(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.7
C12N 15/12
C07K 14/705
A61K 39/00
C12N 15/11

(11) 공개번호 10-2005-0004211
(43) 공개일자 2005년01월12일

(21) 출원번호 10-2004-7018958
(22) 출원일자 2004년11월23일
번역문 제출일자 2004년11월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/005594
(86) 국제출원출원일자 2003년05월23일
(87) 국제공개번호 WO 2003/100060
(87) 국제공개일자 2003년12월04일

(30) 우선권주장 0212046.7 2002년05월24일 영국(GB)

(71) 출원인 글락소 그룹 리미티드
영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포오드 버클리 애비뉴 글락소 웰컴 하우스

(72) 발명자 부르덴,네일
영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티븐에이지 거넬스 우드 로드 글락소스미스클라인

엘리스,조나단,헨리
영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티븐에이지 거넬스 우드 로드 글락소스미스클라인

햄블린,폴,에이.
영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티븐에이지 거넬스 우드 로드 글락소스미스클라인

(74) 대리인 남상선

심사청구 : 없음

(54) VNTR 반복 유닛의 수가 감소된 MUC-1 항원

요약

본 발명은 MUC-1 발현 종양의 치료 및 예방을 위한 핵산 백신접종 프로토콜에 유용한 신규한 핵산 작제물에 관한 것이다. 특히, 이러한 핵산은 10개 미만의 완전 반복 유닛을 갖는 MUC-1 유도체를 코드화하는 유전자를 포함한다. 본 발명은 추가로, 이러한 작제물을 포함하는 약제 조성물, 특히 입자 매개된 전달에 적합한 약제 조성물, 이들의 제조 방법, 및 의약에 있어서 이들의 용도를 제공한다. 이러한 핵산에 의해 코드화된 신규 단백질 및 이를 함유하는 약제 조성물 또한, 제공된다.

대표도

도 1

명세서

본 발명은 MUC-1 발현 종양의 치료 및 예방을 위한 핵산 백신접종 프로토콜에 유용한 신규한 핵산 작제물에 관한 것이다. 특히, 핵산은 DNA이며, DNA 작제물은 10개 미만의 완전 반복 유닛을 갖는 MUC-1 유도체를 코드화하는 유전자를 포함한다. 본 발명은 추가로, 이러한 작제물을 포함하는 약제 조성물, 특히 입자 매개된 전달에 적합한 약제 조성물, 이의 제조 방법 및 의약에서 이의 용도를 추가로 제공한다. 이러한 핵산에 의해 코드화된 신규한 단백질 및 이를 함유하는 약제 조성물이 또한 제공된다.

배경기술

상피 세포 뮤신 MUC-1 (또한 에피시알린 또는 다형성 에피시알린 뮤신, PEM)은 많은 상피 세포에서 발현되는 고분자량의 글리코단백질이다. 이러한 단백질은 세포질 테일, 트랜스멤브레인 도메인, 및 높은 비율의 프롤린, 세린 및 트레오닌 잔기를 함유하는 20개 아미노산 모티프의 반복유전자의 임의 반복부(본원에서는, VNTR 단량체로 칭하였으며, 이는 또한 VNTR 에피토프 또는 VNTR 반복부로서 공지되어 있음)로 구성되어 있다. 반복부의 수는 MUC-1 로커스에서의 유전적 다형성으로 인해 가변적이며, 매우 빈번하게는 30-100개이다 (Swallow et al, 1987, Nature 328:82-84). 정상적인 관 상피세포에서, MUC-1 단백질은 관 내강(duct lumen)에 노출된 세포의 정단면상에서만 발견된다 (Graham et al, 1996, Cancer Immunol Immunother 42:71-80; Barratt-Boyes et al, 1996, Cancer Immunol Immunother 43:142-151). MUC-1 분자의 대부분의 현저한 특징중 하나는 이의 광대한 O-결합된 글리코실화이다. 각각의 MUC-1 VNTR 단량체내에는 이용가능한 5개의 추정되는 O-결합된 글리코실화 부위가 있다. 하기 넘버링 시스템에 따르면, Thr-4, Ser-10, Thr-11, Ser-19 및 Thr-20이다.

VNTR은 하기 기재된 바와 같은 서열을 갖는 전형적이거나 완전한 반복부, 또는 20개 아미노산에 걸쳐 2 내지 3개의 차이를 나타내는 이러한 완전한 반복부로부터의 최소 가변부로서 특성 결정될 수 있다:

하기는 완전한 반복부의 서열이다.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	P	D	T	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S
				E		S							T						
													A						
													Q						

밑줄친 아미노산은 기재된 아미노산 잔기로 치환될 수 있다.

불완전한 반복부는 아미노산에 있어서 55-90%의 동일성을 갖는 콘센서스 서열에 대해 상이한 아미노산 치환기를 갖는다. 밑줄친 치환기를 갖는 4개의 불완전한 반복부가 하기 기술되어 있다:

APDTRPAPGSTAPPAHGVTS - 완전한 반복부

AP A T E PA S GS A A TWGQD VTS - 불완전한 반복부 1

V P V TRPA L GST T PPAH D VTS - 불완전한 반복부 2

APD NK PAPGSTAPPAHGVTS - 불완전한 반복부 3

APD N RPA L GSTAPP V H N VTS - 불완전한 반복부 4

야생형의 불완전한 반복부인 MUC-1은 완전한 반복 영역 측면에 위치한다. 이러한 상피 세포의 신생물 형질전환에 의해 발생하는 악성 암종에서, 여러 변화가 MUC-1의 발현에 영향을 끼친다. 단백질의 분극화된 발현이 손실되며, 이는 형질전환된 세포의 전체 표면에 걸쳐 분포하는 것으로 밝혀졌다. MUC-1의 총 양은 종종 10배 이상까지 증가한다 (Strous amp; Dekker, 1992, Crit Rev Biochem Mol Biol 27:57-92). 더욱 현저하게는, O-결합된 카보히드레이트 사슬의 적량 및 특성이 현저하게 변한다. 더 적은 세린 및 트레오닌 잔기가 글리코실화된다. 밝혀진 이러한 카보히드레이트 사슬은 비정상적으로 짧아지며, 종양 관련된 카보히드레이트 항원 STn을 생성시킨다(Lloyd et al, 1996, J Biol Chem, 271:33325-33334). 이러한 글리코실화가 변화됨으로써, 카보히드레이트 사슬에 의해 이전에 스크리닝된 MUC-1의 펩티드 사슬상의 다양한 에피토프가 접근가능하게 되었다. 이러한 방식으로 접근가능하게 된 한 에피토프는 각각 20개의 아미노산 VNTR 완전 단량체에 존재하는 서열 APDTR(도 2의 Ala 8 - Arg 12)에 의해 형성된다 (Burchell et al, 1989, Int J Cancer 44:691-696).

MUC-1에서의 이러한 변화는, 종양상에서 발현된 MUC-1 형에 대한 면역 시스템을 활성화시킬 수 있는 백신이 상피세포 종양, 및 실질적으로 MUC-1이 발견되는 T 세포 림프구와 같은 기타 세포 유형에 효과적일 수 있다는 것을 의미한다는 것이 자명하다. 비정상 단백질을 발현하는 세포를 사멸시키기 위한 면역 시스템에 의해 사용된 주요 이펙터 메카니즘중 하나는 세포파괴 T 림프구 면역 반응(CTL)이며, 이러한 반응은 종양을 치료하기 위한 백신 및 항체 반응에 바람직하다. 양호한 백신은 면역 반응의 모든 암(arm)을 활성화시킬 것이다. 그러나, 통용되는 카보히드레이트 및 펩티드 백신 예컨대, 테라토프(Theratope) 또는 BLP25 (Biomira Inc, Edmonton, Canada)이 면역 반응 - 각각 호르몬 및 세포 반응의 한 암을 우선적으로 활성화시키고 있으며, 더욱 균형있는 반응을 유도하기 위해서는 더욱 우수한 백신 설계가 요망된다.

핵산 백신은 대량으로 생산하기에 용이하다는 점에서 통상적인 단백질 백신접종에 많은 이점을 제공한다. 적은 용량으로도 이들은 강한 면역 반응을 유도하는 것으로 보고되었으며, 세포파괴 T 림프구 면역 반응 및 항체 반응을 유도시킬 수 있다.

그러나, 전체 길이의 MUC-1은 고도의 반복성 서열로 인해 작업이 매우 어려운데, 그 이유는 이러한 반복성 서열은 재조합에 대한 감수성이 높으며, 이러한 재조합은 현저한 생물 약제학적 개발을 어렵게하기 때문이다. 또한, VNTR 영역의 GC 풍부 특성은 시퀀싱을 어렵게 한다. 추가로, 조절적 이유에 있어서, DNA 작제물을 완전히 특징지어야 한다. 이렇게 고도로 빈번한 반복 서열을 갖는 분자를 시퀀싱하기는 매우 확실치 않다. 야생형 MUC-1에 얼마나 많은 반복 유닛이 존재하는지 정확하게 밝혀지지 않은 상태에서, 전체 길이의 MUC-1을 정확하게 특징지을 수 없다는 것은 조절 기준에 있어서 전체 길이의 MUC-1을 수용할 수 없게 한다.

MUC-1 VNTR 영역은 면역우성 에피토프를 함유하는 것으로 여겨진다. 놀랍게도, 본 발명자들은, VNTR의 수를 감소시켜 야생형의 전체 길이의 MUC-1과 비교하여 동일한 항종양 활성을 갖는 면역원성 작제물을 생성시키는 것이 가능하다는 것을 발견하였다. 본 발명의 작제물은 안정적이다. 특히, 작제물은 각각 10 내지 14시간 지속되는 9 계대의 경로에 걸친 E.Coli 배양물로서 성장할 경우, 성장 특성, 플라스미드 보유 및 플라스미드 특질에 있어서 안정적이다.

본 발명의 요약

본 발명은, 전체 길이 MUC-1에 있어서 재조합에 대해 감소된 감수성을 가지며, 안정적이고, 생체내에서 면역 반응을 유발할 수 있는, MUC-1 항원을 코드화하는 핵산 서열을 제공한다. 안정도는 규정된 형태의 플라스미드의 양을 측정치이다. 대량으로 성장시킨 후, 아가로서 또는 폴리아크릴 아미드 겔상에서 육안으로 확인할 경우, 재조합 형성물로의 오염도가 2.0% 미만인 것이 바람직하다. 전형적으로 대량이라는 것은 1리터 초과의 규모로 성장시킬 경우를 의미한다. 또한, 플라스미드 복사체가 계대 기간에 걸쳐 안정적이라는 것 또한 안정도의 별도의 측정치이다. 바람직하게는, 플라스미드 복사체 수는 계대 수에 걸쳐, 특히 1 내지 9 계대에 걸쳐 증가한다. 바람직하게는, 플라스미드 복사체 수는 9 계대에 걸쳐 약 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 가장 바람직하게는 약 50% 증가한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 1 내지 15개, 바람직하게는 1 내지 10개의 완전한 VNTR 반복 유닛을 갖는 작제물을 제공한다. 8개 미만의 완전한 반복 유닛이 바람직하다. 바람직한 구체예는 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7개의 반복 유닛을 갖는 작제물을 제공한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 불완전한 반복 영역은 계속 유지된다. 1 또는 7개의 완전한 반복 유닛을 갖는 작제물이 바람직하다. 이러한 작제물에 의해 코드화되는 단백질은 신규하며, 본 발명의 한 양태를 형성한다.

본 발명의 추가의 양태에서, 핵산 서열은 플라스미드 형태의 DNA 서열이다. 바람직하게는, 플라스미드는 슈퍼-코일링된다.

본 발명의 추가의 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산, 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

바람직하게는, 담체는 금 비드이며, 약제 조성물은 입자 매개된 약물 전단에 의해 전달될 수 있다.

