 암 항원의 형질감염일 수 있으며, 그래서 면역계는 세포성, 체액성, 또는 세포성 및 체액성 반응을 인식 및 유도한다. 백신의 투여는 본원에 논의된 바와 같은 백신을 대상체에 투여함으로써 본원에 개시된 바와 같은 암 항원 중 하나 이상에 대해 대상체에서 면역 반응을 유도 또는 도출하는데 사용될 수 있다.

[0169] 백신은 대상체의 면역계 활성을 조절하여, 면역 반응을 향상시키기 위해 대상체에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이다. 백신을 포유동물에 투여하여, 벡터를 포유동물의 세포 내로 도입하면, 형질감염된 세포는 본원에 개시된 바와 같은 암 항원 중 하나 이상을 발현 및 분비할 것이다. 이들 분비된 단백질, 또는 합성 항원은 면역계에 의해 외부물질로 인식될 것이며, 이는 하나 이상의 암 항원에 대해 제조된 항체, 및 특이적으로 하나 이상의 암 항원에 대해 T-세포 반응을 포함할 수 있는 면역 반응이 증가할 것이다. 일부 예에서, 본원에 논의된 백신으로 백신접종된 포유동물은 프라이밍된 면역계를 가질 것이고 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 암 항원으로 시험감염될 때, 프라이밍된 면역계는 체액성, 세포성, 또는 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다를 통해서든, 본원에 개시된 바와 같은 후속 암 항원의 신속한 소거를 허용할 것이다.

[0170] 백신의 DNA를 투여하는 방법은 미국 특허 번호 제4,945,050호 및 제5,036,006호에 기재되어 있으며, 둘 다 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0171] 백신은 포유동물에서 면역 반응을 도출하기 위해 포유동물에 투여될 수 있다. 포유동물은 인간, 비-인간 영장류, 소, 돼지, 양, 염소, 영양, 들소, 물소, 소과류, 사슴, 고슴도치류, 코끼리류, 라마, 알파카, 마우스, 래트류, 및 바람직하게는 인간, 소, 또는 돼지일 수 있다. 백신은 마찬가지로 면역 반응을 도출하기 위해 비-포유동물 대상체, 예를 들어 닭에 투여될 수 있다.

[0172] 백신 용량은 시간 경과에 따라 킬로그램(kg) 체중 당 1 마이크로그램 내지 10 mg 활성 구성요소(구성요소/kg 체중/시간)일 수 있고, 20 마이크로그램 내지 10 mg 구성요소/kg 체중/시간일 수 있다. 백신은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료를 위한 백신 투약 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회, 또는 그 이상의 투약일 수 있다.

[0173] 백신으로 면역 반응을 생성하는 방법

[0174] 백신은 포유동물 또는 비-포유동물 대상체에서, 치료적 또는 예방적 면역 반응을 포함한 면역 반응을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 면역 반응은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 암 항원에 대해 지시된 항체 및/또는 킬러 T 세포를 생성할 수 있다. 이러한 항체 및 T 세포는 단리될 수 있다.

[0175] 일부 구현예는 본원에 개시된 바와 같은 암 항원 중 하나 이상에 대해 면역 반응을 생성하는 방법을 제공하며, 구현예는 백신을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예는 상기 기재된 바와 같은 암 항원 중 하나 이상을 발현하는 암 또는 종양에 대해 대상체를 예방적으로 백신접종하는 방법을 제공하며, 구현예는 백신을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예는 암 항원 중 하나 이상을 발현하는 암 또는 종양을 앓고 있는 대상체를 치료적으로 백신접종하는 방법을 제공하며, 구현예는 백신을 투여하는 단계를 포함한다. 백신의 투여 전에 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 암 항원을 발현하는 암 또는 종양의 진단이 일상적으로 수행될 수 있다.

[0176] 백신으로 암을 치료하는 방법

[0177] 백신은 이를 필요로 하는 포유동물 또는 대상체의 암 또는 종양(예를 들어, HPV-매개 암, 상피성 난소암, 흑색종, 두경부암, 자궁경부암, 간암, 전립선암, 혈액암, 식도 편평상피 세포 암종, 위암)에 반응성이거나 또는 지

시된 포유동물에서 면역 반응을 생성 또는 도출하기 위해 사용될 수 있다. 도출된 면역 반응은 암 또는 종양 성장을 방지할 수 있다.

[0178] 도출된 면역 반응은 암성 또는 종양 세포의 전이를 예방 및/또는 감소시킬 수 있다. 따라서, 백신은 백신이 투여된 포유동물 또는 대상체에서 암 또는 종양을 치료 및/또는 예방하는 방법에 사용될 수 있다. 치료된 암 또는 종양 기반 성장은 비제한적으로 결장직장암과 같은 임의의 유형의 암일 수 있다.

[0179] 일부 구현예에서, 투여된 백신은 (1) B 세포 반응을 통한 체액 면역을 유도하여 단핵구 화학유인물질 단백질-1(MCP-1) 생산을 차단하여, 골수 유래 저해 세포(MDSC)를 지연시키고 종양 성장을 저해하는 항체를 생성하고; (2) 종양 세포를 공격 및 사멸시키기 위해 $CD8^+$과 같은 세포독성 T 림프구(CTL)를 증가시키고; (3) T 헬퍼 세포 반응을 증가시키고; (4) IFN-γ 및 TFN-α를 통한 염증 반응 또는 바람직하게는 상기 언급된 모든 것을 증가시킴으로써 종양 세포의 소거를 매개하거나 또는 성장을 방지할 수 있다.

[0180] 일부 구현예에서, 면역 반응은 백신이 투여된 대상체에서 다양한 조직 또는 시스템(예를 들어, 뇌 또는 신경계 등)의 손상 또는 염증을 유발하지 않는 체액성 면역 반응 및/또는 항원-특이적 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 생성할 수 있다.

[0181] 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서 생존을 증가시키거나, 종양 질량을 감소시키거나, 또는 이들의 조합일 수 있다. 투여된 백신은 대상체에서 무종양 생존을 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60%까지 증가시킬 수 있다. 투여된 백신은 면역화 후 대상체에서 종양 질량을 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 및 70%까지 감소시킬 수 있다. 투여된 백신은 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 LEMD1-매개 종양형성 및/또는 종양 진행을 방지 및 차단할 수 있다. 백신은 골수 유래 저해 세포에 의해 분비된 사이토카인인 단핵구 화학유인물질 단백질 1(MCP-1)의 증가를 방지 및 차단할 수 있다. 백신은 종양 생존을 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 및 60%까지 증가시킬 수 있다.

[0182] 일부 구현예에서, 백신은 백신이 투여된 대상체에서 손상 또는 질병 또는 사망을 야기하지 않고 하나 이상의 암 항원을 발현하는 암 또는 종양을 소거 또는 제거하기 위해 암성 또는 종양 세포 또는 조직을 표적화하는 항원-특이적 면역 반응을 확립하기 위해 (하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같이) 주변부에 투여될 수 있다.

[0183] 투여된 백신은 대상체에서의 세포성 면역 반응을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 약 50-배 내지 약 6000-배, 약 50-배 내지 약 5500-배, 약 50-배 내지 약 5000-배, 약 50-배 내지 약 4500-배, 약 100-배 내지 약 6000-배, 약 150-배 내지 약 6000-배, 약 200-배 내지 약 6000-배, 약 250-배 내지 약 6000-배, 또는 약 300-배 내지 약 6000-배까지 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서의 세포성 면역 반응을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 약 50-배, 100-배, 150-배, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배, 400-배, 450-배, 500-배, 550-배, 600-배, 650-배, 700-배, 750-배, 800-배, 850-배, 900-배, 950-배, 1000-배, 1100-배, 1200-배, 1300-배, 1400-배, 1500-배, 1600-배, 1700-배, 1800-배, 1900-배, 2000-배, 2100-배, 2200-배, 2300-배, 2400-배, 2500-배, 2600-배, 2700-배, 2800-배, 2900-배, 3000-배, 3100-배, 3200-배, 3300-배, 3400-배, 3500-배, 3600-배, 3700-배, 3800-배, 3900-배, 4000-배, 4100-배, 4200-배, 4300-배, 4400-배, 4500-배, 4600-배, 4700-배, 4800-배, 4900-배, 5000-배, 5100-배, 5200-배, 5300-배, 5400-배, 5500-배, 5600-배, 5700-배, 5800-배, 5900-배, 또는 6000-배까지 증가시킬 수 있다.

[0184] 투여된 백신은 대상체에서의 인터페론 감마(IFN-γ) 수준을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 약 50-배 내지 약 6000-배, 약 50-배 내지 약 5500-배, 약 50-배 내지 약 5000-배, 약 50-배 내지 약 4500-배, 약 100-배 내지 약 6000-배, 약 150-배 내지 약 6000-배, 약 200-배 내지 약 6000-배, 약 250-배 내지 약 6000-배, 또는 약 300-배 내지 약 6000-배까지 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 투여된 백신은 대상체에서의 IFN-γ 수준을 백신이 투여되지 않은 대상체에서의 세포성 면역 반응과 비교하여 약 50-배, 100-배, 150-배, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배, 400-배, 450-배, 500-배, 550-배, 600-배, 650-배, 700-배, 750-배, 800-배, 850-배, 900-배, 950-배, 1000-배, 1100-배, 1200-배, 1300-배, 1400-배, 1500-배, 1600-배, 1700-배, 1800-배, 1900-배, 2000-배, 2100-배, 2200-배, 2300-배, 2400-배, 2500-배, 2600-배, 2700-배,

2800-배, 2900-배, 3000-배, 3100-배, 3200-배, 3300-배, 3400-배, 3500-배, 3600-배, 3700-배, 3800-배, 3900-배, 4000-배, 4100-배, 4200-배, 4300-배, 4400-배, 4500-배, 4600-배, 4700-배, 4800-배, 4900-배, 5000-배, 5100-배, 5200-배, 5300-배, 5400-배, 5500-배, 5600-배, 5700-배, 5800-배, 5900-배, 또는 6000-배까지 증가시킬 수 있다.

[0185] 백신 용량은 시간 경과에 따라 킬로그램(kg) 체중 당 1 마이크로그램 내지 10 mg 활성 구성요소(구성요소/kg 체중/시간)일 수 있고, 20 마이크로그램 내지 10 mg 구성요소/kg 체중/시간일 수 있다. 백신은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료를 위한 백신 투약 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 투약일 수 있다.

[0186] 투여 경로

[0187] 백신 또는 약제학적 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입을 통해, 협측 투여를 통해, 흉강내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내 척추강내, 및/또는 관절내, 또는 이의 조합을 포함한 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 수의과 용도를 위해, 조성물은 정상 수의과 실습에 따라 적합하게 허용되는 제형으로 투여될 수 있다. 수의사는 특정한 동물에 가장 적합한 투약 레지멘 및 투여 경로를 용이하게 결정할 수 있다. 백신은 통상적인 주사기, 무바늘 주사 장치, "미세발사체 충격 유전자 총", 또는 전기천공법("EP"), "유체역학적 방법", 또는 초음파와 같은 다른 물리적 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0188] 백신의 벡터는 생체내 전기천공법, 리포솜 매개 형질감염, 나노입자 촉진 형질감염, 및 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 연관 바이러스, 및 재조합 백시니아와 같은 재조합 벡터 사용과 함께 또는 없이 DNA 주사(또한 DNA 백신접종으로도 지칭됨)를 포함한 널리 알려진 여러 기술에 의해 포유동물에 투여될 수 있다. 백신의 하나 이상의 암 항원은 생체내 전기천공법과 함께 DNA 주사를 통해 투여될 수 있다.

[0189] 전기천공법

[0190] 백신 또는 약제학적 조성물은 전기천공법에 의해 투여될 수 있다. 전기천공법을 통한 백신의 투여는 세포 막에서 가역성 기공을 형성시키는데 효과적인 에너지 펄스를 포유동물의 원하는 조직에 전달하도록 구성될 수 있는 전기천공법 장치를 사용하여 달성될 수 있고, 바람직하게는 에너지 펄스는 사용자에 의해 미리 설정된 전류 입력과 유사한 정전류이다. 전기천공법 장치는 전기천공법 구성요소 및 전극 어셈블리 또는 핸들 어셈블리를 포함할 수 있다. 전기천공법 구성요소는 제어기, 전류 파형 발생기, 임피던스 테스터, 파형 로거(waveform logger), 입력 요소, 상태 보고 요소, 통신 포트, 메모리 구성요소, 전원, 및 전원 스위치를 포함한 전기천공법 장치의 다양한 요소 중 하나 이상을 포함하고 통합할 수 있다. 전기천공법은 플라스미드에 의해 세포의 형질감염을 촉진시키는 생체내 전기천공법 장치, 예를 들어 CELLECTRA® EP 시스템(Inovio Pharmaceuticals, Inc., 펜실베니아주 블루 벨 소재) 또는 Elgen 전기천공기(Inovio Pharmaceuticals, Inc.)를 사용하여 달성될 수 있다.

[0191] 본 발명의 DNA 백신의 투여를 촉진할 수 있는 전기천공법 장치 및 전기천공법 방법의 예는 Draghia-Akli 등에 의한 미국 특허 번호 제7,245,963호, Smith 등에 의해 제출된 미국 특허 공개 제2005/0052630호에 기재된 것들을 포함하며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. DNA 백신의 투여를 촉진하는데 사용될 수 있는 다른 전기천공법 장치 및 전기천공법 방법은 2007년 10월 17일자로 출원된 동시-계류중이고 공동 소유된 미국 특허 출원 일련 번호 제11/874072호에 제공된 것들을 포함하며, 이는 2006년 10월 17일자로 출원된 미국 가출원 일련 번호 제60/852,149호, 및 2007년 10월 10일자로 출원된 제60/978,982호에 대해 35 USC 119(e) 하에 우선권을 주장하며, 이들 모두 그 전문이 본원에 포함된다.

[0192] Draghia-Akli 등에 의한 미국 특허 번호 제7,245,963호는 신체 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 촉진하기 위한 모듈형 전극 시스템 및 그들의 용도를 기재하고 있다. 모듈형 전극 시스템은 복수의 바늘 전극; 피하 주사침; 프로그램가능한 정전류 펄스 제어기로부터 복수의 바늘 전극으로 전도성 링크를 제공하는 전기 커넥터; 및 전원을 포함할 수 있다. 작동자는 지지 구조물 상에 장착된 복수의 바늘 전극을 잡고 이를 신체 또는 식물에서 선택된 조직 내로 단단히 삽입할 수 있다. 이어서 생체분자는 피하 주사침을 통해 선택된 조직 내로 투여된다. 프로그램가능한 정전류 펄스 제어기가 활성화되고 정전류 전기 펄스가 복수의 바늘 전극에 적용된다. 적용된 정전류 전기 펄스는 복수의 전극 사이의 세포 내로 생체분자의 도입을 촉진한다. 미국 특허 번호 제7,245,963호의 전체 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0193] Smith 등에 의해 제출된 미국 특허 공개 제2005/0052630호는 신체 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체

분자의 도입을 효과적으로 촉진하는데 사용될 수 있는 전기천공법 장치를 기재하고 있다. 전기천공법 장치는 작동이 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 명시되는 동전기 장치("EKD 장치")를 포함한다. EKD 장치는 펄스 파라미터의 사용자 제어 및 입력에 기초한 어레이에서 전극 사이에 일련의 프로그램가능한 정전류 펄스 패턴을 생산하고, 전류 파형 데이터의 저장 및 수집을 허용한다. 전기천공법 장치는 또한 바늘 전극의 어레이를 갖는 교체형 전극 디스크, 주사 바늘용 중앙 주사 채널, 및 탈착형 가이드 디스크를 포함한다. 미국 특허 공개 제2005/0052630호의 전체 내용이 본원에 참조로 완전히 포함된다.