추가의 구체예에서, 본 발명은 의약에 사용하기 위한 약제 조성물 및 핵산 작제물을 제공한다. 특히, MUC-1 발현 종양의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조에서 본 발명의 핵산 작제물을 제공한다.

본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 조성물 또는 핵산을 안정적이고 유효한 양으로 투여하여 MUC-1 발현 종양 특히, 유방, 폐, 난소, 전립선(특히, 비소세포 폐 암종), 위 및 기타 GI(위장)의 암종으로부터 고통받거나 이에 감수성을 띠는 환자를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

추가의 구체예에서, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 본 발명의 핵산 작제물 또는 단백질을 혼합하므로써 본원에 기술된 바와 같은 약제 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 핵산 작제물은 전형적으로, 15개 미만, 더욱 전형적으로는 10개 미만의 완전한 반복 유닛을 갖는다. 야생형 MUC-1(도 1 참조) 분자는 시그널 서열, 리더 서열, 불완전 또는 부정형 VNTR, 완전한 VNTR 영역, 추가의 부정형 VNTR, 비-VNTR 세포외 도메인, 트랜스멤브레인 도메인 및 세포질 도메인을 함유한다.

본 발명의 바람직한 구체예는 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2개 미만의 반복 유닛을 갖는다. 특히 바람직한 작제물은 1, 2 또는 7개의 완전한 반복 유닛을 갖는다.

비-VNTR 세포외 도메인은 VNTR 5'의 약 80개 아미노산 및 VNTR 3'의 약 190-200개 아미노산이다. 본 발명의 모든 작제물은 이러한 영역으로부터의 하나 이상의 에피토프를 포함한다. 에피토프는 전형적으로 7개 이상의 아미노산 서열로부터 형성된다. 따라서, 본 발명의 작제물은 비-VNTR 세포외 도메인으로부터의 하나 이상의 에피토프를 포함한다. 바람직하게는, 사실상 모든 또는 더욱 바람직하게는, 모든 비-VNTR 도메인이 포함된다. 서열 FLSFHISNL, NSSLEDPSTDYYQELQRDISE 또는 NLTISDVSV에 의해 포함되는 하나 이상의 에피토프를 함유하는 작제물이 특히 바람직하다. 2개, 바람직하게는 3개의 에피토프 서열이 작제물에 인코포레이팅(incorporate)된것이 더욱 바람직하다.

바람직한 구체예에서, 작제물은 N-말단 리더 서열을 포함한다. 작제물중의 시그널 서열, 트랜스멤브레인 도메인 및 세포질 도메인은 각각 개별적으로 선택적이다. 모두 존재할 수 있거나, 하나 이상이 제거될 수도 있다.

본 발명에 따른 바람직한 작제물은 다음과 같다:

1) 7 VNTR MUC-1 (즉, 단지 7개의 완전한 반복 유닛을 갖는 전체 길이의 MUC-1)

2) 7 VNTR MUC-1 △ss (I, 시그널 서열이 결여됨)

3) 7 VNTR MUC-1 △TM△CYT (1, 트랜스멤브레인 및 세포질 도메인이 결여됨)

4) 7 VNTR MUC-1 △ss△TM△CYT (3, 시그널 서열 또한 결여됨)

또한, 단지 2 VNTR 또는 1 VNTR을 함유하는 상기 1 내지 4 작제물의 등가물 또한 바람직하다. 이러한 작제물중의 VNTR은 본원에 이미 기술된 바와 같은 완전한 반복부의 서열을 갖는다. 구체예에서, 하나 이상의 VNTR 유닛은 글리코실화 부위를 변형시키므로써 변이되어 글리코실화될 가능성을 감소시킨다. 변이는 바람직하게는, 치환이며, 삽입 또는 결실일 수 있다. 전형적으로, 하나 이상의 트레오닌 또는 세린은 발린, 이소류신, 알라닌, 아스파라긴, 페닐알라닌 또는 트립토판으로 치환된다. 야생형 VNTR 단량체에서, 각각 MUC-1 VNTR 단량체내에 이용가능한 5개의 추정되는 O-결합된 글리코실화 부위가 있다. 이는 Thr-4, Ser-10, Thr-11, Ser-19 및 Thr-20이다 (상기 넘버링 참조). 1개 이상, 바람직하게는 2 또는 3개 이상, 바람직하게는 4개 이상의 잔기가 상기 기수된 바와 같은 아미노산으로 치환되는 것이 바람직하다.

바람직한 치환기는 하기를 포함한다:

Thr4 -> Val

Ser10 -> Ala

Thr11 -> ILe 또는 Val

Ser19 -> Val

Thr20 -> Ala

추가의 구체예에서, MUC-1 작제물에는 이종성 T-세포 에피토프를 코드화하는 핵산 서열이 제공된다. 이러한 에피토프는 박테리아 단백질 및 독소 예컨대, 테타누스 및 디프테리아 독소로부터 유래된 T-세포 에피토프를 포함한다. 예를 들어, P2 및 P30 에피토프는 테타누스 독소로부터 유래된다. 이러한 에피토프는 더 긴 서열의 일부일 수 있다. 에피토프는 핵산 분자내로 또는 본 발명에 따른 서열의 3' 또는 5' 말단에 인코포레이팅될 수 있다.

기타 융합 파트너로는 예컨대, B형 간염 코어 항원 또는 결핵으로부터 유래된 것들이 고려될 수 있다. 구체예에서, 융합 단백질은 마이코박테리움 튜버큐로시스 RA12 즉, MTB32A의 부서열(subsequence)(아미노산 192 내지 323)로

부터 유래되었다.

또 다른 면역학적 융합 단백질은 예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니애(Streptococcus pneumoniae)로부터 유래된 LYTA의 일부(전형적으로 C-말단부)(Biotechnology 10:795-798, 1992) 또는 헤모필루스 인플루엔자 B(Haemophilus influenza B)(WO91/18926)로부터의 단백질 D를 포함한다.

본 발명의 추가의 양태에 따르면, 본 발명에 따른 폴리누클레오티드 서열을 포함하고, 이의 발현을 유도할 수 있는 발현 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 박테리아, 곤충 또는 포유동물 세포 특히, 인간 세포에서 이종성 DNA의 발현을 유도 하는데 적합할 수 있다.

본 발명의 추가의 양태에 따르면, 본 발명에 따르는 폴리누클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포, 또는 본 발명에 따른 발현 벡터가 제공된다. 숙주 세포는 박테리아 예를 들어, E.coli, 포유동물 예를 들어, 인간일 수 있거나, 곤충 세포일 수 있다. 본 발명에 따르는 벡터를 포함하는 포유동물 세포는 실험관내에서 트랜스펙션된 배양된 세포일 수 있거나, 포유동물에 벡터를 투여하므로써 생체내에서 트렌스펙션될 수 있다.

본 발명은 추가로 본 발명에 따른 폴리누클레오티드를 포함하는 약제 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 조성물은 DNA 벡터를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 MUC-1 아미노산 서열을 코드화하는 본 발명의 폴리누클레오티드 서열을 코드화하는 벡터를 포함하는 DNA로 피복된 다수의 입자, 바람직하게는 금 입자를 포함한다. 대안적인 구체예에서, 조성물은 본 발명에 따른 DNA 벡터 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

조성물은 또한, 애주번트를 포함할 수 있거나, 애주번트 또는 면역-자극제와 동시에 투여되거나, 잇달아 투여될 수 있다.

본 발명의 구체예에서, 본 발명의 벡터는 면역자극제로서 사용된다. 바람직하게는, 면역자극제는 본 발명의 핵산 벡터와 동시에 투여되거나, 바람직한 구체예에서는, 이들이 함께 제형화된다. 이러한 면역자극제로는 하기를 포함하나, 이들에 의해 제한되거나 기타 제제를 배제시키는 것은 아니다; 합성 이미다조퀴놀린 예컨대, 이미퀴모드[S-26308, R-837],(Harrison, et al. 'Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine', Vaccine 19:1820-1826, (2001)]; 및 레시퀴모드[S-28463, R-848](Vasilakos, et al. 'Adjuvant activites of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN', Cellular immunology 204:64-74(2000)), 항원 표출 세포 및 T-세포 표면상에서 구조적으로 발현되는 아민 및 카르보닐의 쉬프 염기(Schiff base) 예컨대, 투카레졸(tucaresol)(Rhodes, J. et al. 'Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs', Nature 377:71-75(1995)), 사이토카인, 케모킨, 및 단백질 또는 펩티드로서의 공동자극 분자로서, 이들은 전염증성 사이토카인 예컨대, 인터페론스(Interferons), 특히 인터페론 및 GM-CSF, IL-1 알파, IL-1 베타, TGF-알파 및 TGF-베타, Th1 유도제 예컨대, 인터페론 감마, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21, Th2 유도제 예컨대, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 IL-13 및 기타 케모킨 및 공동자극 유전자 예컨대, MCP-1, MIP-1 알파, MIP-1 베타, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 및 CD40L, 기타 면역자극 표적화 리간드 예컨대, CTLA-4 및 L-셀렉틴, 아폽토시스 자극 단백질 및 펩티드 예컨대, Fas, (49), 합성 리피드 기재 애주번트 예컨대, 박스펙틴(Reyes et al., 'Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization', Vaccine 19:3778-3786) 스쿠알렌, 알파-토코페롤, 폴리소르베이트 80, DOPC 및 콜레스테롤, 엔도톡신, [LPS],(Beutler, B., 'Endotoxin, 'Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity', Current Opinion in Microbiology 3:23-30(2000)), CpG 올리고- 및 디-누클레오티 드(Sato,Y. et al., 'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization', Science 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H. et al., 'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', Nature 408:740-745, (2000)) 및 Th1-유도 사이토카인을 유도하기 위한 Toll 수용체를 개시시키는 기타 잠재적인 리간드 예컨대, 합성 마이코박테리아 지질단백질, 마이코박테리아 단백질 p19, 펩티도글리칸, 테이코산 및 지질 A를 포함함. 기타 박테리아 유도된 면역자극 단백질은 콜레라 톡신(Cholera Toxin), 대장균 톡신(E.Coli Toxin) 및 이들의 변이 독소를 포함한다.

우세한 Th1 유형 반응을 유도하기 위한 특정 바람직한 애주번트는 예를 들어, 리피드 A 유도체 예컨대, 모노포스포릴 리피드 A, 또는 바람직하게는 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 리피드 A를 포함한다. MPL 애주번트는 코릭사 코포레이션(Corixa Corporation: Seattle, WA; 예를 들어, US 특허 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 및 4,912,094 참조)으로부터 입수가능하다. CpG-함유 올리고누클레오티드(여기서, CpG 디누클레오티드는 비메틸화됨)는 또한 우세한 Th1 반응을 유도한다. 이러한 올리고누클레오티드는 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, WO 96/02555, WO99/33488 및 U.S. 특허 6,008,200 및 5,856,462에 기술되어 있다. 면역자극 DNA 서열은 또한 예를 들어, 문헌[Sato et al., Science 273:352, 1996]에 기술되어 있다. 기타 바람직한 애주번트는 사포닌 예컨대, QS21 및 QS7을 포함하는 퀼 A(Quil A), 또는 이들의 유도체(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); 에스신(Escin); 디지토닌(Digitonin); 또는 깁소필라 또는 케노포듐 퀴노아 사포닌(*Gypsophila* or *Chenopodium quinoa saponin*)을 포함한다.

또한, MUC-1 발현 종양 또는 전이의 치료 또는 예방에 있어서 본 발명에 따른 폴리누클레오티드 또는 단백질, 또는 본 발명에 따른 벡터의 용도를 제공한다.

본 발명은 또한, 본 발명에 따른 유효량의 폴리누클레오티드, 벡터 또는 약제 조성물을 투여하는 것을 포함하여, MUC-1 발현 종양, 전이를 포함하는 이와 관련된 증상 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 약제 조성물의 투여는 하나 이상의 개별적 용량 형태로 예를 들어, '프라임-부스트(prime-boost)' 치료적 백신접종법으로 수행될 수 있다. 특정 경우에는, '프라임' 백신접종은 바람직하게는, 플라스미드-유도 벡터로 인코포레이팅된 본 발명에 따른 폴리누클레오티드의 입자 매개된 DNA 전달을 통해 이루어질 수 있으며, '부스트'는 동일한 폴리누클레오티드 서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터의 투여 또는 애주번트중의 단백질로의 부스팅(boosting)에 의해 이루어질 수 있다. 반대로, 프라이밍은 바이러스 벡터 또는 단백질 제형 전형적으로, 애주번트중에 제형화된 단백질로 이루어질 수 있으며, 부스트는 본 발명의 DNA 백신에 의해 이루어질 수 있다.

상기 기술된 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 누클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 이러한 발현 벡터는 분자 생물학 분야에서 통상적으로 작제되며, 단백질 발현을 위해 필수적일 수 있으며, 정방향(correction orientation)으로 정위되는 예를 들어, 플라스미드 DNA 및 적합한 개시제, 프로모터, 인핸서 및 폴리아데틸화 시그널과 같은 기타 요소를 포함할 수 있다. 기타 적합한 벡터는 당 업자에게 자명할 것이다. 이와 관련하여 추가의 예로서, 본 발명자들은 문헌[Sambrook et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2 nd Edition. CSH Laboratory Press (1989)]을 참조하였다.

바람직하게는, 본 발명의 폴리누클레오티드 또는 본 발명에서 벡터에 사용하기 위한 폴리누클레오티드는 숙주 세포에 의한 코딩 서열의 발현을 위해 제공될 수 있는 제어 서열로 작동적으로 연결된다. 즉, 벡터는 발현 벡터이다. 용어 '작동적으로 연결된'은 기술된 구성 요소들이 이들의 의도된 방식으로 이들의 기능을 수행할 수 있는 관계로 병렬 위치하는 것을 의미한다. 조절 서열 예컨대, 코딩 서열에 '작동적으로 연결된' 프로모터는, 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 양립할 수 있는 조건하에 달성되는 방식으로 위치한다.

벡터는 예를 들어, 복제의 오리진 선택적으로, 폴리누클레오티드의 발현을 위한 프로모터, 및 선택적으로 프로모터의 조절제가 구비된 플라스미드, 인공 크로모좀(예를 들어, BAC, PAC, YAC), 바이러스 또는 페이지 벡터일 수 있다. 벡터는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자 예를 들어, 박테리아 플라스미드의 경우 암피실린 또는 카나마이신 내성 유전자, 또는 진균 벡터에 대한 내성 유전자를 함유할 수 있다. 벡터는 예를 들어, DNA 또는 RNA의 생성을 위해 실험관내에서 사용될 수 있거나, 예를 들어, 벡터에 의해 코드화된 단백질 생성을 위해 숙주 세포 예를 들어, 포유동물 숙주 세포를 트랜스펙션 또는 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 예를 들어, 유전자 치료 또는 DNA 백신접종 방법에서 생채내에서 사용 하기에 적당할 수 있다.

프로모터 및 기타 발현 조절 시그널은 발현이 설계된 숙주 세포와 양립가능하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 포유동물 프로모터는 중금속 예컨대, 카드뮴에 대한 반응이 유도될 수 있는 메탈로티오네인 프로모터 및 β-악틴 프로모터를 포함한다. 바이러스 프로모터 예컨대, SV40 거대 T 항원 프로모터, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 극초기 (IE) 프로모터, 로우스 육종 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 프로모터, 또는 HPV 프로모터, 특히 HPV 업스트림 조절 영역(URR)이 또한 사용될 수 있다. 모든 이러한 프로모터는 당해분야에 잘 설명되어 있으며, 용이하게 입수가능하다.

바람직한 프로모터 요소는 인트론 A가 결여되고, 엑손 1은 포함하는 CMV 극초기 프로모터이다. 따라서, HCMV IE 초기 프로모터의 제어하에 본 발명의 폴리누클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다.

적합한 바이러스 벡터의 예로는 단순포진 바이러스 벡터, 백신 또는 알파-바이러스 벡터, 및 레티바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련된 바이러스를 포함하는 레트로바이러스를 포함한다. 이들 바이러스를 사용한 유전자 이식 기법은 당해분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 본 발명의 폴리누클레오티드를 숙주 게놈으로 안정적으로 통합시키는데 사용될 수 있다 (비록, 이러한 재조합이 바람직하지는 않지만). 대조적으로 복제-결함 아데노바이러스 벡터는 에피소말을 유지시켜, 일시적 발현을 가능하게 한다. 곤충 세포 (예를 들어, 베큘로바이러스 벡터), 인간 세포 또는 박테리아에서 발현을 유도할 수 있는 벡터는 예를 들어, 서브유닛 백신으로서 또는 면역검정에서 사용하기 위한 본 발명의 폴리누클레오티드에 의해 코드화되는 적량의 HIV 단백질을 생성시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리누클레오티드는 전체 길이 백시니아 작제물을 생성시키기 위한 종래의 시도가 성공적이지 못하였기 때문에, 바이러스 백신에 특히 유용하다.

본 발명에 따른 폴리누클레오티드는 실험관내, 생체내 또는 생체외에서 수행될 수 있는 코드화된 단백질의 발현에 의한 생성에 유용하다. 따라서, 이러한 누클레오티드는 예를 들어, 수율을 증가시키기 위한 재조합 단백질 합성과 관련이 있거나, 실질적으로 DNA 백신접종 기법에서 이용되는 이들 자체의 치료학적 제제로서의 용도를 발견할 수 있다. 본 발명의 폴리누클레오티드가 실험관내 또는 생체외에서 코드화된 단백질의 생성에 사용될 경우, 예를 들어, 세포 배양물중의 세포는 발현되는 폴리누클레오티드를 포함하도록 변형될 것이다. 이러한 세포는 일시적인 또는 바람직하

게는, 안정적인 포유동물 세포주를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리펩티드에 대해 코드화한 벡터의 삽입에 의해 변형될 수 있는 세포의 특정 예로는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, 293 및 COS 세포를 포함한다. 바람직하게는, 선택된 세포주는 안정적일 뿐만 아니라 폴리펩티드의 성숙한 글리코실화 및 세포 표면 발현을 가능하게 하는 것이다. 발현은 형질전환된 난모세포로 달성될 수 있다. 폴리펩티드는 형질전환 인간외 동물 바람직하게는, 마우스의 세포에서 본 발명의 폴리누클레오티드로부터 발현될 수 있다. 본 발명의 폴리누클레오티드로부터 폴리펩티드를 발현하는 형질전환 인간외 동물은 본 발명의 범위내에 포함된다.

본 발명은 추가로 유효량의 백신 또는 백신 조성물을 투여하는 것을 포함하 여, 포유동물 시험체를 백신접종시키는 방법을 제공한다. 가장 바람직하게는, DNA 백신, 백신 조성물 및 면역치료에 사용하기 위한 발현 벡터는 플라스미드 벡터일 것이다.

DNA 백신은 예를 들어, 주사 또는 고압 제트를 사용하여 투여되는 액체 제형중의 '네이키드 DNA'의 형태, 또는 입자 매개된 DNA 전달(PMDD)에 의해, 또는 리포좀 또는 자극성 트랜스펙션 인핸서로 제형화된 DNA 형태로 투여될 수 있다. 이들 모든 전달 시스템은 당해분야에 널리 공지되어 있다. 벡터는 예를 들어, 바이러스 벡터 전달 시스템에 의해 포유동물에 유입될 수 있다.

본 발명의 조성물은 많은 경로, 예컨대, 근내, 피하내, 복막내 또는 정맥내로 전달될 수 있다.

바람직한 구체예에서, 조성물은 피내로 전달된다. 특히, 조성물은 예를 들어, 문헌[Haynes et al, J Biotechnology 44:37-42(1996)]에 기술된 바와 같이 벡터로 비드(예를 들어, 금)를 피복시킨 후, 고압하에 표피로 투여하는 것을 포함하는, 유전자 건(특히 입자 폭발) 투여 기법에 의해 전달될 수 있다.

실례가 되는 예에서, 가스 구동 입자 가속은 파우더젯 파마슈티컬스 피엘씨(Oxford, UK) 및 파우더젯 백신 인크.(Powderject Vaccines Inc.: Madison, WI)에 의해 제조된 것과 같은 기기로서, 이들 일부 예가 U.S. 특허 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; 및 EP 특허 0500 799에 기술된 기기로 달성될 수 있다. 이러한 방법은 바늘이 불필요한 전달 방법으로서, 극미 입자 예컨대, 폴리누클레오티드의 건조 분말 제형은 핸드 헨들 디바이스(hand held device)에 의해 생성된 헬륨 기체내에서 고속으로 가속된, 관련된 표적 조직 전형적으로, 피부로 프로펠링된다. 입자는 바람직하게는, 이들상에 DNA 컨주게이트가 피복되고, '유전자 건'에 배치시키기 위한 카트리지 또는 카세트내에 캡슐화된 0.4 내지 4.0㎛, 더욱 바람직하게는 0.6 내지 2.0㎛ 직경의 바람직하게는, 금 비드이다.

관련된 구체예에서, 본 발명의 조성물을 바늘이 불필요한 가스 구동으로 주입시키는데 유용할 수 있는 기타 기기 및 방법은 바이오젝트, 인크.(Bioject, Inc.)(Portland, OR)에 의해 제공된 것을 포함하며, 이들 일부 예는 U.S. 특허 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 및 5,993,412에 기술되어 있다.

항원성 펩티드를 코드화하는 누클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 예방학적 또는 치료학적으로 유효할 양으로 투여된다. 투여될 적량은 일반적으로, 입자-매개된 전달에 있어서, 1 피코그램 내지 1 밀리그램, 바람직하게는 1 피코그램 내지 10 마이크로그램이며, 1회 투여량당 누클레오티드의 기타 경로에 있어서는, 10 마이크로그램 내지 1 밀리그램이다. 정확한 적량은 면역화될 환자의 체중 및 투여 경로에 따라 상당히 가변적일 수 있다.

항원성 펩티드를 코드화하는 누클레오티드 서열을 포함하는 면역원 성분은 무작위적으로 한번 투여될 수 있거나, 약 1일 내지 약 18개월의 간격을 두고 1회 내지 7회, 바람직하게는 1회 내지 4회 반복해서 투여될 수 있다. 그러나, 또한 이러한 처리 요법은 환자의 크기, 치료/예방될 질환, 투여된 누클레오티드 서열의 양, 투여 경로, 및 담당 의사에게는 자명한 기타 요인들에 따라 현저하게 변화될 것 이다. 환자는 이들의 전체적인 치료 요법의 일부로서 하나 이상의 기타 항 암 약물을 수용할 수 있다.

환자에 네이키드 폴리누클레오티드 또는 벡터를 유입시키키기에 적합한 기법은 또한, 적합한 비히클로의 국소적 적용을 포함한다. 핵산은 피부 또는 점막 표면으로 예를 들어, 비내, 구내, 질내 또는 직장내 투여에 의해 국소적으로 투여될 수 있다. 네이키드 폴리누클레오티드 또는 벡터는 약제학적으로 허용가능한 부형제 예컨대, 인산염 완충된 염수(PBS)와 함께 존재할 수 있다. DNA 흡입은 DNA 제형중에 포함되거나, 별도로 처리되는 부피바카인(bupivacaine)과 같은 촉진제의 사용에 의해 추가로 촉진될 수 있다. 핵산을 직접적으로 수용인에 투여하는 기타 방법으로는 US-5,697,901에 기술된 초음파, 전기 자극, 일렉트로포레이션 및 마이크로시딩을 포함한다.

핵산 작제물의 흡입은 수개의 공지된 트랜스펙션 기법 예를 들어, 트랜스펙션 제제의 사용을 포함하는 기법에 의해 증가될 수 있다. 이들 제제의 예로는 양이온성 제제 예를 들어, 칼슘 포스페이트 및 DEAE-덱스트란 및 리포펙탄트 예를 들어, 리포펙탐 및 트랜스펙탐을 포함한다. 투여될 핵산의 투여량은 변할 수 있다.