[0194] 미국 특허 번호 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 제2005/0052630호에 기재되어 있는 전극 어레이 및 방법은 근육과 같은 조직뿐만 아니라, 다른 조직 또는 기관 내로의 깊은 침투를 위해 적용될 수 있다. 전극 어레이의 구성으로 인해, 주사 바늘(탈신경계에 대한 생체분자 선택)은 또한 표적 기관 내로 완전히 삽입되고, 주사는 전극에 의해 미리 기술된 영역에서 표적 이슈에 수직으로 투여된다. 미국 특허 번호 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 제2005/005263호에 기재된 전극은 바람직하게는 20 ㎜ 길이 및 21 게이지이다.

[0195] 추가적으로, 전기천공법 장치 및 이의 용도를 포함하는 일부 구현예에서 고려하면, 하기 특허에 기재된 것들과 같은 전기천공법 장치가 있다: 1993년 12월 28일 허여된 미국 특허 제5,273,525호, 2000년 8월 29일 허여된 미국 특허 제6,110,161호, 2001년 7월 17일 허여된 제6,261,281호, 및 2005년 10월 25일 허여된 제6,958,060호, 및 2005년 9월 6일 허여된 미국 특허 제6,939,862호. 또한, 임의의 다양한 장치를 사용하여 DNA의 투여를 고려하는 2004년 2월 24일 허여된 미국 특허 제6,697,669호, 및 DNA를 주사하는 방법에 관한 2008년 2월 5일 허여된 미국 특허 제7,328,064호에 제공된 대상 주제에 관한 특허가 본원에서 고려된다. 상기 특허는 그 전문이 참조로 포함된다.

[0196] 백신을 제조하는 방법

[0197] 본원에는 본원에 논의된 백신을 포함하는 DNA 플라스미드를 제조하는 방법이 제공된다. DNA 플라스미드는, 포유류 발현 플라스미드 내로 최종 서브클로닝 단계 후, 당업계에 알려진 방법을 사용하여, 대규모 발효 탱크에서 세포 배양물을 접종하는데 사용될 수 있다.

[0198] 본 발명의 EP 장치와 함께 사용하기 위한 DNA 플라스미드는 알려진 장치 및 기술의 조합을 사용하여 제형화 또는 제조될 수 있지만, 바람직하게는 이들은 2007년 5월 23일자로 출원된 미국 공개 출원 번호 제20090004716호에 기재된 최적화된 플라스미드 제조 기술을 사용하여 제조된다. 일부 예에서, 이들 연구에 사용된 DNA 플라스미드는 10 mg/mL 이상의 농도로 제형화될 수 있다. 제조 기술은 또한 2007년 7월 3일 허여된 라이선싱된 특허인 미국 특허 제7,238,522호에 기재된 것들을 포함하여, 미국 일련 번호 제60/939792호에 기재된 것들 이외에, 당업자에게 통상적으로 알려진 다양한 장치 및 프로토콜을 포함하거나 또는 통합한다. 상기 참조된 출원 및 특허, 각각 미국 일련 번호 제60/939,792호 및 미국 특허 번호 제7,238,522호는 그 전문이 본원에 포함된다.

[0199] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 예시된 다수의 측면을 갖는다.

[0200] **실시예**

[0201] 본 발명은 하기 실시예로 추가로 예시된다. 이들 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내지만 단지 예시의 방식으로 주어짐이 이해되어야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당업자는 본 발명의 본질적인 특징을 확인할 수 있고, 이의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서, 다양한 사용빈도 및 조건에 적용하도록 본 발명의 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 본원에 제시되고 기재된 것들 이외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 또한 첨부된 청구범위의 범위 내에 속하도록 의도된다.

[0202] **실시예 1**

[0203] **공통 LEMD1**

[0204] 공통 LEMD1A

[0205] 인간 공통 LEMD1A를 생성하기 위해, GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)로부터 8개의 LEMD1A 서열을 수집하였다. 선택된 서열에 대한 GenBank 수탁 번호는 다음과 같다: NP_001185979.1; XP_003938379.1; XP_012314760.1; XP_002760754.2; XP_012513307.1; XP_011371293.1; XP_011221935.1; 및 XP_007086602.1.

[0206] DNASTAR® Lasergene 소프트웨어 패키지(버전 13.0.0.357)를 사용하여 공통 서열을 생성하였다. 상기 나열된 8개의 서열을 MegAlign으로 불러오고 ClustalW 다중 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬하였다. 생성된 LEMD1A

서열은 인간 천연 LEMD1A와 97.2% 동일성을 공유한다.

[0207] 공통 LEMD1F

[0208] 인간 공통 LEMD1F를 생성하기 위해, GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)로부터 6개의 LEMD1F 서열을 수집하였다. 선택된 서열에 대한 GenBank 수탁 번호는 다음과 같다: NP_001185981.1; XP_011845800.1; XP_011813129.1; XP_010347273.1; XP_012314764.1; 및 XP_012513311.1.

[0209] DNASTAR® Lasergene 소프트웨어 패키지(버전 13.0.0.357)를 사용하여 공통 서열을 생성하였다. 상기 나열된 6개의 서열을 MegAlign으로 불러오고 ClustalW 다중 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬하였다. 생성된 LEMD1F 서열은 인간 천연 LEMD1F와 98.5% 동일성을 공유한다.

[0210] **실시예 2**

[0211] **합성 공통 LEMD1A**

[0212] LEMD1A의 생물학적 기능 폐지

[0213] 생성된 공통 LEMD1A의 잠재적인 생물학적 기능을 폐지하기 위해, LEM 도메인 내의 3개의 돌연변이(G20A, P25A 및 Y34A)를 도입하여 BAF 결합을 방해하였다. 결과적으로, 합성 공통 LEMD1A 단백질은 도 1a 및 1b에 제시된 바와 같이 천연 인간 LEMD1A 단백질과 95.6% 동일성을 공유한다.

[0214] 발현 최적화

[0215] 일단 합성 공통 LEMD1A DNA 서열이 수득되면, 더 높은 수준의 발현을 갖기 위해, 합성 공통 LEMD1A의 N-말단 메티오닌을 제거하였고 상류 코작 서열 및 IgE 리더를 N-말단에 첨가하였다. 또한, 이 유전자의 코돈 사용빈도를 호모 사피엔스(Homo sapiens) 유전자의 코돈 편향에 적용시켰고, 또한 RNA 최적화를 매우 높은(>80%) 또는 매우 낮은(<30%) GC 함량의 영역, 시스-작용 서열 모티프 예컨대 내부 TATA 박스, 피해야 하는 카이-부위 및 리보솜 진입 부위로 수행하였다. 합성 공통 LEMD1A의 개략적 표시는 도 2에 제시된다. 합성 공통 LEMD1A의 특징은 표 1에 제공된다.

[0216] **표 1: 합성 공통 LEMD1A의 특징**

[0217]

| 특징 | 합성 공통 LEMD1A |
|---|---|
| 천연 인간 LEMD1A에 대한 동일성 | 95.6% |
| 천연 레서스 LEMD1A에 대한 동일성 | 56.2-92.8% |
| 천연 마우스 LEMD1A에 대한 동일성 | 32.2-60.6% |
| 아미노산 돌연변이의 수(천연 인간 대비) | 8 |
| 삽입된 돌연변이의 수(공통 유래되지 않음) | 3 |
| 분자량 | 200 aa(22 kDa) |
| 코딩 서열의 길이(bp) | 600 |

[0218] 도 3을 참조하면, 합성된 합성 공통 LEMD1A를 BamHI 및 XhoI로 소화시키고, 발현 벡터 pGX0001(Inovio Pharmaceuticals) 내로 클로닝하였다. pGX0001 백본은 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터(hCMV 프로모터)의 제어 하에 변형된 pVAX1 발현 벡터이다. 변형을 pVAX1 내로 도입하여 pGX0001을 생성하였고 ThermoFisher Scientific으로부터 이용가능한 pVAX1의 보고된 서열에 기초하여 확인한다. 이들 변형은 표 2에 나열된다.

[0219] **표 2**

[0220]

| 변이체 | 뉴클레오티드 | 설명 |
|---|---|---|
| ACT>CTG | 2, 3, 4 | CMV 프로모터의 상류 |
| C>G | 241 | CMV 프로모터 내 |
| C>T | 1158 | 백본, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGH polyA)의 하류 |
| A>- | 2092 | 백본, 카나마이신 내성 유전자의 하류 |
| C>T | 2493 | pUC 복제 기점(pUC ori) 내 |
| G>C | 2969 | RNASeH 부위의 pUC Ori 상류의 팬 단부 내 |

[0221] pGX0001 백본은 카나마이신 내성 유전자(KanR) 및 플라스미드 복제 기점(pUC ori)을 생산 목적으로 포함한다.

이러한 요소는 진핵 세포에서 기능적이지 않다. 2998 염기 쌍 pGX0001에 존재하는 요소는 다음을 포함한다:

[0222] CMV 프로모터: 염기 137-724

[0223] T7 프로모터/프라이밍 부위: 염기 664-683

[0224] 다수의 클로닝 부위: 염기 696-811

[0225] 소 GH 폴리아데닐화 신호: 염기 829-1053

[0226] 카나마이신 내성 유전자: 염기 1226-2020

[0227] pUC 기점: 염기 2319-2992

[0228] LEMD1A를 pGX0001 백본 내로 클로닝하여 생성된 플라스미드는 pGX1431로 지정하였고, 전장 서열이 올바른(correct) 것으로 확인하였다. pGX1431은 합성 공통 LEMD1A 단백질을 암호화하는 DNA 플라스미드이다. 관련된 mRNA 생산은 인간 CMV 프로모터(hCMV 프로모터)에 의해 구동되고 소 성장 호르몬 3' 단부 폴리-아데닐화 신호(bGH polyA)에 의해 종결된다. pGX1431의 특징은 표 3에 제시된다.

[0229] **표 3**

[0230]

| 요소: | 염기 쌍: |
|---|---|
| hCMV 프로모터: | 137-724 |
| 합성 공통 LEMD1A 코딩 서열: | 742-1341 |
| bGH PolyA: | 1385-1609 |
| 카나마이신 내성(KanR): | 1782-2576 |
| pUC Ori: | 2875-3548 |

[0231] pGX1431의 아미노산 삽입 서열(서열번호: 2)

[0232]

```
1    MDWTWILFLV AAATRVHSVD VKCLSDCKLQ NQLEKLAFSP GAILPSTRKL
51   AEKKLVQLLV SPPCAPPVMN GPRELDGAQD SDDSEELNII LQGNIILSTE
101  KSKKLKKRPE ASTTKPKAVD TYCLDYKPSK GRRWAARAPS TRITYGTITK
151  ERDYCTEDQT AESWREEGFP VGLKLAVLGI FIIVVFVYLT VENKPLFG
```

[0233] N-말단 리더 서열은 삽입 서열의 아미노산 잔기 1 내지 18로 이루어지고, 아미노산 잔기 19 내지 198은 합성 공통 LEMD1A 항원이다.

[0234] pGX1431의 단일 가닥 DNA 서열(서열번호: 7):

[0235]

```
1    GCTGCTTCGC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA
51   CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
101  ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC
151  GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
201  TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG
251  TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC
301  CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT
351  ACATGACCTT ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
401  ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG
451  ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
501  ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT
```

```
551  AACAACTCCG CCCCATTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
601  GGTCTATATA AGCAGAGCTC TCTGGCTAAC TAGAGAACCC ACTGCTTACT
651  GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA AGCTGGCTAG
701  CGTTTAAACT TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCGCCAC CATGGACTGG
751  ACCTGGATTC TGTTCCTGGT GGCAGCAGCA ACACGGGTGC ACTCCGTGGA
801  CGTGAAGTGC CTGTCTGATT GTAAGCTGCA GAACCAGCTG GAGAAGCTGG
851  CCTTTAGCCC TGGCGCCATC CTGCCATCCA CCAGGAAGCT GGCCGAGAAG
901  AAGCTGGTGC AGCTGCTGGT GTCCCCACCT TGCGCACCAC CCGTGATGAA
951  TGGACCCCGC GAGCTGGACG GAGCACAGGA TAGCGACGAT TCCGAGGAGC
1001 TGAACATCAT CCTGCAGGGC AATATCATCC TGTCTACCGA GAAGAGCAAG
1051 AAGCTGAAGA AGCGGCCCGA GGCCTCTACC ACAAAGCCTA AGGCCGTGGA
1101 CACATACTGC CTGGATTATA AGCCATCTAA GGGCCGGAGA TGGGCAGCCA
1151 GGGCCCCAAG CACCCGCATC ACATACGGCA CCATCACAAA GGAGCGGGAC
1201 TATTGTACCG AGGATCAGAC AGCCGAGAGC TGGAGAGAGG AGGGCTTCCC
1251 TGTGGGCCTG AAGCTGGCCG TGCTGGGCAT CTTCATCATC GTGGTGTTCG
1301 TGTACCTGAC AGTGGAGAAC AAGCCACTGT TTGGCTGATA ACTCGAGTCT
1351 AGAGGGCCCG TTTAAACCCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG
1401 CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG
1451 GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT
1501 TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG
1551 CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG
1601 GCTCTATGGC TTCTACTGGG CGGTTTTATG GACAGCAAGC GAACCGGAAT
1651 TGCCAGCTGG GGCGCCCTCT GGTAAGGTTG GGAAGCCCTG CAAAGTAAAC
1701 TGGATGGCTT TCTTGCCGCC AAGGATCTGA TGGCGCAGGG GATCAAGCTC
1751 TGATCAAGAG ACAGGATGAG GATCGTTTCG CATGATTGAA CAAGATGGAT
1801 TGCACGCAGG TTCTCCGGCC GCTTGGGTGG AGAGGCTATT CGGCTATGAC
1851 TGGGCACAAC AGACAATCGG CTGCTCTGAT GCCGCCGTGT TCCGGCTGTC
1901 AGCGCAGGGG CGCCCGGTTC TTTTTGTCAA GACCGACCTG TCCGGTGCCC
1951 TGAATGAACT GCAAGACGAG GCAGCGCGGC TATCGTGGCT GGCCACGACG
2001 GGCGTTCCTT GCGCAGCTGT GCTCGACGTT GTCACTGAAG CGGGAAGGGA
2051 CTGGCTGCTA TTGGGCGAAG TGCCGGGGCA GGATCTCCTG TCATCTCACC
2101 TTGCTCCTGC CGAGAAAGTA TCCATCATGG CTGATGCAAT GCGGCGGCTG
```

[0236]

```
2151 CATACGCTTG ATCCGGCTAC CTGCCCATTC GACCACCAAG CGAAACATCG
2201 CATCGAGCGA GCACGTACTC GGATGGAAGC CGGTCTTGTC GATCAGGATG
2251 ATCTGGACGA AGAGCATCAG GGGCTCGCGC CAGCCGAACT GTTCGCCAGG
2301 CTCAAGGCGA GCATGCCCGA CGGCGAGGAT CTCGTCGTGA CCCATGGCGA
2351 TGCCTGCTTG CCGAATATCA TGGTGGAAAA TGGCCGCTTT TCTGGATTCA
2401 TCGACTGTGG CCGGCTGGGT GTGGCGGACC GCTATCAGGA CATAGCGTTG
2451 GCTACCCGTG ATATTGCTGA AGAGCTTGGC GGCGAATGGG CTGACCGCTT
2501 CCTCGTGCTT TACGGTATCG CCGCTCCCGA TTCGCAGCGC ATCGCCTTCT
2551 ATCGCCTTCT TGACGAGTTC TTCTGAATTA TTAACGCTTA CAATTTCCTG
2601 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTCAC ACCGCATCAG
2651 GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC
2701 TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT
2751 GCTTCAATAA TAGCACGTGC TAAAACTTCA TTTTTAATTT AAAAGGATCT
2801 AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG
2851 TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC
2901 TTGAGATCCT TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC
2951 CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT
3001 TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTTCT
3051 TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC
3101 CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC
3151 GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA
3201 GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG
3251 AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA
3301 AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG
3351 CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT
3401 GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA
3451 TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA
3501 CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT
3551 TCTT
```

[0237]

[0238] N-말단 리더 서열은 상기 서열의 뉴클레오티드 1 내지 54로 이루어지고, 나머지 뉴클레오티드는 LEMD1A 항원을 암호화한다.

[0239] **실시예 3**

[0240] **합성 공통 LEMD1F**

[0241] 생성된 공통 LEMD1F의 잠재적인 생물학적 기능을 폐지하기 위해, LEM 도메인 내의 2개의 돌연변이(G20A 및 P25A)를 도입하여 BAF 결합을 방해하였다. 결과적으로, 합성 공통 LEMD1F 단백질은 도 4a 및 4b에 제시된 바와 같이 천연 인간 LEMD1F 단백질과 95.5% 동일성을 공유한다.

[0242] 일단 합성 공통 LEMD1F DNA 서열이 수득되면, 더 높은 수준의 발현을 갖기 위해 합성 공통 LEMD1F의 N-말단 메티오닌을 제거하였고 상류 코작 서열 및 IgE 리더를 N-말단에 첨가하였다. 또한, 이 유전자의 코돈 사용빈도를 호모 사피엔스 유전자의 코돈 편향에 적용시켰다. 게다가, RNA 최적화를 또한 수행하였다: 매우 높은(>80%) 또는 매우 낮은(<30%) GC 함량의 영역 및 시스-작용 서열 모티프 예컨대 내부 TATA 박스, 카이-부위 및 리보솜 진입 부위를 피하였다. 합성 공통 단백질의 개략도는 도 5에 제시된다. 표 4는 합성 공통 LEMD1F의 일부 특징을 나타낸다.

[0243] **표 4: LEMD1F의 특징**

[0244]

| 특징 | 합성 공통 LEMD1F |
|---|---|
| 천연 인간 LEMD1F에 대한 동일성 | **95.5%** |
| 천연 레서스 LEMD1F에 대한 동일성 | **55.2-61.2%** |
| 천연 마우스 LEMD1F에 대한 동일성 | **11.9-43.3%** |
| 아미노산 돌연변이의 수(천연 인간 대비) | **3** |
| 삽입된 돌연변이의 수(공통 유래되지 않음) | **2** |
| 분자량 | **86 aa(9.5 kDa)** |
| 코딩 서열의 길이(bp) | **258** |

[0245] 발현 벡터, pGX1432를 pGX1431의 구축에 사용된 것과 동일한 pGX0001 백본을 사용하여 구축하였다. 도 6을 참조하면, 합성된 합성 공통 LEMD1F를 BamHI 및 XhoI로 소화시키고, 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터의 전사 제어 하에 배치된 발현 카세트와 발현 벡터 pGX0001(Inovio Pharmaceuticals) 내로 클로닝하였다. 생성된 플라스미드는 pGX1432로 지정하였고 전장 서열을 확인하였다. pGX1432의 특징은 표 5에 제공된다.

[0246] **표 5**

[0247]

| 요소: | 염기 쌍: |
|---|---|
| hCMV 프로모터: | 137-724 |
| 합성 공통 LEMD1F 코딩 서열: | 742-999 |
| bGH PolyA: | 1043-1267 |
| 카나마이신 내성(KanR): | 1440-2234 |
| pUC Ori: | 2533-3206 |

[0248] pGX1432의 아미노산 삽입 서열(서열번호: 4):

[0249]

```
1    MDWTWILFLV AAATRVHSVD VKCLSDCKLQ NQLEKLAFSP GAILRGLQEH
51   QAPESHMGLS PKRETTARKT RLLRAGEKKV SQWA
```

[0250] N-말단 리더 서열은 삽입 서열의 아미노산 잔기 1 내지 18로 이루어지고, 아미노산 잔기 19 내지 84는 합성 공통 LEMD1F 항원이다.

[0251] pGX1432의 단일 가닥 DNA 서열(서열번호: 8):

[0252]
```
1    GCTGCTTCGC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA
51   CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
101  ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC
151  GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
201  TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG
251  TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC
301  CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT
351  ACATGACCTT ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
401  ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG
451  ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
501  ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT
551  AACAACTCCG CCCCATTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
601  GGTCTATATA AGCAGAGCTC TCTGGCTAAC TAGAGAACCC ACTGCTTACT
651  GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA AGCTGGCTAG
701  CGTTTAAACT TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCGCCAC CATGGACTGG
751  ACCTGGATTC TGTTCCTGGT GGCAGCAGCA ACAAGGGTGC ACTCTGTGGA
801  CGTGAAGTGC CTGAGCGATT GTAAGCTGCA GAACCAGCTG GAGAAGCTGG
851  CCTTTTCCCC AGGAGCAATC CTGAGGGGAC TGCAGGAGCA CCAGGCACCA
901  GAGAGCCACA TGGGACTGTC CCCTAAGCGG GAGACCACAG CAAGGAAGAC
```

[0253]
```
951  CAGACTGCTG AGGGCAGGAG AGAAGAAGGT GTCTCAGTGG GCCTGATAAC
1001 TCGAGTCTAG AGGGCCCGTT TAAACCCGCT GATCAGCCTC GACTGTGCCT
1051 TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCCTTGAC
1101 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG
1151 CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG
1201 CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA
1251 TGCGGTGGGC TCTATGGCTT CTACTGGGCG GTTTTATGGA CAGCAAGCGA
1301 ACCGGAATTG CCAGCTGGGG CGCCCTCTGG TAAGGTTGGG AAGCCCTGCA
1351 AAGTAAACTG GATGGCTTTC TTGCCGCCAA GGATCTGATG GCGCAGGGGA
1401 TCAAGCTCTG ATCAAGAGAC AGGATGAGGA TCGTTTCGCA TGATTGAACA
1451 AGATGGATTG CACGCAGGTT CTCCGGCCGC TTGGGTGGAG AGGCTATTCG
1501 GCTATGACTG GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CGCCGTGTTC
1551 CGGCTGTCAG CGCAGGGGCG CCCGGTTCTT TTTGTCAAGA CCGACCTGTC
1601 CGGTGCCCTG AATGAACTGC AAGACGAGGC AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG
1651 CCACGACGGG CGTTCCTTGC GCAGCTGTGC TCGACGTTGT CACTGAAGCG
1701 GGAAGGGACT GGCTGCTATT GGGCGAAGTG CCGGGGCAGG ATCTCCTGTC
1751 ATCTCACCTT GCTCCTGCCG AGAAAGTATC CATCATGGCT GATGCAATGC
1801 GGCGGCTGCA TACGCTTGAT CCGGCTACCT GCCCATTCGA CCACCAAGCG
1851 AAACATCGCA TCGAGCGAGC ACGTACTCGG ATGGAAGCCG GTCTTGTCGA
1901 TCAGGATGAT CTGGACGAAG AGCATCAGGG GCTCGCGCCA GCCGAACTGT
1951 TCGCCAGGCT CAAGGCGAGC ATGCCCGACG GCGAGGATCT CGTCGTGACC
2001 CATGGCGATG CCTGCTTGCC GAATATCATG GTGGAAAATG GCCGCTTTTC
2051 TGGATTCATC GACTGTGGCC GGCTGGGTGT GGCGGACCGC TATCAGGACA
2101 TAGCGTTGGC TACCCGTGAT ATTGCTGAAG AGCTTGGCGG CGAATGGGCT
2151 GACCGCTTCC TCGTGCTTTA CGGTATCGCC GCTCCCGATT CGCAGCGCAT
2201 CGCCTTCTAT CGCCTTCTTG ACGAGTTCTT CTGAATTATT AACGCTTACA
2251 ATTTCCTGAT GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTCACAC
2301 CGCATCAGGT GGCACTTTTC GGGGAAATGT GCGCGGAACC CCTATTTGTT
2351 TATTTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG ACAATAACCC
2401 TGATAAATGC TTCAATAATA GCACGTGCTA AAACTTCATT TTTAATTTAA
2451 AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTTGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT
2501 AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTAGA AAAGATCAAA
2551 GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC
2601 AAAAAAACCA CCGCTACCAG CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC
2651 CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT
2701 ACTGTTCTTC TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA AGAACTCTGT
2751 AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG
2801 CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA
2851 CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC
2901 CAGCTTGGAG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC
2951 TATGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG
3001 GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG
3051 AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG
3101 AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GGCGGAGCCT ATGGAAAAAC
3151 GCCAGCAACG CGGCCTTTTT ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT GGCCTTTTGC
3201 TCACATGTTC TT
```

[0254] N-말단 리더 서열은 상기 서열의 뉴클레오티드 1 내지 54로 이루어지고, 나머지 뉴클레오티드는 LEMD1F 항원을 암호화한다.

[0255] **실시예 3**

[0256] **합성 공통 LEMD1AF**

[0257] 합성 공통 LEMD1A 및 합성 공통 LEMD1F의 아미노산 서열 사이에 푸린 절단 부위(RGRKRRS, 서열번호: 10)를 삽입함으로써 다중-항원 작제물, 합성 공통 LEMD1AF를 생성하였다. 일단 합성 공통 LEMD1AF DNA 서열이 수득되면, 더 높은 수준의 발현을 갖기 위해 합성 공통 LEMD1AF의 N-말단 메티오닌을 제거하였고 상류 코작 서열 및 IgE 리더를 N-말단에 첨가하였다. 또한, 이 유전자의 코돈 사용빈도를 *호모 사피엔스* 유전자의 코돈 편향에 적용시켰다. 게다가, RNA 최적화를 또한 수행하였다: 매우 높은(>80%) 또는 매우 낮은(<30%) GC 함량의 영역 및 시스-작용 서열 모티프 예컨대 내부 TATA 박스, 카이-부위 및 리모솜 진입 부위를 피하였다. 공통 LEMD1A 및 공통 LEMD1F 단백질 둘 다에서 N-말단 도메인(아미노산 2-27)이 동일하므로, 합성 공통 LEMD1A의 아미노산 2-27 영역

및 합성 공통 LEMD1F의 아미노산 2-27 영역을 암호화하는 DNA 서열을 상이하게 최적화하여(64.1% 서열 동일성) 플라스미드 안정성을 증가시켰다. 합성 공통 LEMD1AF 작제물의 개략적 표시는 도 7에 제시된다.

[0258] 도 8을 참조하면, 합성된 합성 공통 LEMD1AF를 BamHI 및 XhoI로 소화시키고, 이전 실시예에 기재된 바와 같이 발현 벡터 pGX0001(Inovio Pharmaceuticals) 내로 클로닝하였다. 발현 카세트를 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터의 전사 제어 하에 배치하였다. 생성된 플라스미드는 pGX1433으로 지정하였고 전장 서열을 확인하였다.

[0259] pGX1433은 합성 공통 LEMD1AF 단백질을 암호화하는 DNA 플라스미드이다. 관련된 mRNA 생산은 인간 CMV 프로모터(hCMV 프로모터)에 의해 구동되고 소 성장 호르몬 3' 단부 폴리-아데닐화 신호(bGH polyA)에 의해 종결된다. pGX0001 백본은 카나마이신 내성 유전자(KanR) 및 플라스미드 복제 기점(pUC ori)을 생산 목적으로 포함한다. 이러한 요소는 진핵 세포에서 기능하지 않는다. 표 6은 pGX1433과 관련된 추가적인 정보를 제공한다.

[0260] **표 6**

[0261]

| 요소: | 염기 쌍: |
|---|---|
| hCMV 프로모터: | 137-724 |
| 합성 공통 LEMD1AF 코딩 서열: | 742-1560 |
| bGH PolyA: | 1604-1828 |
| 카나마이신 내성(KanR): | 2001-2795 |
| pUC Ori: | 3094-3767 |

[0262] pGX1433의 아미노산 삽입 서열(서열번호: 6)

[0263]

```
1    MDWTWILFLV AAATRVHSVD VKCLSDCKLQ NQLEKLAFSP GAILPSTRKL
51   AEKKLVQLLV SPPCAPPVMN GPRELDGAQD SDDSEELNII LQGNIILSTE
101  KSKKLKKRPE ASTTKPKAVD TYCLDYKPSK GRRWAARAPS TRITYGTITK
151  ERDYCTEDQT AESWREEGFP VGLKLAVLGI FIIVVFVYLT VENKPLFGRG
201  RKRRSVDVKC LSDCKLQNQL EKLAFSPGAI LRGLQEHQAP ESHMGLSPKR
251  ETTARKTRLL RAGEKKVSQW A
```

[0264] N-말단 리더 서열은 삽입 서열의 아미노산 잔기 1 내지 18로 이루어지고, 아미노산 잔기 19 내지 198 및 206-271은 합성 공통 LEMD1A 및 F 항원이다. 푸린 절단 부위, 아미노산 잔기 199 내지 205는 LEMD1 서열 사이에 존재한다.