본 발명의 핵산 서열은 형질전환된 세포에 의해 투여될 수 있다. 이러한 세포는 시험체로부터 채취된 세포를 포함한다. 본 발명의 네이키드 폴리누클레오티드 또는 벡터는 실험관내에서 이러한 세포로 유입될 수 있으며, 형질전환된

세포가 후에 시험체로 재유입될 수 있다. 본 발명의 폴리누클레오티드는 동종성 재조합에 의해 세포에 이미 존재하는 핵산으로 통합될 수 있다. 필요에 따라, 형질전환된 세포는 실험관내에서 성장되고, 하나 이상의 생성된 세포가 본 발명에 사용될 수 있다. 세포는 공지된 외과적 기법 또는 미세수술 기법(예를 들어, 그래프팅, 미세-주입법, 등)에 의해 환자의 적합한 부위에 제공될 수 있다.

실시예

1.1 작제물의 생성

하기 상세히 설명된 모든 작제물들 사이의 개략적인 상호관계는 도 1에서 알 수 있다.

1.2. 전체 길이의 MUC-1 발현 카세트의 작제

MUC-1 발현 카세트 작제를 위한 출발점은 플라스미드 pcDNA3-FL-MUC-1(ICRF, London)이다. 상기 플라스미드는 BamHI 부위에서 클로닝된 전체 길이의 MUC-1(FL-MUC1) cDNA 카세트를 함유하는 pcDNA3 백본(Invitrogen)을 갖는다. ICRF에서 수행된 제한 맵핑에 기초하여, MUC-1 유전자는 약 32개의 VNTR 유닛(반복유전자의 임의 반복부)를 갖는다. MUC-1의 존재는 프라이머 2004MUC1-2014MUC1(부록 A)를 사용한 형광 시퀀싱에 의해 확인하였다. FL-MUC1 서열의 기초가 되는 MUC-1 서열은 도 2에 도시되어 있다. 클로닝 공정의 제 1 단계에서, 전체 길이의 MUC-1 cDNA 서열을 함유하는 BamHI 단편을 분리하고, 발현 벡터 pcDNA3.1(+)/히그로(Invitrogen)의 BamHI 부위로 클로닝시켜 플라스미드 JNW278을 생성시켰다. CMV 프로모터에 대한 단편의 정방향은 PCR 및 형광 시퀀싱에 의해 확인하였다.

클로닝의 다음 단계는 3' 비번역된 영역(UTR)을 제거하고, 개량된 제한 효소 부위로 대체하여 앞으로의 클로닝 공정을 용이하게 하는 것을 포함한다. MUC-1의 단편을 주형으로서 JNW278을 사용하여 프라이머 2062MUC1 및 2063MUC1(부록 A)로 PCR 증폭시키고, BstXI 및 XhoI로 제한시켰다. 동시에, 플라스미드 JNW278을 BstXI 및 XhoI로 제한시켰다. 정제된 벡터 백본을 PCR 단편에 리게이팅시켜 플라스미드 JNW314를 생성시켰다. 제한 검정 및 형광 시퀀싱으로 정확한 단편의 존재 여부를 확인하였다.

동시에, 5' UTR을 제거하고, 최적 Kozak 서열로 대체시키고, 제한 효소 부위를 개질시켰다. JNW278을 NheI-XhoI로 제한하여 전체 MUC-1 cDNA 서열을 제거하였다. MUC-1의 단편을 PCR 프라이머 2060MUC1 및 2061MUC1(부록 A)으로 PCR 증폭시키고, NheI 및 XhoI로 제한시키고, 벡터 백본에 리게이팅시켜 플라스미드 JNW294를 생성시켰다.

클로닝의 다음 단계에서, JNW294를 BsaMI로 제한시키고, 두개의 단편을 방출시켰다 (약, 2.3kbp 및 3.2kbp). 더 커진 이들 두 단편(단편 A)을 분리하고, 정제하였다. 동시에, JNW314를 BsaMI로 제한하고, 더 큰 두 단편(단편 B, 약 7kbp 크기)을 분리하고 정제하였다. 단편 A 및 B를 함께 리게이팅시켜 플라스미드 JNW340을 생성시켰다. Nhe-XhoI 및 별도로 XbaI를 사용하여 제한 맵핑시켜 정확한 방향을 확인하였다.

클로닝의 최종 단계에서, 발현 카세트를 NheI 및 XhoI 제한 효소로 JNW340으로부터 분리시키고, 약 4kbp의 단편을 방출시켰다. 발현 플라스미드 pVAC1(Thomsen Immunology 95: 51OP106, 1998)을 NheI-XhoI로 제한시키고, MUC-1 카세트로 리게이팅시켜, 전체 길이의 MUC-1 발현 플라스미드 JNW358을 생성시켰다. CMV 프로모터에 대한 MUC-1 서열의 정방향은 제한 효소 및 형광 시퀀싱에 의해 확인하였다. MUC-1 발현 카세트의 서열은 도 3에 도시되어 있다.

1.3. 하나의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 벡터의 작제

하나의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 발현 카세트의 작제에 대한 출발점은 JNW278이다. 고도로 반복적인 VNTR DNA의 독특한 특성은 반복 유닛 각각에 FseI 제한 부위가 존재한다는 점이다. JNW278을 FseI를 사용하여 완전하게 제한 분해시켜, 벡터 백본을 분리하고, 다시 리게이팅시켜 플라스미드 JNW283을 생성시켰다. 단일 VNTR 유닛의 존재를 제한 검정, PCR 및 형광 시퀀싱에 의해 확인하였다. JNW283의 MUC-1 서열은 도 2에 도시되어 있다.

1.4. 하나의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 발현 벡터의 작제

하나의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 카세트를 JNW283으로부터 발현 플라스미드 pVAC로 이동시키기 위해, 하기 클로닝 단계를 수행하였다. 클로닝의 제 1 단계는 5' 및 3'의 비번역된 영역(UTR)을 제거하고, 개질된 제한 효소 부위로 대체하여, 앞으로의 클로닝 공정을 용이하게 하는 것을 포함한다. MUC-1의 단편을 주형으로서 JNW283을 사용하여 프라이머 2060MUC1 및 2062MUC1으로 PCR 증폭시키고, NheI 및 XhoI를 사용하여 제한시켰다. 동시에,

플라스미드 pVAC를 NheI 및 XhoI를 사용하여 제한시켰다. 정제된 벡터 백본을 PCR 단편에 리게이팅시켜 플라스미드 JNW322를 생성시켰다. 정확한 단편의 존재를 제한 검정 및 형광 시퀀싱에 의해 확인하였다.

1.5 소수의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 카세트의 작제

소수의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 발현 카세트의 작제의 출발점은 JNW283이며, 이를 FseI를 사용하여 선형화시켰다. 플라스미드 JNW278을 FseI로 부분적으로 분해하여 VNTR 유닛을 생성시켜 하나의 VNTR 유닛에 상응하는 60bp 내지 7개의 VNTR 유닛에 상응하는 약 420bp의 다양한 크기의 짧은 단편의 래더(ladder)를 방출시켰다. JNW278의 부분 분해에 의해 생성된 VNTR 단편의 래더는 도 7에 도시되어 있다. 60-500bp의 단편을 겔 추출에 의해 정제하고, FseI-선형화된 JNW283에 리게이팅시켰다. MUC-1의 VNTR 영역의 각각의 5' 및 3'에 위치하는 프라이머 2005MUC1 및 2013MUC1을 사용하여 PCR에 의해 클론을 먼저 스크리닝하였다. 다중의 VNTR 유닛을 함유하는 클론이 JNW283의 하나의 VNTR 유닛에 상응하는 PCR 단편 보다 더 큰 PCR 단편을 생성할 수 있는 방식으로 PCR을 시작하였다. PCR 파지티브 클론을 제한 분해 및 형광 시퀀싱에 의해 추가의 검정을 수행하여 존재하는 VNTR 유닛의 수를 확인하였다. 이러한 프로토콜을 이용하여, 총 7개의 VNTR 유닛을 갖는 JNW319 및 2개의 VNTR 유닛을 갖는 JNW321을 포함하는 많은 상이한 플라스미드를 수득하였다. JNW319 및 JNW321의 서열은 도 4 및 5에 도시되어 있다. JNW319의 VNTR 유닛은 더 큰 군집중에 존재하는 다형성을 나타낸다(별표로 표시).

1.6 7개의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 발현 벡터의 작제

7개의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 카세트를 발현 플라스미드 pVAC로 이동시키기 위해, 하기 클로닝 단계를 수행하였다. 클로닝의 제 1 단계는 3'의 비번역된 영역(UTR)을 제거하고, 개질된 제한 효소 부위로 대체하여, 앞으로의 클로닝 공정을 용이하게 하는 것을 포함한다. MUC-1의 단편을 주형으로서 JNW278을 사용하여 프라이머 2062MUC1 및 2063MUC1으로 PCR 증폭시키고, BstXI 및 XhoI를 사용하여 제한시켰다. 동시에, 플라스미드 JNW319를 BstXI 및 XhoI를 사용하여 제한시켰다. 정제된 벡터 백본을 PCR 단편에 리게이팅시켜 플라스미드 JNW622를 생성시켰다. 정확한 단편의 존재를 제한 검정 및 형광 시퀀싱에 의해 확인하였다.

클로닝의 다음 단계에서, JNW294를 BsaMI로 제한시키고, 두개의 단편을 방출시켰다 (약, 2.3kbp 및 3.2kbp). 더 커진 이들 두 단편(단편 A)을 분리하고, 정제하였다. 동시에, JNW622를 BsaMI로 제한하고, 더 큰 두 단편(단편 C, 약 4 kbp 크기)을 분리하고 정제하였다. 단편 A 및 C를 함께 리게이팅시켜 플라스미드 JNW640을 생성시켰다. XbaI를 사용한 제한 맵핑 및 형광 시퀀싱에 의해 정확한 방향을 확인하였다. 클로닝의 최종 단계에서, JNW640으로부터의 MUC-1 카세트를 NheI 및 XhoI로의 제한시켜 분리하고, pVAC(NheI 및 XhoI로 선형화됨)에 리게이팅시켜, 플라스미드 JNW656을 생성시켰다. MUC-1 발현 카세트 서열의 정확한 방향은 형광 시퀀싱에 의해 확인하였으며, 이는 도 6에 도시되어 있다.

1.7 VNTR 유닛의 정제

JNW278(FL-MUC1)을 FseI로 분해시킨 후, VNTR 래더를 방출시켰으며, 이는 60bp (하나의 VNTR 유닛에 상응) 내지 420bp (7개의 VNTR 유닛에 상응)이었다. 전기영동시킨 후, 단편을 아가로스 겔로부터 분리하고, 정제하였다. 도 8은 VNTR 유닛의 2개의 래더를 나타낸다. DNA 마커는 레인 A 및 D에 도시되어 있다. 레인 B는 60 내지 240bp의 VNTR 유닛을 나타내는 래더이다. 레인 C는 180 내지 420bp의 VNTR 유닛을 나타내는 래더이다. 그 후, 이들 단편을 FseI-선형화된 JNW283에 리 게이팅시켜 2 및 7개의 VNTR 유닛을 함유하는 MUC-1 유전자를 확립시켰다. 3, 4, 5 또는 6개의 VNTR 유닛을 함유하는 기타 작제물이 유사한 형태로 제조될 수 있다 (도 7 참조).