[0265] pGX1433의 단일 가닥 DNA 서열(서열번호: 9):

[0266]

```
1    GCTGCTTCGC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA
51   CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
101  ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC
151  GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
201  TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG
251  TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC
301  CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT
351  ACATGACCTT ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
401  ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG
451  ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
501  ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT
551  AACAACTCCG CCCCATTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
601  GGTCTATATA AGCAGAGCTC TCTGGCTAAC TAGAGAACCC ACTGCTTACT
651  GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA AGCTGGCTAG
701  CGTTTAAACT TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCGCCAC CATGGACTGG
751  ACCTGGATTC TGTTCCTGGT GGCAGCAGCA ACCCGCGTGC ATTCCGTCGA
801  TGTGAAGTGT CTGAGTGATT GTAAACTGCA GAACCAGCTG GAGAAGCTGG
851  CCTTTAGCCC TGGAGCAATC CTGCCATCCA CCAGGAAGCT GGCCGAGAAG
901  AAGCTGGTGC AGCTGCTGGT GAGCCCACCT TGCGCACCAC CCGTGATGAA
```

[0267]

```
951  TGGCCCAAGA GAGCTGGACG GCGCCCAGGA TAGCGACGAT TCCGAGGAGC
1001 TGAACATCAT CCTGCAGGGC AATATCATCC TGTCTACCGA GAAGAGCAAG
1051 AAGCTGAAGA AGCGGCCCGA GGCCTCCACC ACAAAGCCTA AGGCCGTGGA
1101 CACATACTGC CTGGATTATA AGCCTTCCAA GGGCCGGAGA TGGGCAGCCA
1151 GGGCCCCATC TACCAGGATC ACATACGGCA CCATCACAAA GGAGCGGGAC
1201 TATTGTACCG AGGATCAGAC AGCCGAGTCT TGGAGAGAGG AGGGATTCCC
1251 AGTGGGCCTG AAGCTGGCCG TGCTGGGCAT CTTCATCATC GTGGTGTTCG
1301 TGTACCTGAC AGTGGAGAAC AAGCCTCTGT TTGGCCGGGG CAGAAAGAGG
1351 CGCTCTGTGG ATGTAAAATG CCTATCGGAC TGCAAGTTGC AAAATCAATT
1401 AGAAAAATTG GCCTTCTCCC CAGGGGCGAT ATTGAGGGGC CTGCAGGAGC
1451 ACCAGGCACC AGAGTCCCAC ATGGGCCTGT CTCCCAAGCG CGAGACAACC
1501 GCAAGAAAAA CAAGGCTGCT GAGGGCTGGG GAAAAGAAAG TGTCACAGTG
1551 GGCATGATAA CTCGAGTCTA GAGGGCCCGT TTAAACCCGC TGATCAGCCT
1601 CGACTGTGCC TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG
1651 CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA
1701 TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG GTGTCATTCT ATTCTGGGGG
1751 GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA CAATAGCAGG
1801 CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGCT TCTACTGGGC GGTTTTATGG
1851 ACAGCAAGCG AACCGGAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG GTAAGGTTGG
1901 GAAGCCCTGC AAAGTAAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA AGGATCTGAT
1951 GGCGCAGGGG ATCAAGCTCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG ATCGTTTCGC
2001 ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG CTTGGGTGGA
2051 GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC TGCTCTGATG
2101 CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT TTTTGTCAAG
2151 ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAAGACGAGG CAGCGCGGCT
2201 ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG CTCGACGTTG
2251 TCACTGAAGC GGGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT GCCGGGGCAG
2301 GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT CCATCATGGC
2351 TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC TGCCCATTCG
2401 ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG GATGGAAGCC
2451 GGTCTTGTCG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG GGCTCGCGCC
2501 AGCCGAACTG TTCGCCAGGC TCAAGGCGAG CATGCCCGAC GGCGAGGATC
2551 TCGTCGTGAC CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT GGTGGAAAAT
2601 GGCCGCTTTT CTGGATTCAT CGACTGTGGC CGGCTGGGTG TGGCGGACCG
2651 CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA TATTGCTGAA GAGCTTGGCG
2701 GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC CGCTCCCGAT
2751 TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCTT GACGAGTTCT TCTGAATTAT
2801 TAACGCTTAC AATTTCCTGA TGCGGTATTT TCTCCTTACG CATCTGTGCG
2851 GTATTTCACA CCGCATCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCGCGGAAC
2901 CCCTATTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA
2951 GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT AGCACGTGCT AAAACTTCAT
3001 TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC
3051 CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG
3101 AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC
3151 TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA
3201 TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC
3251 AGATACCAAA TACTGTTCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC
3301 AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC
```

[0268]

```
3351 AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA
3401 GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG
3451 TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT
3501 ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG
3551 ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG
3601 CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA
3651 CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC
3701 TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC
3751 TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTT
```

[0269] N-말단 리더 서열은 상기 서열의 뉴클레오티드 1 내지 54로 이루어지고, 뉴클레오티드 55 내지 594 및 616 내지 819는 LEMD1AF 항원 작제물을 암호화한다. 뉴클레오티드 595 내지 615는 푸린 결합 부위를 암호화한다.

[0270] **실시예 4**

[0271] ***시험관내* 항원 발현**

[0272] pGX1431, pGX1432, 및 pGX1433에 의한 항원 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅(Western bloting)에 의해 확인하였다. 10% FBS(ThermoFisher)를 함유하는 DMEM 배지에서 유지된 인간 횡문근육종(RD) 세포(ATCC, CCL-136)를 터보펙틴 8(Turbofectin 8)(Origene)을 사용하여 pGX1431, pGX1432, pGX1433 또는 pGX0001(6 μg/10cm$^2$ 디시)로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 세포를 RIPA 세포 용해 완충액(ThermoFisher)을 사용하여 용해시켰고 세포 용해물을 수집하였다. 총 단백질 농도를 결정하기 위한 BCA 검정(ThermoFisher) 후, 15 μg의 세포 용해물을 4-12% SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동하였고 검출을 항-LEMD1 모노클로날 항체(Abeam, 클론 ab201206)로 수행한 다음 ECL 웨스턴 블롯 분석 시스템(GE Amersham)을 사용하여 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)-접합된 항-토끼 IgG(Santa Cruz Biotech, SC-2004)로 시각화하였다. 로딩 대조군으로서, 항-β-액틴 모노클로날 항체(Santa Cruz Biotech, 클론, C4)를 사용하여 액틴 발현에 대해 블롯을 재프로빙하였다.

[0273] 합성 공통 LEMD1A(pGX1431) 및 합성 공통 LEMD1AF(pGX1433) 작제물에 대해 예상된 분자량의 단백질 밴드가 검출되었지만, 합성 공통 LEMD1F(pGX1432) 작제물에 대해 밴드는 검출되지 않았다(도 9). LEMD1F 항원은 AF 항원에 대해 예상된 분자량으로 검출되었기 때문에 LEMD1AF 항원의 일부로서 발현된 것으로 추론할 수 있다. pGX0001

레인에서 단백질 밴드는 검출되지 않았다. 항-β-액틴 밴드는 동일한 양의 단백질이 각각의 레인에 로딩되었음을 나타내는 유사한 강도로 검출되었다. 요약하면, pGX1431 및 pGX1433은 각각의 항원 단백질을 발현하는 것으로 밝혀졌다.

[0274] **실시예 5**

[0275] **합성 공통 LEMD1 백신 작제물의 면역원성**

[0276] **재료 및 방법**

[0277] **동물 및 면역화**

[0278] 암컷, 8주령 CB6F1 마우스를 Jackson Laboratories로부터 구입하였다. 모든 동물은 BTS Research(캘리포니아주 샌디에이고 소재)의 온도-제어된 명-주기화 시설에서 사육하였다. 동물 관리는 국립보건원(National Institutes of Health)의 지침 및 동물 관리 및 사용 제안(ACUP)(BTS ACUP #15-091)에 따라 수행하였다. 마우스를 표 1에 상세히 나타낸 바와 같이 10개 그룹으로 나누었다.

[0279] **표 7**

[0280]

| 그룹 | n | 작제물 | 작제물 용량(μg) | 주사 부피(μL) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | pGX0001 | 30 | 30 |
| 2 | 8 | pGX1431 | 10 | 30 |
| 3 | 8 | pGX1431 | 30 | 30 |
| 4 | 8 | pGX1431 | 50 | 30 |
| 5 | 8 | pGX1432 | 10 | 30 |
| 6 | 8 | pGX1432 | 30 | 30 |
| 7 | 8 | pGX1432 | 50 | 30 |
| 8 | 8 | pGX1433 | 10 | 30 |
| 9 | 8 | pGX1433 | 30 | 30 |
| 10 | 8 | pGX1433 | 50 | 30 |

[0281] 면역화된 그룹의 마우스를 pGX0001, pGX1431, pGX1432, 또는 pGX1433의 지시된 용량으로 백신접종하였다. 간단히, 지시된 용량이 30 μL 주사 부피로 전경골근 내로 근육내 주사에 의해 전달되도록 플라스미드를 주사용 멸균수(VetOne)로 제형화하였다. 각각의 근육내 주사 직후 3P 어레이가 장착된 CELLECTRA® 2000 적응성 정전류 전기천공법 장치(Inovio Pharmaceuticals)를 사용하여 전기천공법(EP)을 수행하였다. 장치는 1초 지연 간격으로, 52 ms 펄스 폭의 2개의 0.1 Amp 펄스를 전달하도록 구성되었다. 마우스는 3주 간격으로, 3회 면역화를 받았다. 마우스를 마지막 면역화 1주 후에 희생시키고 세포 면역 판독을 위해 비장을 수거하였다. 다른 조직은 수집하지 않았다.

[0282] **비장 림프구 단리**

[0283] 비장세포를 무균적으로 단리하고 5 mL의 R10 배지(10% 태아 소 혈청 및 1% 항생제-항진균제로 보충된 Rosewell Park Memorial Institute 배지 1640)에 넣었다. 비장세포를 스토마커(Stomacher) 기계(Seward Laboratory Systems Inc.)를 사용하여 비장의 기계적 분해에 의해 단리하였고, 생성된 생성물을 40-μm 세포 여과기(BD Falcon)를 사용하여 여과하였다. 생성된 생성물을 원심분리하였고 펠릿을 RBC의 용해를 위해 ACK 용해 완충액(Lonza)으로 5분 동안 처리하였다. 이어서 비장세포를 원심분리하고, PBS로 세척한 다음, R10 배지에 재현탁하고 추가 분석에 즉시 사용하였다.

[0284] **IFNγ ELISpot**

[0285] 항원-특이적 세포 반응을 평가하기 위해 마우스 IFNγ ELISpot 검정(MabTech)을 수행하였다. 간단히, 항-마우스 IFNγ 항체로 미리 코팅된 96 웰 플레이트를 PBS로 세척하고 완전 배양 매질 배지(10% FBS 및 항생제로 보충된 RPMI 1640)로 실온에서 2시간 동안 차단하였다. 비장 림프구를 R10 배지에 재현탁한 다음 (웰 당 2 x $10^5$개 세포의 입력 세포 수로 삼중으로 첨가하였다. 전체 합성 공통 LEMD1 단백질 서열을 나타내는 9개 아미노산에 의해 중첩되는 15개의 아미노산 잔기를 각각 함유하는 펩티드의 세트를 합성하였다(GenScript). 이들 펩티드의 세트를 DMSO(Sigma)에 재현탁하고 ~ 2 μg/ml 펩티드의 농도로 2개의 펩티드 풀로 풀링하였다. 1개의 펩티드 풀은 합성 공통 LEMD1A 항원 단백질에 상응하는 펩티드를 함유하고 제2 펩티드 풀은 합성 공통 LEMD1F 항원 단백질에 상응하는 펩티드를 함유하였다. 5μg/ml의 콘카발린 A(Sigma)를 양성 대조군으로서 사용하였고 완전 배양 배지를 음성 대조군으로서 사용하였다. 플레이트를 5% CO2 대기 인큐베이터에서 37℃에서 18시간 동안 인큐

베이션하였다. 이어서, 비오티닐화된 항-마우스 IFNγ 검출 항체(MabTech)를 첨가하였고, 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하였고, 스트렙타비딘(Streptavidin)-ALP 항체(MabTech)를 첨가하고 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 키트 제조업체의 설명서(MabTech)에 따라 스폿 검출을 완료하였다. 플레이트 상의 스폿을 자동 ELISPOT 판독기(Cellular Technology)를 사용하여 카운팅하였다. 데이터 표시를 위해 스폿 형성 단위(SFU)의 평균 수를 1 x $10^6$개 비장세포로 조정하였다.

[0286] IFNγ ELISpot에 의한 항원 특이적 반응은 배지 단독 대조군에서 SFU보다 더 큰 1 x $10^6$개 비장세포 당 IFNγ 스폿 형성 단위(SFU)의 수로 보고된다.

[0287] **유동 세포분석**

[0288] 합성 공통 LEMD1에 의해 유도된 세포성 면역 반응을 유동 세포분석에 의해 추가로 특징화하였다. 간단히, 백신접종된 마우스 및 미접촉(naive) 마우스로부터의 2 x $10^6$개 비장세포를 브레펠딘 A(Brefeldin A)(BD Biosciences), 모넨신(Monensin)(BD Biosciences), 및 FITC 항-마우스 CD107a 항체(BD Biosciences)의 존재 하에 6시간 동안 각각의 그룹에 대해 적절한 합성 공통 LEMD1 펩티드로 단리 후 즉시 자극하였다. 펩티드로 자극 후, 비장세포를 스핀 다운시키고 마우스 BD Fc Block(BD Biosciences) 용액의 웰 당 20 μL에 재현탁하였다. Fc Block은 PBS에서 1:40의 초기 희석으로 사용하고 4℃에서 5분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 남아있는 세포외 항체(PBS 중)를 웰 당 30 μL로 첨가하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포외 염색의 첨가 시, 각각의 웰의 최종 부피는 50 μL이며, 1:100의 최종 희석에서 Fc Block 및 그들의 적절한 작동 희석에서 세포외 항체로 이루어진다. 이어서 세포를 생존력 염료(Vivid V450, Thermo-Fisher) 및 다음의 세포외 항체로 염색하였다: PerCP-Cy5.5 항-마우스 CD4(BD Biosciences, 클론 RM4-5) 및 APC 항-마우스 CD8a(BD Biosciences, 클론 63-6.7). 세포를 4℃에서 20분 동안 고정시키고 투과화하였다(BD Biosciences, #554714). 후속적으로 다음의 항체로 세포내 염색을 완료하였다: APC-Cy7 항-마우스 CD3e(BD Biosciences, 클론 145-2C11), BV605 항-마우스 IFNγ(BD Biosciences, 클론 XMG1.2), APC-R700 항-마우스 IL-2(BD Biosciences, 클론 JEs6-5H4), 및 PE 항-마우스 TNF-α(BD Biosciences, 클론 MP6-XT22). ICS 데이터를 10-색 FACS CANTO(BD Biosciences) 상에서 수집하였고 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석을 완료하였다. 유동 세포분석 게이팅 전략은 하기 도 10에 제시된다.