2: 연속 유전자의 건 면역화를 위한 작제물의 제조

염화칼슘 및 스페르미딘을 사용하여 플라스미드 DNA를 2㎛ 직경의 금 비드상에 침전시켰다. 로딩된 비드를 문헌[Eisenbraum et al, 1993; Pertmer et al, 1996]에 기술된 바와 같이 Tefzel 튜빙상으로 코팅시켰다. 액셀 유전자 전달 시스템(Accell gene delivery system: PCT WO 95/19799)을 사용하여 입자 폭탄을 수행하였다. 각각의 플라스미드에 있어서, 암컷 C56Bl/6 마우스를 0일, 21일 및 42일째에 플라스미드를 3회 투여하여 면역화시켰다. 각각의 투여는 총 약 4 내지 5㎍ 투여량의 플라스미드를 제공하는 DNA/금으로의 2회 폭탄으로 구성된다.

2.1 근내(i.m.) DNA 면역화

암컷 C57Bl/6 마우스의 뒷다리를 PBS중의 DNA 50㎍으로 0일, 21일 및 42일째에 근내로 면역화시켰다.

2.2 종양 세포 주입

두 세트의 종양 퇴화 실험을 수행하였으며, 첫 번째 실험에서는 마지막 면역화 후 2째에 마취시킨 마우스의 오른쪽

옆구리에 0.5x10 ^{6} 종양 세포를 피하내로 주입하였다. 두 번째 실험에서는, 더욱 공격적인 모델을 사용하였으며, 여기서 동물에 1.0x10 ^{6} 종양을 주입하였다. 두가지 치수의 버니아 캘리퍼스(vernier calipers) 를 사용하여 일주에 2회 종양 성장을 모니터하였다. 종양 부피를 (a x b ^{2})/2로 계산하였으며, 여기서 a는 가장 큰 직경을 나타내며, b는 가장 작은 직경을 나타낸다. 실험의 종료점(치사점)은 종량 직경이 15mm에 도달하는 시점으로서 규정하였다.

3: 작제물의 테스트

3.1.1 재료 및 방법

B16F0 및 B16F0-MUC1 종양 세포

인간 cDNA MUC-1에 대한 발현 벡터로 트랜스펙션시킨 B16F0(쥐과 전이성 흑색종)을 글락소 웰검 유에스로부터 수득하였다. 세포를 10% 열 불화성화된 소태 혈청, 2mM L-글루타민, 100U/ml 페니실린, 100μg/ml 스트렙토마이신 및 1mg/ml의 네오마이신 항생제(G148)로 보충된 DMEM중에 부착성 단일층으로서 배양시켰다. ELISPOT 검정에 사용하기 위해, 세포를 베르센(Versene)을 사용하여 플라스크로부터 제거하고, 조사시켰다(16,000Rads).

3.1.2 EL4 종양 세포 발현 MUC-1의 작제

EL4 세포를 10% FCS, 100U/ml 페니실린, 100μg/ml 스트렙토마이신, 2mM L-글루타민, 50μM 2-메르캅토에탄올을 함유하는 RPMI 완전 배지중에서 배양시켰다. JNW278(전체 길이의 MUC-1)을 FspI로 선형화시키고, 페놀:클로로포름:이소-아밀 알코올(25:24:1) 추출에 의해 정제하고, 에탄올 침전시켰다. 0.5ml RPMI 완전 배지중의 2x10 ^{7} 세포를 0.4mm BIORAD 큐벳중의 20μg의 선형화된 DNA와 혼합시켰다. 세 포를 320V, 960μF에서 일렉트로포레이션에 의해 트랜스펙션시켰다. 일렉트로포레이션 후, 세포 현탁물을 30ml의 사전 가온시킨 RPMI 완전 배지에 이동시키고, 24시간 동안 인큐베이션시켜 회수하였다. 세포를 500μg/ml의 히그로마이신을 함유하는 RPMI 완전 배지중의 선택적으로 배치시키고, 7 내지 10시간 동안 인큐베이션시켰다. 생존 세포를 500μg/ml 히드로마이신을 포함하는 200μℓ의 RPMI 완전 배지중에 0.5세포/웰로 96-웰 U-바닥 플레이트로 희석시켰다. 8 내지 10일 후에, 클론을 24-웰 플레이트로 이동시켰다. 이 단계에서, MUC-1 발현 프로파일을 유세포 측정에 의해 평가하고, 파지티브의 균일한 클론을 추가의 검정을 위해 유지시켰다.

3.2 MUC-1 유전자 생성물에 대한 T 세포 반응의 Elispot 검정

3.2.1 스플레노사이트의 제조

스플린(spleen)을 투여 후 7일째에 면역화된 동물로부터 28일 또는 49일째에 수득하였다. 스플린을 유리 슬라이드 사이에서 으깨서 세포 현탁물을 생성시켰다. 적혈구 세포를 염화암모늄 처리하여 분해시키고, 잔재를 제거하여 정제된 스플레노사이트 현탁액만 남겼다. 세포를 ELISPOT 검정에 사용하기 위해 RPMI 완전 배지중에 8x10 ^{6} /ml의 농도로 재현탁시켰다.

3.3 펩티드 라이브러리의 스크리닝

MUC-1의 전체 서열을 포함하는 펩티드 라이브러리를 미모토프(Mimotopes)로부터 구입하였다. 라이브러리는 MUC-1의 전체 서열(1 복사체의 반복유전자의 반복부)을 포함하는 11개 아미노산 펩티드와 중복되는 116개의 15mer 펩티드를 함유하 였다. 펩티드는 184 내지 299개로 나타낸다. 펩티드 라이브러리를 스크리닝하기 위해, 하기 기술된 프로토콜을 이용하여 INFγ 및 IL-2 ELISPOTS의 최종 농도로 펩티드를 사용하였다. IFNγ ELISPOTS에 있어서, Il-2를 10ng/ml로 검정용 물질에 첨가하였다. 스크리닝에 사용된 스플레노사이트는 0일, 21일 및 42일째에 FL MUC1으로 면역화시킨 C57BL/6 마우스 또는 CBA 마우스로부터 49일째에 취하였다.

3.4 에피토프 맵핑

C57BL/6 마우스에서 우수한 반응성을 나타내는 두개의 MUC-1 영역을 추가의 연구를 위해 선택하였다. 유세포 측정(하기 프로토콜)에 따르면, 이들 펩티드에 대한 반응에서 IFNγ을 생성시키는 세포는 CD8 세포인 것으로 나타났다. 에피토프를 맵핑하기 위해, 각각 7 또는 8개 아미노산에 의해 중복되는 추가의 8 및 9mer 펩티드를 미모토프로부터 순서대로 정렬시켰다. 상기 상세하게 기술된 바와 같이 면역화시킨 동물로부터의 스플레노사이트를 사용하여 IFNγ ELISPOT에서 테스트하였다. 두개의 면역우성 펩티드 SAPDNRPAL 및 PTTLASHS를 확인하였다.

3.5 ELISPOT 검정

플레이트를 15μg/ml (PBS 중) 래트 항 마우스 IFNγ 또는 래트 항 마우스 IL-2(Pharmingen)으로 코팅하였다. 플레이트를 밤새 +4℃에서 밤새 코팅시켰다. 사용하기 전에, 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. 스플레노사이트를 4x10 ^{5} 세포/웰에서 플레이트에 첨가하였다. 펩티드 SAPDNRPAL을 10nM의 최종 농도로 검정에 사용하였다. 펩티드 PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV(25mer 펩티드)를 25μM의 최종 농 도로 사용하였다. 이들 펩티드를 게넴드 신세시스(Genemed Synthesis)로부터 수득하였다. 라이브러리 스크리닝 및 에피토프 맵핑 연구로부터 확인된 펩티드를 ELISPOT 검정에 사용하였다: 10μM의 203(DVTLAPATEPATEPA), 10μM의 299(LSYTNPAVAATSANL), 1μM의 PTTLASHS(미모토프). 조사처리된 종양 세포 B16, B16-MUC1 및 EL4, EL4-278을 1:4의 종양 세포:이펙터에서 사용하였다. ELISPOT 검정을 IL-2(10ng/ml), IL-7(10ng/ml)의 존재하에 또는 사이토카인의 부재하에 수행하였다. 각 웰중의 총 부피는 200μℓ이었다. 펩티드 자극된 세포를 함유하는 플레이트를 가습화된 37℃ 인큐베이터에서 16시간 동안 인큐베이션시킨 반면, 자극제로서 종양 세포를 함유하는 플레이트는 40시간 동안 인큐베이션시켰다.

3.5.1 ELISPOT 검정 플레이트의 현상

세포를 물로 1회 세척하고(1분 동안 침수시켜 세포의 분해를 확실히함), PBS로 3회 세척하므로써 플레이트로부터 제거하였다. 비오틴 컨쥬게이팅된 래트 항 마우스 IFNγ 또는 IL-2(Phamingen)을 PBS중에 1μg/ml로 첨가하였다. 플레이트를 2시간 동안 실온에서 교란시키므로써 인큐베이션시켰다. 그 후, 플레이트를 1/1000 희석비로 스트렙타비딘 알칼리 포스파타아제(Caltag)를 첨가하기 전에 PBS로 3회 세척하였다. PBS중에 3회 세척한 후, BCICP 기질(Biorad)와 15 내지 45분 동안 인큐베이션시켜 스팟이 나타나게 하였다. 기질을 물로 세척한 후, 플레이트를 건조시켰다. 브라이언 하이스(Brian Hayes, Asthma Cell Biology unit, GSK)에 의해 고안된 이미지 분석 시스템을 사용하여 스팟을 계수하였다.

3.6 펩티드 자극에 대한 반응에서 T 세포로부터의 IFNγ 생성을 검출하기 위한 유세포 측정

스플레노사이트를 4x10 ^{6} /ml로 재현탁시켰다. 펩티드를 10μM의 최종 농도로 첨가하고, IL-2를 10ng/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션시키고, 브레펠딘(Brefeldin) A를 10μg/ml로 첨가하고, 밤새 인큐베이션시켰다. 세포를 FACS 완충액(PBS+2.5% FCS + 0.1% 아지드)으로 세척하고, 항 CD4 시크롬 및 항 CD8 FITS(Pharmingen)으로 염색시켰다. 세포를 세척하고, 칼태그 픽스 앤 펌 키트(Caltag Fix and Perm kit)로부터의 배지 A로 고정시킨 후, 세척하고 상기 픽스 앤 펌 키트로부터의 배지 B에서 희석시킨 항 IFNγ PE(Pharmingen)을 첨가하였다. 30분 동안 인큐베이션 시킨 후, 세포를 세척하고, FACSCAN을 사용하여 검정하였다. 샘플당 총 500,000의 세포를 모은 후, CD4 및 CD8 세포를 게이팅시켜 각 펩티드에 대한 반응에서 IFNγ를 분비하는 세포의 군집을 측정하였다.

3.7 MUC-1 유전자 생성물에 대한 항체의 ELISA 검정

혈청 샘플을 1, 21, 49 및 56일째에 정맥천자에 의해 동물로부터 수득하고, 항-MUC-1 항체의 존재하에 검정하였다. ELISA를 3μg/ml의 야생형 MUC-01 펩티드 서열(2개의 연결된 임의 반복 서열에 사용하는 40-mer, PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP)로 4℃에서 밤새 피복된 눙크 막시소프 플레이트(Nunc Maxisorp plate)를 사용하여 수행하였다. TBS-트윈(Tris-완충된 염수, pH 7.4, 0.05% 트윈 20 함유)으로 세척한 후, 플레이트를 실온하에 2시간 동안 TBS-트윈 완충액중의 3% BSA로 차단하였다. 모든 혈청을 1시간 동안 실온에서 TBS-트윈 완충액중에서 1:100 희석비로 인큐베이션하였다. TBS-트윈 완충액중에서 1:2000 희석비로 HRP-컨주게이팅된 래빗 항-마우스 면역글로붙린(#p0260, Dako)를 사용하여 항체 결합을 검출하였다. 플레이트를 다시 세척한 후, 패스트 OPD(Fast OPD) 착색제(Sigma, UK)를 사용하여 결합된 컨주게이트를 검출하였다. 3M 황산을 첨가하여 반응을 중단시키고, 490nm에서의 흡광도를 측정하므로써 OPD 생성물을 적량하였다.

3.8 면역화된 마우스로부터의 혈청의 유세포 측정 검사

이러한 백신에 의해 자극된 항체가 종양 세포를 인식할 수 있다는 것을 입증하기 위해, PMID 면역화된 마우스로부터의 항혈청 샘플을 사용하여 다양한 종양 세포주를 라벨링시키고, 이러한 라벨링을 유세포 측정기로 가시화시켰다. 세포(T47-D, MCF-7, EL4, EL4-278, B16F0 및 B16F0MUC1; 1x10 ^{6})를 5% FCS가 보충된 PBS 완충액으로 세척하고, 1:100 희석비로 마우스 혈청과 15분 동안 4℃에서 인큐베이션시켰다. 세척 후, 세포를 동일한 조건하에 이차 항체(양 항마우스 IgG, Dako, Denmark, 1:50 희석비)와 인큐베이션시켰다. 대조군 세포를 제 1 단계 항체 대신에 FACS 완충액과 인큐베이션시킨 후, 이차 단계 시약으로 염색시켰다. FACS 검정을 FACScan(Becton Dickinson)을 사용하여 수행하였다. 샘플당 1000-10000 세포를 동시에 FSC(전방 광 산란)과 SSC(집적 광 산란) 및 그린 (FL1) 형광(집적 형광의 대수로서 나타냄)에 대해 동시에 측정하였다. FCS가 범위를 벗어난 집합체를 제외 하고 기록을 수행하였다. 데이타는, 세포의 수(Y축) 대 종양 세포의 표면에 결합된 마우스 혈청의 상이한 유형에 대한 형광 강도(X축)로 플로팅한 막대그래프로서 나타내었다.

3.9 일시적 트랜스펙션 검정

다양한 DNA 작제물로부터의 MUC-1 발현은, CHO(차이니즈 햄스터 난소) 세포로 플라스미드를 일시적 트랜스펙션시킨 후, 총 세포 단백질에 대해 웨스턴 블롯팅하거나, MUC-1 발현된 세포막의 유세포 측정 검정에 의해 검정하였다. 일시적 트랜스펙션은, 제작업자의 설명에 따라 트랜스펙탐 시약(Transfectam reagent: Promega)로 수행하였다. 간단하게는, 24-웰 조직 배양 플레이트에 1ml DMEM 완전 배지(DMEM, 10% FCS, 2mM L-글루타민, 페니실린 100IU/ml, 스트렙토마이신 100μg/ml)중에서 웰당 5x10 ^{4} CHO로 시딩하고, 16시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 0.5μg DNA를 25μℓ의 0.3M NaCl(하나의 웰에 대해 충분히)에 첨가하고, 2μℓ의 트랜스펙탐을 25μℓ의 밀리-큐(Milli-Q)에 첨가하였다. DNA 및 트랜스펙탐 용액을 완만하게 혼합시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 이러한 인큐베이션 단계 동안, 세포를 PBS중에 1회 세척하고, 150μℓ의 혈청 비함유 배지(DMEM, 2mM L-글루타민)으로 커버링하였다. DNA-트랜스펙탐 용액을 세포에 적가하고, 플레이트를 완만하게 쉐이킹시키고, 37°C에서 4 내지 6시간 동안 인큐베이션시켰다. 500μℓ의 DMEM 완전 배지를 첨가하고, 추가로 48 내지 72시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

3.10 MUC-1 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시킨 CHO 세포의 유세포 측정 검정

일시적 트랜스펙션 후, CHO 세포를 PBS로 1회 세척하고, 베르센(1:5000)/0.025% 트립신 용액으로 처리하여 세포를 현탁액중으로 이동시켰다. 트립신화시킨 후, CHO 세포를 펠레팅시키고, FACS 완충액(PBS, 4% FCS, 0.01% 나트륨 아지드)에 재현탁시켰다. 일차 항체인 ATR1을 15μg/ml의 최종 농도로 첨가하고, 샘플을 15분 동안 얼음상에서 인큐베이션시켰다. 대조군 세포를 ATR1의 부재하에 FACS 완충액으로 인큐베이션시켰다. 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하고, 이차 항체 염소 항-마우스 면역글로불린 FITC 컨주게이팅된 $F(ab')_2$ (Dako, F0479) 10μℓ를 함유하는 100μℓ의 FACS 완충액중에 재현탁시키고, 얼음상에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 이차 항체 염색 후, 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하였다. FACS 검정은, FACScan(Becton Dickinson)을 사용하여 수행하였다. 샘플당 1000 내지 10000 세포를 FSC(정방 광 산란)과 SCC(집적 광 산란) 및 그린(FL1) 형광(집적된 형광의 대수로서 나타냄)에 대해 동시에 측정하였다. FCS가 범위를 벗어난 집합체를 제외하고 기록을 수행하였다. 데이타는, 세포 수(Y축) 대 형광 강도(X축)으로서 플로팅된 막대 그래프로 나타내었다.

3.11 MUC-1 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션된 CHO 새포의 웨스턴 블롯 검정

일시적으로 트랜스펙션된 CHO 세포를 PBS로 세척하고, 베르센 (1:5000)/0.025% 트립신 용액으로 처리하여 세포를 현탁액에 이동시켰다. 트립신화시킨 후, CHO 세포를 펠렛팅화시키고, 50μℓ의 PBS중에 재현탁시켰다. 50mM DTT를 함유하는 동일한 용량의 2x TRIS-글리신 SDS 샘플 완충액(Invitrogen)을 첨가하고, 용액을 95°C로 5분 동안 가열하였다. 1 내지 20μℓ의 샘플을 4 내지 20% TRIS-글리신 겔 1.5mm(Invitrogen)상으로 로딩시키고, 1x TRIS-글리신 완충액(Invitrogen)중에서 90분 동안 동일한 전압(125V)으로 전기영동시켰다. 사전 염색된 넓은 범위의 마커(New England Biolabs, #P7708S)를 사용하여 샘플을 크기에 따라 분류하였다. 전기영동시킨 후, 샘플을 20% 메탄올을 함유하는 1x 트랜스퍼 완충액(Invitrogen), Xcell III 블롯 모듈(Invitrogen)을 사용하여 메탄올중에 사전 습식처리된 임모빌론-P(Immobilon-P) PVDF 막(Millipore)으로 25V의 일정 전압하에 90분 동안 이동시켰다. 막을, 3% 건조되고, 피막생성된 우유(Marvel)를 함유하는 TBS-트윈(트리스-완충된 염수, pH7.4, 0.05% 트윈 20 함유)중에서 4°C에서 밤새 차단하였다. 일차 항체(ATR1)을 1:100으로 희석시키고, 1시간 동안 실온에서 막과 인큐베이션시켰다. TBS-트윈으로 충분히 세척한 후, 이차 항체를 3% 건조되고 피막생성된 우유를 함유하는 TBS-트윈중에 1:2000으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 막과 인큐베이션시켰다. 충분히 세척한 후, 막을 5분 동안 슈퍼시그널 웨스트 피코 케미일루미센트 기질(Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate)(Pierce)과 인큐베이션시켰다. 과량의 액체를 제거하고, 막을 2 시트의 클링 필름 사이로 밀봉시키고, 1 내지 30분 동안 하이퍼필름 ECL(Hyperfilm ECL) 필름에 노출시켰다.

4. 결과

4.1 유전자 건과 근내 주입의 비교

플라스미드 pcDNA3-FL-MUC1중의 FL-MUC1 발현 카세트를 PMID 및 근내 주입에 의해 마우스에 투여하였다.

4.2 항체 반응의 비교

근내 주입(마우스 A-C) 및 PMID(마우스 D-F)에 의해 면역화시킨 후의 항-MUC1 항체 반응을 도 9에 도시하였다. 결과는, PMID에 의한 투여가, 41일째에 3마리 마우스중 3마리가 더욱 신속한 반응성을 갖는 더욱 강한 항체 반응을 유도하였음을 보여준다. 반대로, 근내 투여로 면역화된 마우스는 단지 한마리만이 41일째에 우수한 항체 반응을 나타내었다. 추가의 투여 후, 42일째에 3마리중 2마리 마우스만이 PMID 면역화된 마우스의 항체에 필적하는 MUC-1 항체 수준을 나타내었다.

4.3 세포 반응의 비교

pcDNA3 (빈 벡터) 또는 pcDNA3-FL-MUC1으로 0일째에 일차 면역화시키고, 21일 및 42일째에 2차 투여에 의해, PMID 또는 근내(IM) 면역화시킨 세포 반응을 ELISPOT에 의해 검정하였다. 두번째 투여 후 13일째에 분석을 수행하였다. 스플레노사이트를 우수한 H-2Kb 에피토프로서 종래 문헌에 기술된 펩티드 SAPDTRPAP(9.1)로 자극하였다. 도 10의 IFNγ 반응은, PMID에 의해 면역화시킨 마우스 100%가 펩티드에 검출가능한 반응을 나타내는 반면, 근내로 면역화시킨 마우스에서는 관찰되지 않는다는 보여준다.

4.4 MUC-1 작제물의 실험관내 발현 - 웨스턴 블롯

도 11은 다양한 MUC-1 작제물을 CHO 세포로 일시적 트랜스펙션시킨 후 MUC-1에 대한 총 세포 단백질의 웨스턴 블롯의 결과를 나타낸다. 데이타는, FL-MUC1 작제물(JNW358)이 83 내지 175kDa의 얼룩(smear)을 생성시켰음을 보여주고, 이는 예상 분자량이 108kDa이며, 이종성이나 글리코실화가 광대하게 발생한 VNTR 구조에 상응한다. 7x VNTR MUC-1 작제물(JNW656)은 약 ~65kDa을 중심으로 더욱 집중된 얼룩을 생성시켰으며, 이는 예상 분자량이 61kDa이며, 이종성의 글리코실화된 VNTR 구조에 상응한다. 1x VNTR MUC-1 작제물(JNW332)는 ~40kDa의 희미한 단일 밴드를 생성시켰으며, 이는 단지 단일 VNTR 유닛이 존재한다는 것에 상응한다.

4.5 MUC-1 작제물의 실험관내 발현 - 유세포 측정

CHO 세포로 MUC-1 작제물을 일시적으로 트랜스펙션시킨 후, 세포 표면상의 MUC-1의 발현을, MUC-1 VNTR 특이적 항체 ATR1을 사용하여 유세포 측정에 의해 평가하였다. MUC-1 파지티브 세포의 백분율은 FL-MUC1(JNW358)로 트랜스펙션된 샘플에 있어서는 9.6%, 7x VNTR MUC-1으로 트랜스펙션된 샘플에 있어서는 8.8%, 1x VNTR MUC-1(JNW332)로 트랜스펙션된 샘플에 있어서는 9.8%이였다. 이러한 데이타는, VNTR의 수가 세포 표면으로 전위시키는 MUC-1의 능력에 영향을 기치지 않아, 항체 ATR1에 의해 검출될 수 있다는 것을 시사한다.

4.6 PMID 면역화 후 FL-MUC1, 7x VNTR MUC-1 및 1x VNTR MUC-1에 대한 항체 반응

pVAC (빈 벡터), JNW358 (FL-MUC1), JNW656 (7x VNTR MUC-1) 및 JNW332 (1x VNTR MUC-1)으로 면역화시킨 후의 항체 반응을 0일째에 PMID로 일차 면역화시키고, 21일 및 42일째에 이차 투여한 후에 ELISA로 평가하였다. 도 12는 56일째에 취해진 혈청으로부터의 항체 반응을 나타낸다. 빈 벡터에 대한 MUC1-특이적 반응이 발견되지 않은 반면, FL-MUC1 작제물 및 7x VNTR-MUC-1 작제물은 강하고, 유사한 역가의 MUC1-특이적 항체를 생성시켰다. 반대로, 1x VNTR MUC-1 작제물은 더 낮은 역가의 항체 반응을 유도하였다. 도 12b는 FL-MUC1 및 7x VNTR MUC-1에 대한 항체 반응의 반응성은 매우 유사한 반면, 1x VNTR MUC-1에 대한 반응이 더욱 느리게 나타나며, 플라토(plateau)에 도달하기 위해서는 42일째의 2차 투여가 요구된다. 이러한 데이타는, 주요 VNTR 유닛의 결실이 강한 MUC-1 특이적 항체 반응을 유도하는데 불리하지 않다는 것을 확인시켜준다. 그러나, 1x VNTR MUC-1에 대한 항체 반응은 징후의 정도 및 반응성 둘 모두에 있어서 부최적이다.