[0289] 세포가 유동 세포분석에 의해 항원 특이적이라고 명명되기 위해서는, 보고된 파라미터의 빈도가 배지-단독 대조군의 빈도를 초과해야 한다. 세포가 항원 특이적 CD107a를 생산하는 것으로 확인되기 위해서는, 세포가 또한 부울(Boolean) 게이팅에 의해 확인된 바와 같이 IFNγ, 및/또는 IL-2 및/또는 TNFα의 항원 특이적 생산에 대해 양성으로 확인되어야 한다.

[0290] **통계 분석**

[0291] IBM SPSS Statistics 22(IBM Corporation)를 사용하여 통계 분석을 완료하였다. 그룹 사이의 분석은 다중 비교를 조정하기 위해 사후 Tukey's Honest Significant Difference(HSD)와 함께 AVOVA를 사용하여 수행하였다. 분산의 동질성은 다중 비교 전에 F 통계를 수행하여 확인하였다. 모든 통계 분석에 대해, 0.050의 p-값을 유의한 것으로 간주하였다.

[0292] **결과**

[0293] **IFNγ ELISpot**

[0294] 3개의 합성 공통 LEMD1 작제물의 면역원성을 IFNγ ELISpot 및 유동 세포분석(n=8/그룹)에 의해 3가지 용량(10 μg, 30 μg, 및 50 μg)으로 평가하였다. 마우스를 음성 대조군(n=4/그룹)으로서 빈 플라스미드 백본(pGX0001)으로 면역화하였다. 합성 공통 LEMD1A로의 백신접종은 음성 대조군 백신접종된 마우스와 비교하여 유의한 IFNγ 반응을 초래하였다. 30 μg 투여량에서 달성된 최대 평균 반응을 갖는 합성 공통 LEMD1A(도 11a)에 의해 유도된 IFNγ 생산에서 용량 의존적 증가에 대한 증거가 있었다. 구체적으로, 합성 공통 LEMD1A IFNγ SFU는 10 μg, 30 μg, 및 50 μg에서 각각 646 ± 373, 1,683 ± 1248, 및 1,645 ± 1002였다. 합성 공통 LEMD1A IFNγ 반응은 30 μg(p=0.024) 및 50 μg(p=0.028) 투여량의 pGX1431에서 미접촉(3 ± 4)보다 유의하게 더 컸지만, 10 μg 투여량(p=0.642)에서는 그렇지 않았다. 합성 공통 LEMD1F로의 백신접종은 투여량 증가에 따른 용량-의존적 증가에 대한 증거 없이 최소 IFNγ 반응을 초래하였다(도 11b). LEMD1F IFNγ SFU는 10 μg, 30 μg, 및 50 μg에서 각각 163 ± 382, 88 ± 109, 및 140 ± 246이었다. 합성 공통 LEMD1F IFNγ 반응은 임의의 투여량의 pGX1432에서 미접촉(3 ± 4)보다 유의하게 더 크지 않았다. 합성 공통 LEMD1AF로의 백신접종

은 음성 대조군 백신접종된 마우스와 비교하여 유의한 IFNɣ 반응을 초래하였다. 50 μg 투여량에서 달성된 최대 평균 반응을 갖는 합성 공통 LEMD1AF(도 11c)에 의해 유도된 IFNɣ 생산에서 용량 의존적 증가에 대한 증거가 있었다. 구체적으로, 합성 공통 LEMD1AF IFNɣ SFU는 10 μg, 30 μg, 및 50 μg에서 각각 478 ± 269, 779 ± 392, 및 879 ± 552였다. 합성 공통 LEMD1AF IFNɣ 반응은 30 μg(p=0.018) 및 50 μg(p=0.007) 투여량의 pGX1433에서 미접촉(3 ± 4)보다 유의하게 더 컸지만, 10 μg 투여량(p=0.227)에서는 그렇지 않았다. IFNɣ 반응은 표 8에 요약된다.

[0295] **표 8: pGX1431, pGX1432, 및 pGX1433에 의해 유도된 IFNɣ 반응**

| 합성 공통 LEMD1A (pGX1431) | | | |
|---|---|---|---|
| 작제물 | 용량 | 평균 SFU ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 3 ± 4 | n/a |
| pGX1431 | 10 μg | 646 ± 373 | 0.642 |
| | 30 μg | 1,683 ± 1248 | 0.024 |
| | 50 μg | 1,645 ± 1002 | 0.028 |

| 합성 공통 LEMD1AF (pGX1433) | | | |
|---|---|---|---|
| 작제물 | 용량 | 평균 SFU ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 3 ± 4 | n/a |
| pGX1433 | 10 μg | 478 ± 269 | 0.227 |
| | 30 μg | 779± 392 | 0.018 |
| | 50 μg | 879 ± 552 | 0.007 |

| 합성 공통 LEMD1F (pGX1432) | | | |
|---|---|---|---|
| 작제물 | 용량 | 평균 SFU ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 3 ± 4 | n/a |
| pGX1432 | 10 μg | 163 ± 382 | n/a |
| | 30 μg | 88 ± 109 | n/a |
| | 50 μg | 140 ± 246 | n/a |

[0296]

[0297] 보고된 p-값은 미접촉(pGX0001 면역화된 마우스)에 상대적이다. p≤0.05에서 추정된 유의성.

[0298] 합성 공통 LEMD1A는 50 μg 투여량(1.34% ± 0.58%)(p<0.005)에서 미접촉(0.04% ± 0.03%)보다 유의하게 더 강력하지만 10 μg(0.50% ± 0.170%)(p<0.004) 또는 30 μg(1.02% ± 0.57%)(p<0.122) 투여량 그룹에서는 그렇지 않은 항원 특이적 CD4+ T 세포 반응의 빈도를 유도하였다(도 12a). 합성 공통 LEMD1A 특이적 CD4+ T 세포 반응은 용량-의존적이고 주로 IFNɣ+IL-2+TNFα+ IFNɣ+IL-2-TNFα+, 또는 IFNɣ+IL-2-TNFα- 생산 CD4+ T 세포로 이루어졌다(도 12e).

[0299] 합성 공통 LEMD1F는 미접촉(0.06% ± 0.02%)보다 최소로 더 큰 항원 특이적 CD4+ T 세포 반응의 빈도를 유도하였다. 구체적으로, pGX1432는 10 μg 투여량(0.27% ± 0.34%), 30 μg(0.24% ± 0.10%) 및 50 μg(0.20% ± 0.20%) 투여량 그룹에서 비-유의한 반응을 유도하였다(도 12b). 합성 공통 LEMD1F 특이적 CD4+ T 세포 반응은 용량-의존적이고 주로 IFNɣ+IL-2+TNFα+, IFNɣ+IL-2+TNFα-, IFNɣ+IL-2-TNFα+, IFNɣ-IL-2-TNFα+ 또는 IFNɣ+IL-2-TNFα- 생산 CD4+ T 세포로 이루어졌다(도 12e).

[0300] 합성 공통 LEMD1AF는 50 μg 투여량(0.80% ± 0.51%)(p<0.006)에서 미접촉(0.09% ± 0.03%)보다 유의하게 더 강력하지만 10 μg(0.53% ± 0.19%)(p<0.135) 또는 30 μg(0.50% ± 0.20%)(p<0.176) 투여량 그룹에서는 그렇지 않은 항원 특이적 CD4+ T 세포 반응의 빈도를 유도하였다(도 12c). 합성 공통 LEMD1AF 특이적 CD4+ T 세포 반응은 용량-독립적이고 주로 IFNɣ+IL-2+TNFα+ IFNɣ+IL-2-TNFα+, IFNɣ+IL-2-TNFα- 또는 IFNɣ-IL-2- TNFα+ 생산 CD4+ T 세포로 이루어졌다(도 12e).

[0301] 항원 특이적 CD4+ T 세포의 빈도는 표 9에 추가로 기술된다.

[0302] 합성 공통 LEMD1 작제물의 모든 투여량은 미접촉보다 약간 더 큰 CD4+CD107a+ T 세포의 빈도를 유도했지만 가장 높은 투여량에서 pGX1431 작제물만이 유의하게 보다 강력하였다.

[0303] 구체적으로, pGX1431 항원 특이적 CD4+CD107a+ T 세포의 빈도는 10 μg(p=0.532), 30 μg(p=0.314), 및 50 μg(p=0.002) 투여량 그룹에서 각각 0.17% ± 0.09%, 0.34% ± 0.19%, 및 0.50% ± 0.30%였다(도 13a). pGX1431 특이적 CD4+CD107a+ T 세포의 사이토카인 프로파일은 투여량 그룹에 걸쳐 유사하였고 주로 IFNɣ+IL-2+TNFα+, IFNɣ+IL-2-TNFα+, 및 IFNɣ+IL-2-TNFα- 세포로 구성되었다(도 13e).

[0304] pGX1432 항원 특이적 CD4+CD107a+ T 세포의 빈도는 10 μg, 30 μg, 및 50 μg 투여량 그룹에서 각각 0.10% ± 0.14%, 0.11% ± 0.08%, 및 0.04% ± 0.03%였다(도 13b). pGX1432 특이적 CD4+CD107a+ T 세포의 사이토카인 프로파일은 10 μg 및 30 μg 투여량 그룹에서 유사하였고 주로 IFNɣ+IL-2+TNFα+, IFNɣ+IL-2+TNFα-, 및 IFNɣ+IL-2-TNFα- 세포로 구성된 반면 50 μg 투여량에서 사이토카인 프로파일은 주로 IFNɣ+IL-2+TNFα+, IFNɣ+IL-2-TNFα+, 및 IFNɣ+IL-2-TNFα- 세포로 구성되었다(도 13e).

[0305] pGX1433 항원 특이적 CD4+CD107a+ T 세포의 빈도는 10 μg(p=0.365), 30 μg(p=0.992), 및 50 μg(p=0.109) 투여량 그룹에서 각각 0.20% ± 0.10%, 0.17% ± 0.10%, 및 0.39% ± 0.31%였다(도 13c). pGX1433 특이적 CD4+CD107a+ T 세포의 사이토카인 프로파일은 10 μg 및 30 μg 투여량 그룹에서 유사하였고 일부 IFNɣ+IL-2-TNFα+ 및 IFNɣ+IL-2-TNFα- 세포와 대부분 IFNɣ+IL-2+TNFα+로 구성된 반면 50 μg 투여량 그룹은 IFNɣ+IL-2+TNFα+, IFNɣ+IL-2+TNFα-, 및 IFNɣ+IL-2- TNFα+와 주로 IFNɣ+IL-2-TNFα-로 구성되었다(도 13e).

[0306] 항원 특이적 CD4+CD107+ T 세포의 빈도는 표 9에 추가로 기술된다.

[0307] **표 9:**

[0308]

| 합성 공통 LEMD1A(pGX1431) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 작제물 | 용량 | %CD4⁺ ± Std. Dev. | p-값 | %CD4⁺CD107a⁺ ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 0.04 ± 0.03 | n/a | 0.00 ± 0.00 | n/a |
| pGX1431 | 10 μg | 0.50 ± 0.17 | 0.346 | 0.17 ± 0.09 | 0.532 |
| | 30 μg | 1.02 ± 0.57 | 0.122 | 0.34 ± 0.19 | 0.314 |
| | 50 μg | 1.34 ± 0.58 | 0.005 | 0.50 ± 0.30 | 0.002 |
| 합성 공통 LEMD1F(pGX1432) | | | | | |
| 작제물 | 용량 | %CD4⁺ ± Std. Dev. | p-값 | %CD4⁺CD107a⁺ ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 0.06 ± 0.02 | n/a | 0.01 ± 0.00 | n/a |
| pGX1432 | 10 μg | 0.27 ± 0.34 | n/a | 0.10 ± 0.14 | n/a |
| | 30 μg | 0.24 ± 0.10 | n/a | 0.11 ± 0.08 | n/a |
| | 50 μg | 0.20 ± 0.20 | n/a | 0.04 ± 0.03 | n/a |
| 합성 공통 LEMD1AF(pGX1433) | | | | | |
| 작제물 | 용량 | %CD4⁺ ± Std. Dev. | p-값 | %CD4⁺CD107a⁺ ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 0.09 ± 0.03 | n/a | 0.01 ± 0.01 | n/a |
| pGX1433 | 10 μg | 0.53 ± 0.19 | 0.135 | 0.20 ± 0.10 | 0.365 |
| | 30 μg | 0.50 ± 0.20 | 0.176 | 0.17 ± 0.10 | 0.992 |
| | 50 μg | 0.80 ± 0.51 | 0.006 | 0.39 ± 0.31 | 0.109 |

[0309] 보고된 p-값은 미접촉(pGX0001 면역화 마우스)에 상대적이다. p≤0.05에서 추정된 유의성.

[0310] 합성 공통 LEMD1A는 미접촉(0.08% ± 0.01%)보다 더 강력하지만 10 μg(1.46% ± 0.79%), 30 μg(2.34% ± 1.47%), 및 50 μg(2.12% ± 1.897%) 투여량 그룹에서 유의하지 않은 항원 특이적 CD8+ T 세포 반응의 빈도를 유도하였다(도 14a). 합성 공통 LEMD1A 특이적 CD8+ T 세포 반응은 용량-독립적이고 주로 IFNɣ+IL-2-TNFα- 및 일부 IFNɣ+IL-2-TNFα+ 생산 CD8+ T 세포로 이루어졌다(도 14e).

[0311] 합성 공통 LEMD1F는 미접촉(0.09% ± 0.05%)보다 더 크지 않은 항원 특이적 CD8+ T 세포 반응의 빈도를 유도하였다. 구체적으로, pGX1432는 10 μg 투여량(0.09% ± 0.04%), 30 μg(0.07% ± 0.05%) 및 50 μg(0.17% ± 0.07%) 투여량 그룹에서 유의하지 않은 반응을 유도하였다(도 14b). 합성 공통 LEMD1F 특이적 CD8+ T 세포 반응은 용량-독립적이고 주로 IFNɣ-IL-2+-TNFα-, IFNɣ-IL-2-TNFα+, 및 IFNɣ+IL-2-TNFα- 생산 CD8+ T 세포로 이루어졌다(도 14e).

[0312] 합성 공통 LEMD1AF는 50 μg 투여량(1.73% ± 1.40%)(p=0.046)에서 미접촉(0.17% ± 0.043%) 보다 유의하게 더 강력하지만 10 μg(0.72% ± 0.36%)(p=0.061) 또는 30 μg(1.65% ± 0.86%)(p=0.061) 투여량 그룹에서 그렇지 않은 항원 특이적 CD8+ T 세포 반응의 빈도를 유도하였다(도 14c). 합성 공통 LEMD1AF 특이적 CD8+ T 세포 반응은 용량-의존적이고 주로 IFNɣ+IL-2-TNFα- 및 일부 IFNɣ+IL-2-TNFα+ 및 IFNɣ-IL-2+-TNFα- 생산 CD 8+ T 세포로 이루어졌다(도 14e).