4.7 MUC-1 면역화된 마우스로부터 혈청에 의해 MUC1-발현하는 종양 세포의 인식

FL-MUC1, 7x VNTR MUC-1 및 1x VNTR MUC-1에 의해 유도된 항체가 종양 세포상에서 발현된 인간 MUC-1 형태를 인식할 수 있다는 것을 확인하기 위해, 면역화된 마우스로부터의 혈청을 유세포 측정으로 테스트하였다. 표적 세포는, 인간 MUC-1을 발현하도록 조작된 종양 세포주인 B16F0MUC1이다. 도 13에 도시된 결과는, FL-MUC1 면역화된 마우스(JNW358), 7x VNTR MUC-1 면역화된 마우스(JNW656) 및 1x VNTR MUC-1 면역화된 마우스(JNW332)로부터의 혈청은 B16F0MUC1상에 발현된 MUC-1을 인식할 수 있는 능력이 동일하여, 다수의 VNTR 유닛의 제거가 생리학적으로 관련된 항체 반응의 유도에 악영향을 끼치지 않는다는 것을 확인시켜 준다.

4.8 MUC-1 펩티드 라이브러리의 스크리닝에 의한 C57BL/6 마우스에서 MUC-1으로부터의 신규한 T 세포 에피토프의 확인

0일째에 PMID에 의해 JNW358(FL-MUC1)으로 면역화시키고, 21일 및 42일째에 2회 투여한 후, ELISPOT 검정을 49일째에 수행하였다. 10μM의 최종 농도로 FL-MUC1 라이브러리로부터의 펩티드를 시험하였다. 초기 스트린으로부터, 여러 그룹의 15mer 펩티드가 IFNγ 또는 IL-2 분비를 자극하는 것으로 밝혀졌다. 관심있는 영역을 도 20에서 마킹하였다. 세포간 사이토카인 염색 및 유세포 측정에 의해 IFNγ 분비를 자극하는 펩티드를 추가로 연구하여 관심 영역이 CD4 및 CD8 에피토프를 함유하는 지의 여부를 측정하였다. 펩티드 223, 224, 225, 238 및 239가 CD8 세포로부터 우수한 IFNγ 분비를 유도하는 것으로 밝혀졌다. CD8 에피토프를 추가로 맵핑하기 위해, 7 또는 8개 아미노산에 의해 중복되는 8 및 9mer 펩티드를 수득하였다. 이를 IFNγ ELISPOT 검정에서 테스트하고, 후속적으로 유세포 측정에 의해 여러 반응성을 시험하였다. 영역 223 내지 225는 CD8 에피토프의 클러스터를 함유하였다. 적정화에 의해, 우세 펩티드는 SAPDNRPAL인 것으로 나타났으며, 이러한 펩티드는 이미 MUC-1 특이적 반응을 측정하기 위해 서로 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 영역의 여러 신규한 펩티드가 10μM 이하로 CD8 세포에 의한 IFNγ분비를 유도하는 것으로 확인되었다. 본 발명자들은 이들중 하나인 TSAPDNRPA가 실험관내에서 세포독성 T 세포를 유도

할 수 있다는 것을 확인하였다(데이타 미도시됨). 영역 238 내지 239는 후에 MUC-1 검정에 사용한 하나의 강한 CD 8 에피토프인 PTTLASHS, 및 여러 약한 CD8 에피토프를 함유하는 것으로 나타났다.

4.9 PMID 면역화 후 FL-MUC1, 7x VNTR MUC-1 및 1VNTR MUC-1에 대한 세포 반응

pVAC(빈 벡터), JNW358(FL-MUC1), JNW656(7x VNTR MUC-1) 및 JNW332(1x VNTR MUC1)으로 면역화시킨 후의 세포 반응을, 0일째에 PMID에 의해 일차 면역화시킨 후 21일 및 42일째에서 2회 투여한 후 ELISPOT에 의해 분석하였다. 검정은 투여 후 7일에 수행하였다. 세가지의 검정 조건이 사용되었다: 1) MUC-1 발현 종양 세포인 B16-MUC1 및 EL4-MUC1으로서, 이들은 넓은 항-종양 세포 반응을 입증하는데 사용됨, 2) SAPDNRPAL 펩티드로서, MUC-1의 VNTR 영역 밖에서 친화도가 높은 펩티드 (사용된 모든 작제물중 한번만 나타남), 3) VNTR 영역으로부터 전체 반복부 및 근접한 반복부로부터 추가의 5개 아미노산을 포함하는 서열을 코드화하는 25mer 펩티드. 이들 펩티드는 면역화된 스플레노사이트로부터의 IL-2 생성물을 우세하게 유도한다. FL-MUC1 작제물, 7x VNTR-MUC1 및 1x VNTR-MUC1 작제물은 시험된 모든 자극제에 대한 강하고 유사한 MUC-1-특이적 세포 반응을 유도하였다 (도 14). SAPDNRPAL 펩티드의 경우, 본 발명자들은 IFNγ가 CD8 세포에 의해 생성되는 반면, 종양 세포에 대한 IFNγ 생성 및 25mer 펩티드에 대한 IL-2 생성은 CD4 또는 CD8 세포로부터 유도될 수 있다는 것을 확인하였다. 이러한 데이타는, 대부분의 VNTR 유닛의 결실이 VNTR 영역 내부 또는 외부의 에피토프에 대한 강한 MUC-1-특이적 세포 반응을 유도하는데 악영향을 끼치지 않는다는 것을 확인시켜 준다.

4.10 종양 자극 후 보호(PMID 대 I.M) 비교

PMID 또는 근내 주입에 의해 MUC-1 발현 플라스미드 pcDNA3-FL-MUC-1 또는 빈 벡터 pcDNA3.1의 3회 투여 후, 마우스를 MUC-1-발현 종양 세포(B16F0MUC1)으로 자극시켰다. 종양 비함유 마우스의 백분율은 도 15에 도시하였으며, 이는 PMID가 근내 주입에 의한 동일한 플라스미드의 전달과 비교하여 더 많은 수의 마우스에서 후속 종양 자극으로부터의 보호를 유도한다는 것을 분명히 입증시켜 준다. 상기 상세하게 기술된 항체 및 세포 반응과 관련된 이러한 데이타는, PMID가 개선된 종양 보호 프로파일과 관련하여 근내 전달보다는 더욱 강한 세포 및 항체 반응을 유도한다는 것을 시사한다.

4.11 종양 보호에서의 MUC-1 cDAN 작제물(F/L MUC-1 및 7 VNTR)의 효능

재료 및 방법에 기술된 바와 같이, 마우스를 빈 벡터(빈 pVAC) 또는 전체 길이의 MUC-1을 코드화하는 벡터(JNW358)로 면역화시켰다. 마지막 투여 후 2주째에, B16F0MUC1 세포로 종양 자극하고, 종양 성장을 모니터링하였다. 종양이 성장할 경우, 종양은 빈-백신접종된 군에 있어서는 종양 자극 후 약 10 내지 15일째에 나타났으며, FL-MUC1 백신접종된 군에 있어서는 약 22일째에 나타났다. 도 16a는 양 군에서 전체 길이 MUC-1을 코드화하는 벡터 또는 빈 벡터로 면역화시킨 마우스의 생존율을 비교하였다. 빈 벡터로 면역화시킨 마우스(20% 종양 비함유) 보다 FL-MUC1으로 면역화시킨 마우스(60% 종양 비함유)에서 현저하게 우수한 생존율을 나타내었다. 도 16b는 이전의 실험에서 보다 2x 양의 종양 세포(1.0×10^{6})에 대한 대조군과 FL-MUC1 및 7x VNTR의 종양 보호를 비교한 것이다. 양 MUC-1 작제물은 약 25일째까지는 대조군으로 백신접종된 군과 비교하여 현저하고 유사한 종양 성장 지 연을 유도하였다. 이 후에, 효과가 감소하였으며, 아미도 종양 항원에 대한 면역 반응의 고갈로 인한 것으로 여겨진다.

결론적으로, 7 VNTR x MUC-1 작제물은 매우 엄격한 조건하에서도 FL-MUC-1과 동일한 보호성 항-종양 반응을 제공한다.

4.12 재조합 백신 바이러스 시스템에서 FL 대 7VNTR MUC-1 안정도

전체 길이의 인간 MUC-1을 BamHI 단편으로서 벡터 pSC링커에 삽입하였다. 이러한 작제물을, 백신니아 바이러스 게놈의 TK(티미딘 키나아제) 유전자로의 벡터의 동종성 재조합에 의해 재조합 백신니아 바이러스를 생성시키는데 사용하였다.

재조합 바이러스를 HTK-세포의 세포 시이트상에 플레이팅시키고, 블루-갈(bluo-gal) 검정에 의해 베타-갈락토시다아제 활성에 대해 검정하였다. 베타-갈 유전자를 벡터에 이동시키고, 블루 플라그는 재조합 바이러스를 나타내었다. 블루-갈 검정이 수행할 경우 100%의 플라그가 블루 염색을 유도할때까지 많은 블루 플라그를 선택하고, 클로닝시켰다.

이중 6개의 클론을 10회의 다수 감염으로 HTK-세포를 감염시키는데 사용하고, 세포를 감염 후 6시간, 24시간 및 32시간에 채취하였다. 세포를 200㎕의 배지에 재현탁시키고, 40㎕를 제거하고, SDS-PAGE 로딩 완충액과 혼합하였다.

이러한 세포 추출물을 SDS PAGE 겔상에서 전기영동시키고, MUC-1의 VNTR 영역내의 에피토프를 인지하는 모노

클로날 항체 ATR1 및 HMFG1을 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검정하였다. 재조합 바이러스 감염된 샘플 어느 것도 이들 항체로 염색되지 않아다. pVAC-7VNTRMUC1으로 트랜스펙션된 세포의 대조군 세포 추출물을, TR 에피토프의 존재를 나타내는 밝은색 밴드로 염색시켰다. 항 베타-갈락톡시다아제 항체로 염색시키면, wt 바이러스 또는 세포 대조군을 제외한 재조합 바이러스로 감염시킨 모든 샘플에서의 베타-갈락톡시다아제의 발현을 나타내었다.

채취된 감염된 세포의 분자 검정은 PCR에 의해 수행하였다. 재조합 바이러스 게놈내에서 pSC11링커-FLMUC1 작제물의 다양한 부분의 존재를 나타낼, 프라이머 쌍을 선택하였다. 하기 프라이머 쌍을 선택하였다:

FMC101 + 2014MUC1 - 벡터와 MUC-1의 5' 말단 사이 접합

2008MUC1 + FMC102 - 벡터와 MUC-1의 3' 말단 사이 접합

2004MUC1 + 2014MUC1 - VNTR 영역의 MUC-1 5' 부분

2007MUC1 + 2009MUC1 - VNTR 영역의 MUC-1 3' 부분

FMC101 및 FMC102는 벡터 서열내의 프라이머이며, 링커 서열에 대해 각각 5' 및 3'에 위치한다.

FMC101: -CATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCG

FMC102: -GCCTCCTTAAAGCATTTCATACACACAGC

상기 도시된 4개의 PCR 반응은, 10분 동안 80℃로 가열시킨 후, 채취한 재조합 바이러스 감염된 세포(감염 후 32시간) 1㎕를 사용하여 수행하였다. 반응을 또한, wt 바이러스 감염된 세포 및 비감염된 세포의 샘플에서 수행하였다. 1ng의 pSC링커-FLMUC1 플라스미드 DNA의 파지티브 대조군이 또한 포함된다.