[0313] 항원 특이적 CD8+ T 세포의 빈도는 표 10에 추가로 기술된다.

[0314] 표 10

| 합성 공통 LEMD1A(pGX1431) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 작제물 | 용량 | %CD8⁺ ± Std. Dev. | p-값 | %CD8⁺CD107a⁺ ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 0.08 ± 0.01 | n/a | 0.03 ± 0.03 | n/a |
| pGX1431 | 10 μg | 1.46 ± 0.79 | n/a | 1.37 ± 0.78 | n/a |
| | 30 μg | 2.34 ± 1.47 | n/a | 2.23 ± 1.45 | n/a |
| | 50 μg | 2.12 ± 1.89 | n/a | 1.97 ± 1.84 | n/a |
| 합성 공통 LEMD1F(pGX1432) | | | | | |
| 작제물 | 용량 | %CD8⁺ ± Std. Dev. | p-값 | %CD8⁺CD107a⁺ ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 0.09 ± 0.05 | n/a | 0.04 ± 0.02 | n/a |
| pGX1432 | 10 μg | 0.09 ± 0.04 | n/a | 0.02 ± 0.02 | n/a |
| | 30 μg | 0.07 ± 0.05 | n/a | 0.05 ± 0.04 | n/a |
| | 50 μg | 0.17 ± 0.07 | n/a | 0.04 ± 0.03 | n/a |
| 합성 공통 LEMD1AF(pGX1433) | | | | | |
| 작제물 | 용량 | %CD8⁺ ± Std. Dev. | p-값 | %CD8⁺CD107a⁺ ± Std. Dev. | p-값 |
| pGX0001 | 30 μg | 0.17 ± 0.04 | n/a | 0.07 ± 0.01 | n/a |
| pGX1433 | 10 μg | 0.72 ± 0.36 | 0.760 | 0.54 ± 0.39 | 0.897 |
| | 30 μg | 1.65 ± 0.86 | 0.061 | 1.43 ± 1.39 | 0.089 |
| | 50 μg | 1.73 ± 1.40 | 0.046 | 1.57 ± 1.39 | 0.053 |

[0315]

[0316] 보고된 p-값은 미접촉(pGX0001 면역화된 마우스)에 상대적이다. $p \leq 0.05$에서 추정된 유의성.

[0317] pGX1432가 아닌, 합성 공통 LEMD1 작제물 pGX1431 및 pGX1433은 미접촉보다 더 크지만 임의의 투여량에서 유의하지 않은 CD8+CD107a+ T 세포의 빈도를 유도하였다.

[0318] 구체적으로, pGX1431 항원 특이적 CD8+CD107a+ T 세포의 빈도는 10 μg, 30 μg, 및 50 μg 투여량 그룹에서 각각 1.37% ± 0.78%, 2.23% ± 1.45%, 및 1.97% ± 1.84%였다(도 15a). pGX1431 특이적 CD8+CD107a+ T 세포의 사이토카인 프로파일은 투여량 그룹에 걸쳐 유사하였고 주로 IFNγ+IL-2-TNFα- 및 일부 IFNγ+IL-2-TNFα+ 세포로 구성되었다(도 15e).

[0319] pGX1432 항원 특이적 CD8+CD107a+ T 세포의 빈도는 10 μg, 30 μg, 및 50 μg 투여량 그룹에서 각각 0.02% ± 0.02%, 0.05% ± 0.04%, 및 0.04% ± 0.03%였다(도 15b). pGX1432 특이적 CD8+CD107a+ T 세포의 사이토카인 프로파일은 주로 IFNγ+IL-2-TNFα-, IFNγ-IL-2+TNFα-, 및 IFNγ+IL-2+TNFα- 세포로 구성되었다(도 15e).

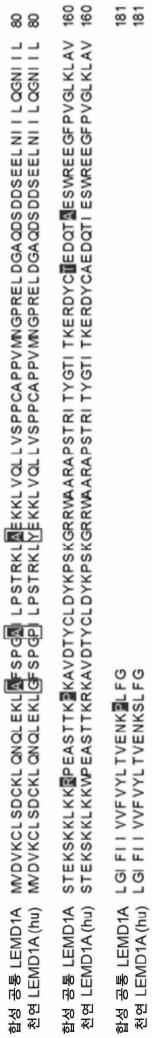
[0320] pGX1433 항원 특이적 CD8+CD107a+ T 세포의 빈도는 10 μg(p=0.897), 30 μg(p=0.089), 및 50 μg(p=0.053) 투여량 그룹에서 각각 0.54% ± 0.36%, 1.43% ± 1.39%, 및 1.57% ± 1.39%였다(도 15c). pGX1433 특이적 CD8+CD107a+ T 세포의 사이토카인 프로파일은 대부분 IFNγ+IL-2-TNFα- 및 일부 IFNγ+IL-2-TNFα+ 세포로 구성되었다(도 15e).

[0321] 상기 상세한 설명 및 첨부된 실시예는 단지 예시적인 것이며 첨부된 청구범위 및 그들의 등가물에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않음이 이해된다.

[0322] 개시된 구현예에 대한 다양한 변화 및 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 비제한적으로 본 발명의 화학적 구조, 치환기, 유도체, 중간체, 합성물, 조성물, 제형, 또는 사용 방법과 관련된 것들을 포함하여, 개시된 구현예의 이러한 변화 및 변형은 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다.

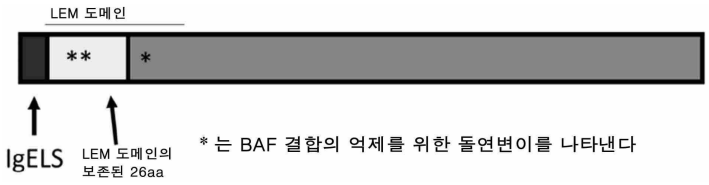
## 도면

### 도면1a

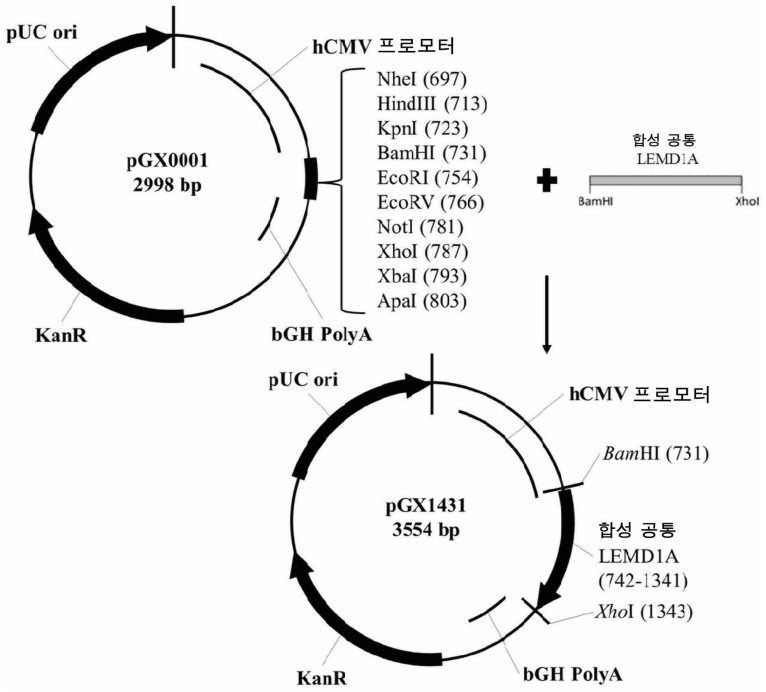



### 도면1b

### 도면2



도면3


pUC ori
hCMV 프로모터
NheI (697)
HindIII (713)
KpnI (723)
BamHI (731)
EcoRI (754)
EcoRV (766)
NotI (781)
XhoI (787)
XbaI (793)
ApaI (803)
pGX0001
2998 bp
KanR
bGH PolyA
합성 공통
LEMD1A
BamHI
XhoI
pUC ori
hCMV 프로모터
BamHI (731)
pGX1431
3554 bp
합성 공통
LEMD1A
(742-1341)
XhoI (1343)
KanR
bGH PolyA

도면4a

합성 공통 LEMD1F MVDVKCLSDCKLQNQLEKLCFSPQPLLRGLQEHQAPESHMGLSPKRETTARKTRLSRAGEKKVSQWA
천연 LEMD1F (hu) MVDVKCLSDCKLQNQLEKLCFSPQPLLRGLQEHQAPESHMGLSPKRETTARKTRLSRAGEKKVSQWA

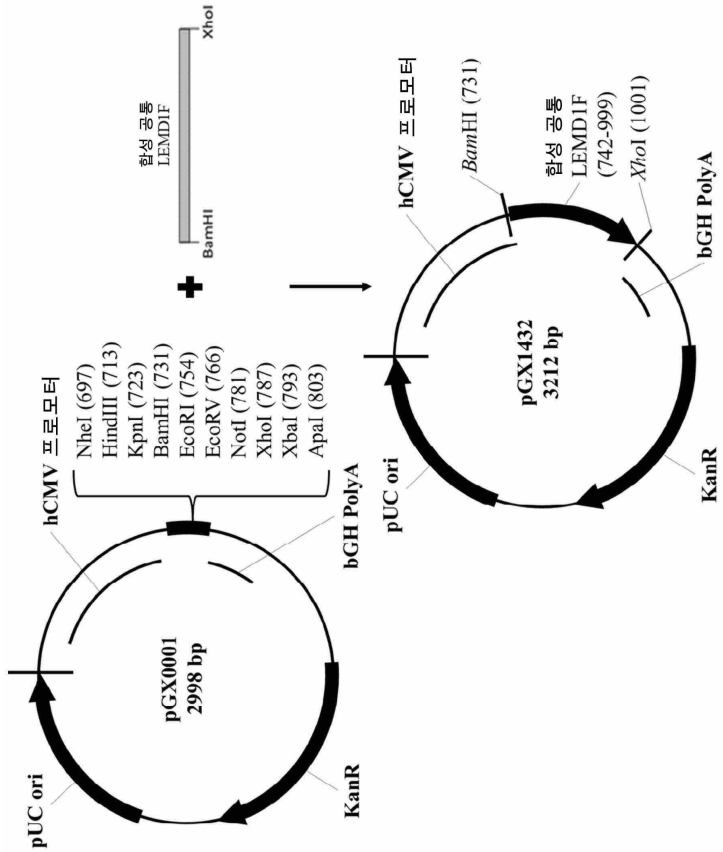
도면4b

동일성 퍼센트
발산
1
2
95.5
4.6
합성 공통 LEMD1F
천연 LEMD1F (hu)

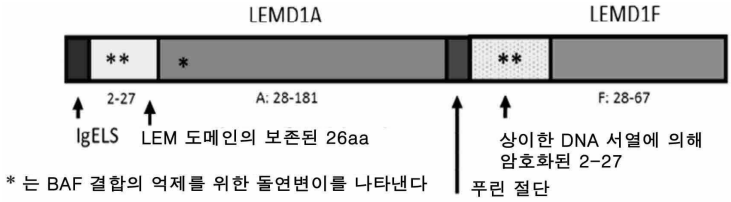
도면5

LEM 도메인
**
IgELS
LEM 도메인의
보존된 26aa
* 는 BAF 결합을 위한 돌연변이를
나타낸다

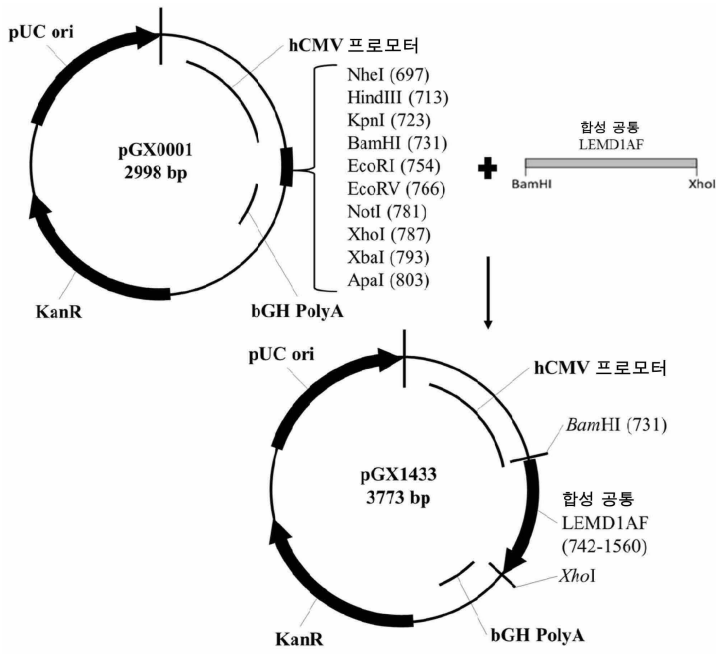
도면6


합성 공통
LEMD1F
XhoI
BamHI
hCMV 프로모터
NheI (697)
HindIII (713)
KpnI (723)
BamHI (731)
EcoRI (754)
EcoRV (766)
NotI (781)
XhoI (787)
XbaI (793)
ApaI (803)
bGH PolyA
pUC ori
KanR
pGX0001
2998 bp
pGX1432
3212 bp
BamHI (731)
합성 공통
LEMD1F
(742-999)
XhoI (1001)

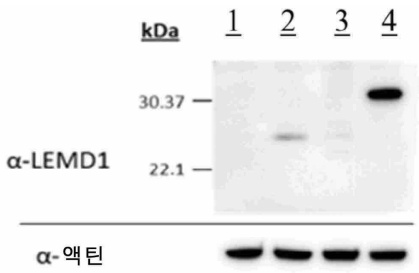
도면7




도면8

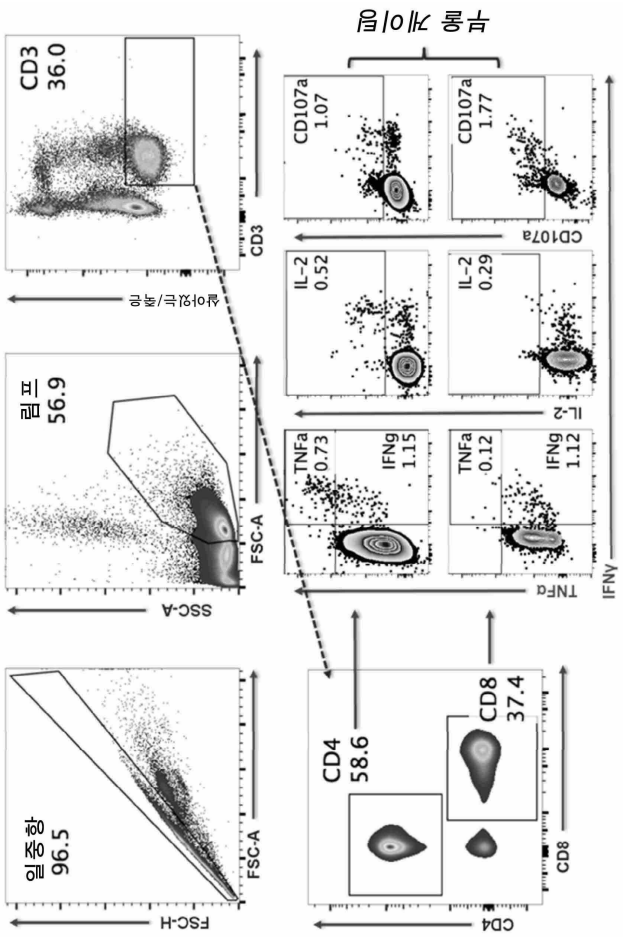



도면9

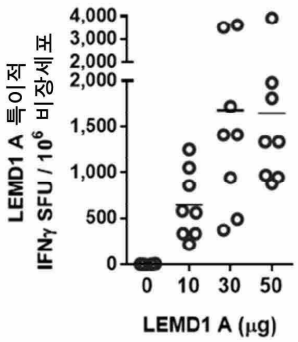



1 = pGX0001
2 = 합성 공통 LEMDA1
3 = 합성 공통 LEMDF1
4 = 합성 공통 LEMDAF1

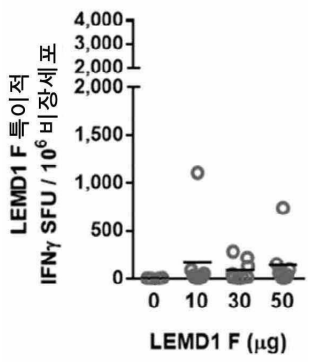
도면10


CD3
36.0
CD3
실이있는/죽은
림프
56.9
FSC-A
SSC-A
일중항
96.5
FSC-A
FSC-H
CD107a
1.07
CD107a
1.77
CD107a
IL-2
0.52
IL-2
0.29
IL-2
TNFa
0.73
IFNg
1.15
TNFa
0.12
IFNg
1.12
TNFα
IFNγ
CD4
58.6
CD8
37.4
CD8
CD4

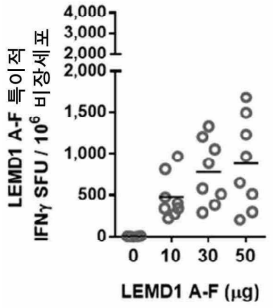
도면11a


LEMD1 A 특이적
IFNγ SFU / 10^6 비장세포
4,000
3,000
2,000
2,000
1,500
1,000
500
0
0
10
30
50
LEMD1 A (μg)

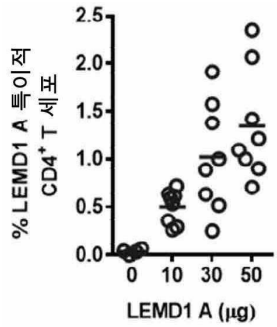
도면11b



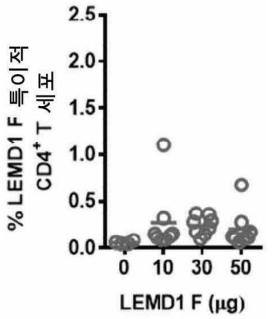

도면11c



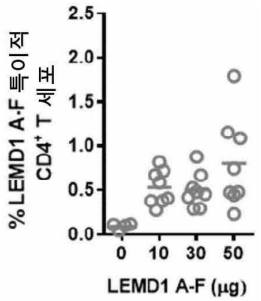

도면12a



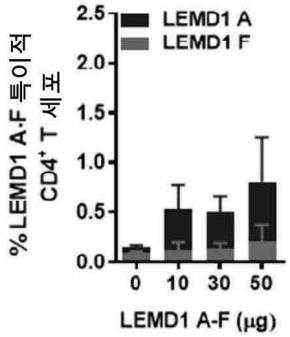

도면12b



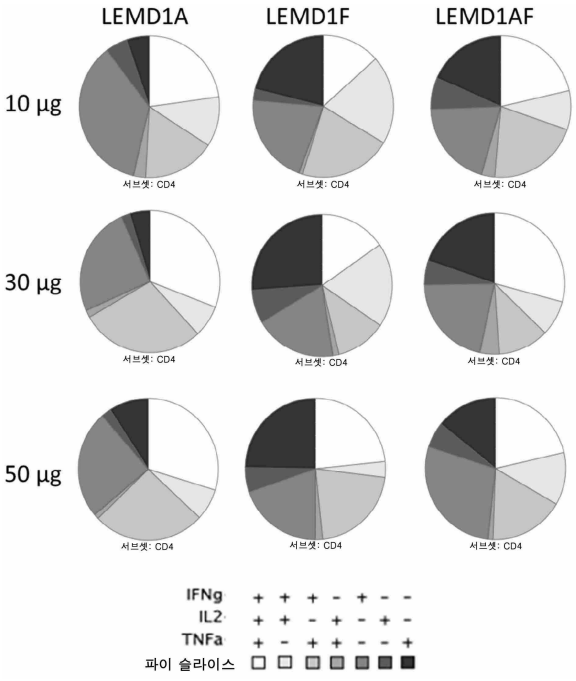
도면12c



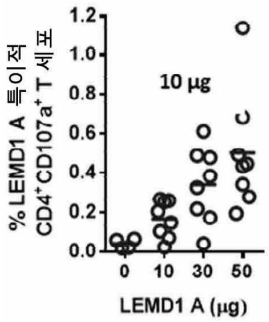

도면12d



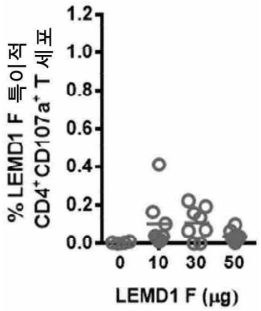

도면12e



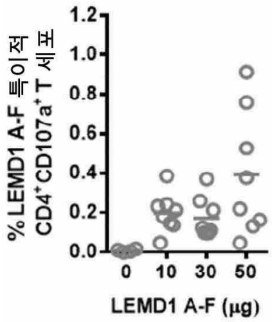
도면13a



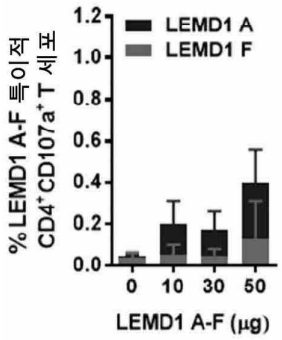

도면13b



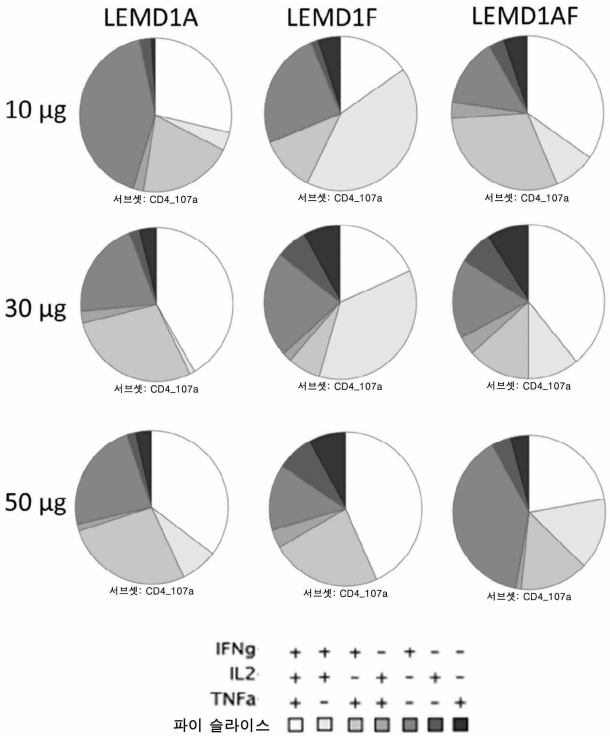

도면13c



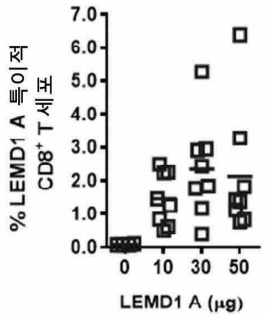

도면13d



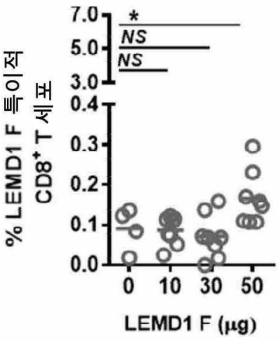
도면13e



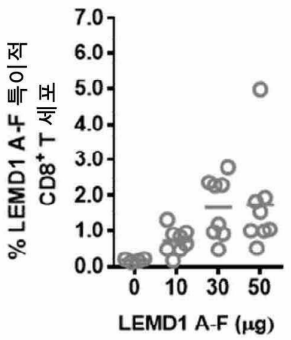

도면14a



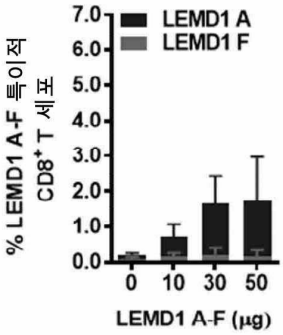

도면14b



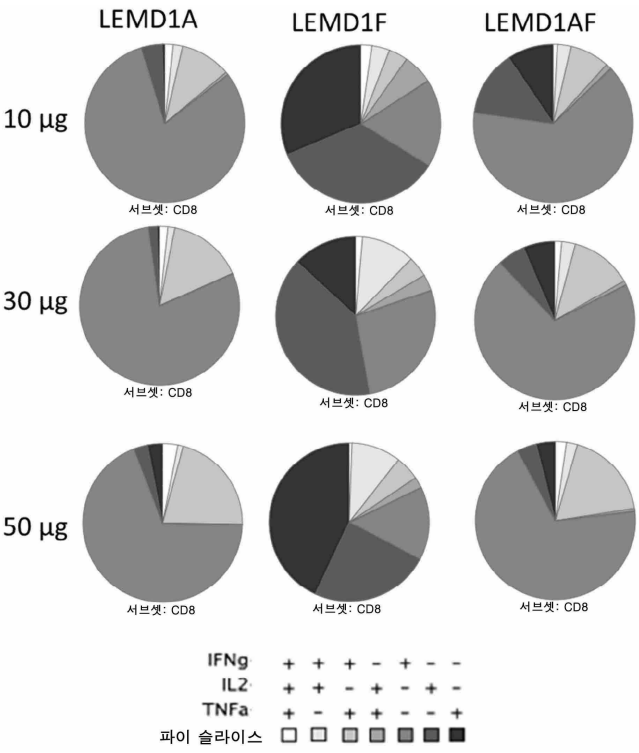
도면14c



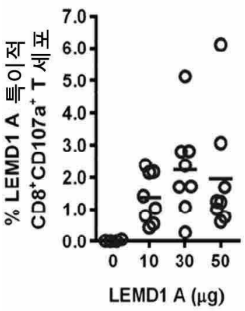

도면14d



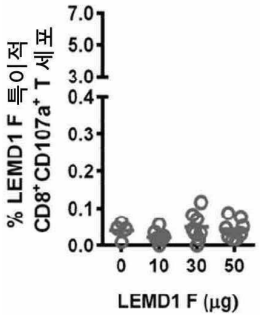

도면14e



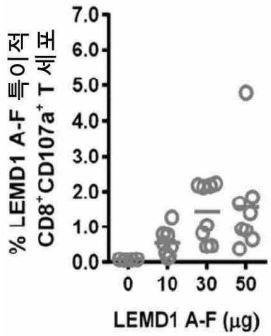
도면15a



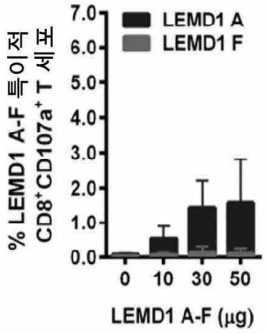

도면15b



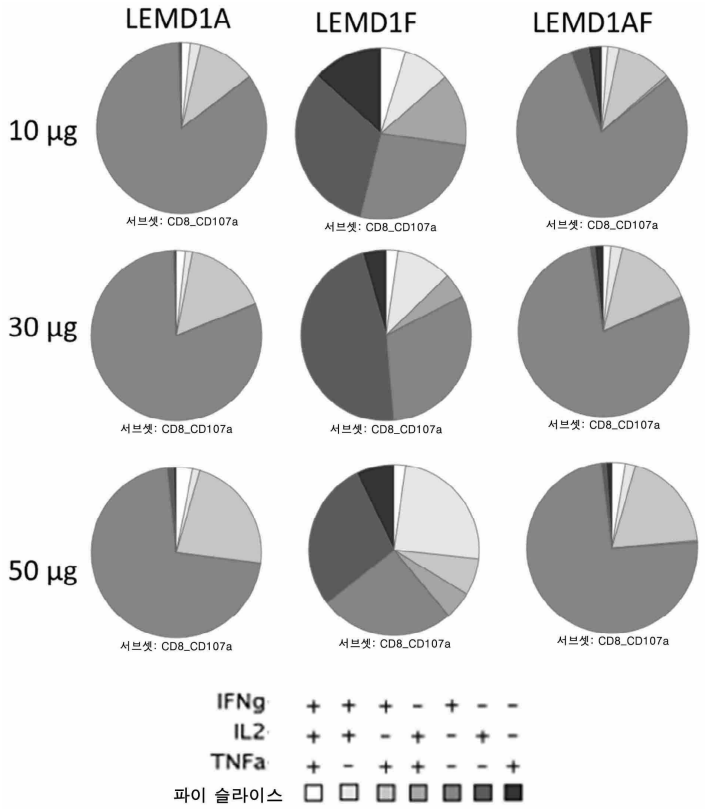

도면15c




도면15d



도면15e




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INOVIO PHARMACEUTICALS, INC.

<120> CANCER VACCINES TARGETING LEMD1 AND USES THEREOF

<130> P136432EP-WO

<140> EP 18887820.1

<141> 2018-12-13

<150> PCT/US2018/065534

<151> 2018-12-13

<150> 62/598,612

<151> 2017-12-14

<150> 62/598,329

<151> 2017-12-13

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus LEMD1A DNA Sequence"

<400> 1

atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa cacgggtgca ctccgtggac 60

gtgaagtgcc tgtctgattg taagctgcag aaccagctgg agaagctggc ctttagccct 120

ggcgccatcc tgccatccac caggaagctg gccgagaaga agctggtgca gctgctggtg 180

tccccacctt gcgcaccacc cgtgatgaat ggaccccgcg agctggacgg agcacaggat 240

agcgacgatt ccgaggagct gaacatcatc ctgcagggca atatcatcct gtctaccgag 300

aagagcaaga agctgaagaa gcggcccgag gcctctacca caaagcctaa ggccgtggac 360

acatactgcc tggattataa gccatctaag ggccggagat gggcagccag ggccccaagc 420

acccgcatca catacggcac catcacaaag gagcgggact attgtaccga ggatcagaca 480

gccgagagct ggagagagga gggcttccct gtgggcctga agctggccgt gctgggcatc 540

ttcatcatcg tggtgttcgt gtacctgaca gtggagaaca agccactgtt tggctgataa 600

<210> 2

<211> 198

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus LEMD1A Protein Sequence"

<400> 2

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln
20 25 30

Leu Glu Lys Leu Ala Phe Ser Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ser Thr Arg
35 40 45

Lys Leu Ala Glu Lys Lys Leu Val Gln Leu Leu Val Ser Pro Pro Cys
50 55 60

Ala Pro Pro Val Met Asn Gly Pro Arg Glu Leu Asp Gly Ala Gln Asp
65 70 75 80

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

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

<210> 3
<211> 258
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus LEMD1F DNA Sequence"
<400> 3
atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa caagggtgca ctctgtggac 60
gtgaagtgcc tgagcgattg taagctgcag aaccagctgg agaagctggc cttttcccca 120
ggagcaatcc tgaggggact gcaggagcac caggcaccag agagccacat gggactgtcc 180
cctaagcggg agaccacagc aaggaagacc agactgctga gggcaggaga gaagaaggtg 240
tctcagtggg cctgataa 258

<210> 4

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus LEMD1F Protein Sequence"

<400> 4

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

1 5 10 15

His Ser Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln

20 25 30

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

35 40 45

Glu His Gln Ala Pro Glu Ser His Met Gly Leu Ser Pro Lys Arg Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gln Trp Ala

<210> 5

<211> 819

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus LEMD1AF DNA Sequence"

<400> 5

atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa cccgcgtgca ttccgtcgat 60

gtgaagtgtc tgagtgattg taaactgcag aaccagctgg agaagctggc ctttagccct 120

ggagcaatcc tgccatccac caggaagctg gccgagaaga agctggtgca gctgctggtg 180

agcccacctt gcgcaccacc cgtgatgaat ggcccaagag agctggacgg cgcccaggat 240

agcgacgatt ccgaggagct gaacatcatc ctgcagggca atatcatcct gtctaccgag 300

aagagcaaga agctgaagaa gcggcccgag gcctccacca caaagcctaa ggccgtggac 360

acatactgcc tggattataa gccttccaag ggccggagat gggcagccag ggccccatct 420

accaggatca catacggcac catcacaaag gagcgggact attgtaccga ggatcagaca 480

gccgagtctt ggagagagga gggattccca gtgggcctga agctggccgt gctgggcatc 540

ttcatcatcg tggtgttcgt gtacctgaca gtggagaaca agcctctgtt tggccggggc 600

agaaagaggc gctctgtgga tgtaaaatgc ctatcggact gcaagttgca aaatcaatta 660

gaaaaattgg ccttctcccc aggggcgata ttgaggggcc tgcaggagca ccaggcacca 720

gagtcccaca tgggcctgtc tcccaagcgc gagacaaccg caagaaaaac aaggctgctg 780

agggctgggg aaaagaaagt gtcacagtgg gcatgataa 819

<210> 6

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus LEMD1AF Protein Sequence"

<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln
20 25 30

Leu Glu Lys Leu Ala Phe Ser Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ser Thr Arg
35 40 45

Lys Leu Ala Glu Lys Lys Leu Val Gln Leu Leu Val Ser Pro Pro Cys
50 55 60

Ala Pro Pro Val Met Asn Gly Pro Arg Glu Leu Asp Gly Ala Gln Asp
65 70 75 80

Ser Asp Asp Ser Glu Glu Leu Asn Ile Ile Leu Gln Gly Asn Ile Ile
85 90 95

Leu Ser Thr Glu Lys Ser Lys Lys Leu Lys Lys Arg Pro Glu Ala Ser
100 105 110

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

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

225 230 235 240
Glu Ser His Met Gly Leu Ser Pro Lys Arg Glu Thr Thr Ala Arg Lys
245 250 255
Thr Arg Leu Leu Arg Ala Gly Glu Lys Lys Val Ser Gln Trp Ala
260 265 270

<210> 7

<211> 3554

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
pGX1431 sequence"

<400> 7

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120

acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540

aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggt 720

accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggt ggcagcagca 780

acacgggtgc actccgtgga cgtgaagtgc ctgtctgatt gtaagctgca gaaccagctg 840

gagaagctgg cctttagccc tggcgccatc ctgccatcca ccaggaagct ggccgagaag 900

aagctggtgc agctgctggt gtccccacct tgcgcaccac ccgtgatgaa tggaccccgc 960

gagctggacg gagcacagga tagcgacgat tccgaggagc tgaacatcat cctgcagggc 1020

aatatcatcc tgtctaccga gaagagcaag aagctgaaga agcggcccga ggcctctacc 1080

acaaagccta aggccgtgga cacatactgc ctggattata agccatctaa gggccggaga 1140

tgggcagcca gggccccaag cacccgcatc acatacggca ccatcacaaa ggagcgggac 1200

tattgtaccg aggatcagac agccgagagc tggagagagg agggcttccc tgtgggcctg 1260

aagctggccg tgctgggcat cttcatcatc gtggtgttcg tgtacctgac agtggagaac 1320

aagccactgt ttggctgata actcgagtct agagggcccg tttaaacccg ctgatcagcc 1380

tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg 1440

accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat 1500

tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag 1560

gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctactggg 1620

cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg 1680

ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg 1740

gatcaagctc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat 1800

tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac 1860

agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc 1920

tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc 1980

tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag 2040

cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc 2100

ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg 2160

atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc 2220
ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc 2280
cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcga gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga 2340
cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca 2400
tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg 2460
atattgctga agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg 2520
ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgaatta 2580

ttaacgctta caatttcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac 2640
accgcatcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 2700
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 2760
tagcacgtgc taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 2820
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 2880
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 2940
acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 3000

tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 3060
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 3120
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 3180
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag 3240
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 3300
agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 3360
acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 3420

gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 3480
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 3540
gctcacatgt tctt 3554
<210> 8
<211> 3212
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

pGX1432 sequence"

<400> 8

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120

acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540

aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggt 720

accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggt ggcagcagca 780

acaagggtgc actctgtgga cgtgaagtgc ctgagcgatt gtaagctgca gaaccagctg 840

gagaagctgg ccttttcccc aggagcaatc ctgaggggac tgcaggagca ccaggcacca 900

gagagccaca tgggactgtc ccctaagcgg gagaccacag caaggaagac cagactgctg 960

agggcaggag agaagaaggt gtctcagtgg gcctgataac tcgagtctag agggcccgtt 1020

taaacccgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc 1080

tcccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat 1140

gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg 1200

caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc 1260

tctatggctt ctactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg 1320

cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc ttgccgccaa 1380

ggatctgatg gcgcagggga tcaagctctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca 1440

tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg 1500

gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag 1560

cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc 1620

aagacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc 1680

tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg 1740

atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc 1800

ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gcccattcga ccaccaagcg aaacatcgca 1860
tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag 1920
agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgagc atgcccgacg 1980
gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg 2040
gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca 2100
tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc 2160
tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg 2220

acgagttctt ctgaattatt aacgcttaca atttcctgat gcggtatttt ctccttacgc 2280
atctgtgcgg tatttcacac cgcatcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 2340
cctatttgtt tatttttcta atacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 2400
tgataaatgc ttcaataata gcacgtgcta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag 2460
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 2520
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 2580
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat 2640

caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 2700
actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 2760
acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 2820
cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 2880
gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 2940
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 3000
gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 3060

tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 3120
tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 3180
gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tt 3212

<210> 9

<211> 3773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

pGX1433 sequence"

<400> 9

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120

acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540

aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggt 720

accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggt ggcagcagca 780

acccgcgtgc attccgtcga tgtgaagtgt ctgagtgatt gtaaactgca gaaccagctg 840

gagaagctgg cctttagccc tggagcaatc ctgccatcca ccaggaagct ggccgagaag 900

aagctggtgc agctgctggt gagcccacct tgcgcaccac ccgtgatgaa tggcccaaga 960

gagctggacg gcgcccagga tagcgacgat tccgaggagc tgaacatcat cctgcagggc 1020

aatatcatcc tgtctaccga gaagagcaag aagctgaaga agcggcccga ggcctccacc 1080

acaaagccta aggccgtgga cacatactgc ctggattata agccttccaa gggccggaga 1140

tgggcagcca gggccccatc taccaggatc acatacggca ccatcacaaa ggagcgggac 1200

tattgtaccg aggatcagac agccgagtct tggagagagg agggattccc agtgggcctg 1260

aagctggccg tgctgggcat cttcatcatc gtggtgttcg tgtacctgac agtggagaac 1320

aagcctctgt ttggccgggg cagaaagagg cgctctgtgg atgtaaaatg cctatcggac 1380

tgcaagttgc aaaatcaatt agaaaaattg gccttctccc caggggcgat attgaggggc 1440

ctgcaggagc accaggcacc agagtcccac atgggcctgt ctcccaagcg cgagacaacc 1500

gcaagaaaaa caaggctgct gagggctggg gaaaagaaag tgtcacagtg ggcatgataa 1560

ctcgagtcta gagggcccgt ttaaacccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc 1620

cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc 1680

actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct 1740

attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aaggggggagg attgggaaga caatagcagg 1800

catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctactgggc ggttttatgg acagcaagcg 1860
aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact 1920
ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagctct gatcaagaga 1980
caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg 2040
cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg 2100
ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt 2160
ccggtgccct gaatgaactg caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg 2220

gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggctgctat 2280
tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat 2340
ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg 2400
accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg 2460
atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc 2520
tcaaggcgag catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc 2580
cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg 2640

tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg 2700
gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca 2760
tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgaattat taacgcttac aatttcctga 2820
tgcggtattt tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatcagg tggcacttttt 2880
cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat 2940
ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat agcacgtgct aaaacttcat 3000
ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 3060

taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 3120
tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 3180
gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 3240
agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 3300
aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 3360
gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 3420
gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 3480

tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 3540

agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 3600

cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 3660

gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 3720

gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctt 3773

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site sequence"

<400> 10

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

1 5

<210> 11

<211> 198

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> source

<223> /note="Native Human LEMD1A Protein Sequence"

<400> 11

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

1 5 10 15

His Ser Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln

20 25 30

Leu Glu Lys Leu Gly Phe Ser Pro Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Arg

35 40 45

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

50 55 60

Ala Pro Pro Val Met Asn Gly Pro Arg Glu Leu Asp Gly Ala Gln Asp

65 70 75 80

Ser Asp Asp Ser Glu Glu Leu Asn Ile Ile Leu Gln Gly Asn Ile Ile

85 90 95

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

Ile Glu Ser Trp Arg Glu Glu Gly Phe Pro Val Gly Leu Lys Leu Ala
165 170 175
Val Leu Gly Ile Phe Ile Ile Val Val Phe Val Tyr Leu Thr Val Glu
180 185 190
Asn Lys Ser Leu Phe Gly
195

<210> 12
<211> 84
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> source
<223> /note="Native Human LEMD1F Protein Sequence"
<400> 12
Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

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

65 70 75 80

Ser Gln Trp Ala

<210> 13

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 13

Met Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln Leu
1 5 10 15

Glu Lys Leu Ala Phe Ser Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ser Thr Arg Lys
20 25 30

Leu Ala Glu Lys Lys Leu Val Gln Leu Leu Val Ser Pro Pro Cys Ala
35 40 45

Pro Pro Val Met Asn Gly Pro Arg Glu Leu Asp Gly Ala Gln Asp Ser
50 55 60

Asp Asp Ser Glu Glu Leu Asn Ile Ile Leu Gln Gly Asn Ile Ile Leu
65 70 75 80

Ser Thr Glu Lys Ser Lys Lys Leu Lys Lys Arg Pro Glu Ala Ser Thr
85 90 95

Thr Lys Pro Lys Ala Val Asp Thr Tyr Cys Leu Asp Tyr Lys Pro Ser
100 105 110

Lys Gly Arg Arg Trp Ala Ala Arg Ala Pro Ser Thr Arg Ile Thr Tyr
115 120 125

Gly Thr Ile Thr Lys Glu Arg Asp Tyr Cys Thr Glu Asp Gln Thr Ala
130 135 140

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

Leu Gly Ile Phe Ile Ile Val Val Phe Val Tyr Leu Thr Val Glu Asn

165 170 175

Lys Pro Leu Phe Gly

180

<210> 14

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln Leu

1 5 10 15

Glu Lys Leu Gly Phe Ser Pro Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Arg Lys

20 25 30

Leu Tyr Glu Lys Lys Leu Val Gln Leu Leu Val Ser Pro Pro Cys Ala

35 40 45

Pro Pro Val Met Asn Gly Pro Arg Glu Leu Asp Gly Ala Gln Asp Ser

50 55 60

Asp Asp Ser Glu Glu Leu Asn Ile Ile Leu Gln Gly Asn Ile Ile Leu

65 70 75 80

Ser Thr Glu Lys Ser Lys Lys Leu Lys Lys Trp Pro Glu Ala Ser Thr

85 90 95

Thr Lys Arg Lys Ala Val Asp Thr Tyr Cys Leu Asp Tyr Lys Pro Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gly Thr Ile Thr Lys Glu Arg Asp Tyr Cys Ala Glu Asp Gln Thr Ile

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Gly Ile Phe Ile Ile Val Val Phe Val Tyr Leu Thr Val Glu Asn

165 170 175

Lys Ser Leu Phe Gly

180

<210> 15

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

Met Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln Leu
1 5 10 15
Glu Lys Leu Ala Phe Ser Pro Gly Ala Ile Leu Arg Gly Leu Gln Glu
20 25 30

His Gln Ala Pro Glu Ser His Met Gly Leu Ser Pro Lys Arg Glu Thr
35 40 45
Thr Ala Arg Lys Thr Arg Leu Leu Arg Ala Gly Glu Lys Lys Val Ser
50 55 60
Gln Trp Ala
65

<210> 16

<211> 67

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Val Asp Val Lys Cys Leu Ser Asp Cys Lys Leu Gln Asn Gln Leu
1 5 10 15
Glu Lys Leu Gly Phe Ser Pro Gly Pro Ile Leu Arg Gly Leu Gln Glu
20 25 30
His Gln Ala Pro Glu Ser His Met Gly Leu Ser Pro Lys Arg Glu Thr
35 40 45
Thr Ala Arg Lys Thr Arg Leu Ser Arg Ala Gly Glu Lys Lys Val Ser
50 55 60
Gln Trp Ala
65