파지티브 대조군은 아가로스 겔상에서 전기영동시킬 경우 정확한 크기의 증복된 단편을 생성시킨다. 기타 샘플 어느 것도, 작제물이 바이러스 게놈내에서 변 형되지 않았다는 것을 시시하는 특이적 생성물을 생성하지 않았다.

후속적으로, 인간 MUC-1의 7VNTR 버젼을 함유하는 재조합 바이러스는, 유사한 방식으로 생성되며, 클론 집단을 확보한 후, 이 전에 채취된 HTK 세포를 감염시키는데 사용되었다. 이들 감염된 세포의 세포 추출물은, 감염 이틀 후의 감염된 세포의 ATR1으로의 웨스턴 블롯 및 FACS 검정에 의해 MUC-1의 발현을 명백히 입증하였다. 7VNTR 재조합 바이러스로 감염된 마우스 MC57 세포를 ELISPOT 검정에서 MUC-1 백신접종된 마우스로부터 스플린 세포를 자극하는데 사용하였다. 밤새 인큐베이션시킨 후, 스플린 세포는 7VNTR 백시니아 감염된 세포에 대한 반응에서 IL-2를 분비하나, wt 백시니아 감염된 세포에 대한 반응에서는 분비하지 않는 것으로 나타났다.

이들 결과는 7개의 임의 반복부를 갖는 MUC-1 작제물을 사용하면 작제물의 안정도를 향상시킬 수 있다는 것을 시사한다. 전체 길이의 MUC-1 재조합 백시니아 바이러스가 감염된 세포에서 MUC-1의 발현을 유도할 수 없다는 사실은, 작제물이 이러한 고도의 재조합성 세팅에서 불안정하다는 것을 암시한다. 6개 바이러스 클론 어느 것도 MUC-1을 발현하지 않거나 MUC-1 유전자를 함유하지 않는 것으로 여겨지나, 이들 모두는 동일한 벡터로 전달된 베타-갈락토시다아제는 발현시켰다. 그러나, 더 적은 반복부를 갖는 7VNTR 버젼은, 3가지의 상이한 검정에서 더욱 큰 안정도를 나타내며, 항체 또는 항원 특이적 T-세포에 의한 인식이 손실되지 않은 발현을 나타내는 것으로 입증되었다.

5. E.Coli DH1에서 성장할 경우, FL MUC, 7 VNTR 및 1 VNTR의 안정도

관련 벡터를 E.Coli DH1을 형질전환시키는데 사용하였다. 빈 벡터를 또한 대조군으로서 형질전환에 사용하였다.

VNTR 영역내의 반복부의 수가 안정도에 영향을 끼치는 지의 여부를 측정하기 위해, FL-MUC1, 7x VNTR MUC1 및 1x VNTR MUC1 플라스미드를 사용하여 쉐이커 플라스크 안정도 검정을 수행하였다.

안정도 연구는, 각각 10 내지 14시간 지속시킨 9개 계대 경로에 걸친 쉐이크 플라스크 배양물에서 각각의 작제물의 성장, 플라스미드 생성 및 플라스미드 보유율을 연구하였다. 쉐이크 플라스크내의 세포를 반복된 서브-배양시킨 결과 플라스미드 생성 및 특질이 변하는지의 여부를 측정하기 위해 안정도 연구를 이용하였다. 쉐이크 플라스크내의 조건들(예를 들어, pH, 공기 공급)이 비제어되기 때문에, 연구에 걸친 플라스미드 특질 및 생성의 유지는 이들 특성이 안정적으로 유지될 것이라는 것을 나타낸다.

5. 결과

5.2.1. 배양물의 성장

접종물 부피에 있어서 약간의 차이로 인해 각 계대로부터의 세포에 의해 달성된 최종 OD600nm간의 약간의 변화가 있지만, 전반적으로 검정 동안 또는 상이한 MUC1 작제물간의 성장율에서의 현저한 차이가 관찰되지 않았다.

5.2.2. 플라스미드 생성

플라스미드 복사체 수치를 첫번째, 다섯번째, 및 아홉번째(최종) 계대로부터 수득하였다. 전체 길이의 작제물에 있어서, PCN은 이 기간에 걸쳐 54%까지 감소된 반면, 다른 세 작제물은 ~40%까지 증가하였다. 용적 산출값(플라스미드 mg/배양물 l)은 7VNTR의 연구에 걸쳐 안정적으로 유지된 반면, 전체 길이의 작제물에 있어서는 64%까지 감소하였다. 용적 산출값에서의 약간의 감소가 빈 벡터(21%) 및 단일 VNTR 작제물(24%)에서 관찰되었지만, 어떤 수단에 의해서도 전체 길이의 작제물에서 관찰된 것 만큼 현저한 것으로 관찰되지 않았다.

5.2.3. 플라스미드 보유율

모든 작제물에 있어서 안정도 연구에 걸쳐 복제 플레이팅 검정법(the replica plating assay)에 의해 플라스미드 보유율이 80% 내지 100%인 것으로 측정되었다. 추가로, 작제물간의 현저한 차이는 없었다.

5.2.4. 플라스미드 안정도

본 연구 기간 동안에 걸친 플라스미드 안정도를 조사하기 위해, 개시점(0일째 채취) 및 최종점(5일째 채취)에서의 플라스미드 추출물을 퀴아겐 미니-프렙. 플라스미드 추출 스핀 칼럼(Qiagen Mini-prep. Plasmid Extraction spin-columns)으로 수득하였다. 그 후, 이들 추출물을 아가로스 겔 전기영동 분리에 의해 분석한 후, 후속 Sybr-Gold 염색 처리하였다. 이러한 Sybr-Gold 기재 염색법은 1000ng 샘플내의 1ng '스파이크' 재조합물을 검출할 수 있음을 입증하는 이전 작업으로 인해 플라스미드 안정도 검정에 특히 적합한 것으로 여겨진다. 연구 결과는 하기에 기재하였으며(도 6 참조), 이들 결과로부터 3개의 결론이 도출되었다:

1. 7xVNTR 및 1xVNTR 작제물은 실험에 걸쳐 예상된 수의 VNTR 반복부를 함유하였으며, 어떤 시기에서도 플라스미드 백본 또는 VNTR 반복부 구조에서 불안정성 을 나타낼 근거가 검출되지 않았다.

2. 안정도 검정에 사용된 p7313 빈 벡터는 예상된 프로파일을 갖지 않으며, p7313 플라스미드-표준과 상이하였다.

3. 최종 시점(5일째, 아홉번째 계대)에서 취한 전체 길이의 Muc1 샘플은 비공지된 오리진의 플라스미드 잔재를 함유한다.

5일째에 FL-Muc1 작제물에서의 플라스미드 종 잔재의 확인 및 p7313 프로파일에서의 불일치 결과로 인해, 추가의 연구는 수행하지 않았다.

안정도 연구에 사용된 p7313 빈 벡터와 플라스미드-표준의 벡터간의 관찰된 차이를 연구하기 위해, 제한효소 검정을 수행하였다. 이러한 검정 결과, BamHI(1926bp) 및 SapI(2422bp) 제한 효소를 함유하는 p7313 작제물의 ~800bp 영역이 결실되었음을 보여준다. 그 후, 프라이머는 이러한 영역 측면에 위치하도록 고안하였으며, 이러한 플라스미드는 후에 시퀀싱하였다. 생성된 서열 데이타는, 1866 내지 2589의 영역이 결실되었음을 확인시켜주었다. 플라스미드의 이러한 영역은 *Cer* 서열을 함유한다. 이러한 *Cer* 서열이 콘카터머의 분해를 보조하는데 사용되기 때문에, 이의 부재는 안정도 연구에서 관찰된 다중-밴딩 p7313 플라스미드 종을 설명할 수 있다.

추가의 연구 작업: FL-MUC1 샘플에서 잔재 플라스미드의 검정

최종점 FL-Muc1 샘플에서만 관찰된 잔재 플라스미드를 추가로 검정하였다. 이러한 검정은 이들 잔재가 4일전에는 검출되지 않았음을 보여준다. 이러한 발견과 동시에, 이들 잔재 플라스미드를 겔 정제하고, 재형질전환시키고, 재정제하고 시퀀싱하였다. 이러한 검정에 의해, 이들 플라스미드는 후에 재조합물 이외의 오염물로서 확인되었다; 즉, 이는 안정도 검정에 사용된 7xVNTR (p7656), *Cer* 영역에서 결실된 p7313 (상기 개략됨), 및 이러한 p7313 *Cer* 결실의 추정된 콘카터머이다.

이들 결과로부터, FL-MUC1 샘플이 p7313 빈 벡터 및 7xVNTR(p7656) 작제물로 오염되었으며, FL-Muc1의 종결점 샘플에 재조합물이 존재하지 않는다고 결론내릴 수 있다. 이들 오염물은 플라스미드의 최초의 변형 동안 FL-Muc1 스톡 E.coli DH1에 유입되는 것으로 여겨진다. 플라스미드 잔재가 4일까지는 아가로스 겔상에 나타나지 않기 때문에, FL-Muc1 플라스미드에 비해 더 작은 크기로 인해 연구 과정에 걸쳐 이들이 선택될 가능성이 있다.

3. 결론

안정도 연구로부터의 결과는, 플라스미드 즉 7x VNTR MUC1이 성장 특성, 플라스미드 보유율 및 플라스미드 특질에 있어서 안정적이라는 것을 보여주었다. 성장 특성, 플라스미드 보유율 및 플라스미드 특질에 있어서, 1x VNTR, 7xVNTR 및 FL-MUC1 벡터간의 인식가능한 차이는 없었다. 그러나, 이들 작제물 사이에 복사체수 데이타간에는 현저한 차이가 있다는 것이 흥미롭다. 플라스미드 복사체 수 및 부피 산출값은 안정도 연구 과정에 걸쳐 7x VNTR과 비교하여 전체 길이의 작제물에서 현저하게 감소되었다. 플라스미드 보유율이 전체 길이의 작제물에 대한 실험에 걸쳐 100%로 유지된 것으로 관찰되었지만, 이는 단지 개체군중의 모든 세포가 카나마이신 내성을 부여하기에 충분한 플라스미드를 함유한다는 것을 나타낼 뿐이다. 실험이 더욱 길게 수행되었다면, 복사체 수는, 카나마이신에 대한 내성이 선택적인 플레이트상에서 성장하기에 충분하지 않을 정도로 감소되어, 관찰된 플라스미드 보유율이 감소될 수 있다. 이들 데이타는, 7x VNTR 작제물이 유리한 전개 프로파일에 있어서 현저한 이점을 가질 수 있다는 것을 암시한다. 플라스미드 함량은 세포 페이스트의 정제에 영향을 끼칠 수 있다. 7VNTR과 FL-MUC1간의 차이로 인해, 7 VNTR이 정제하기에 더욱 용이하게 더 높은 수율로 수득될 수 있는 것으로 여겨진다.

부록

부록A-프라이머

2004MUC1	ATGACACCGGGCACCCAGTC
2005MUC1	GACCAGCAGCGTACTCTC
2006MUC1	CCAGCCAGCAAGAGCACTCC
2007MUC1	CCTCTCTGGAAGATCCCAGC
2008MUC1	GGTTGCGCTGGCCATTGTC
2009MUC1	GCAGAAGTGGCTGCCACTGC
2010MUC1	GCACTGACAGACAGCCAAGGC
2011MUC1	CCTTCTCGGAAGGCCAGAGTC
2012MUC1	GTACCGTGCTATGGTGAGTGC
2013MUC1	CACCAGAGTAGAAGCTGAGCC
2014MUC1	GGAGAGTACGCTGCTGGTC
2060MUC1	GCAGGCTAGCGCCACCATGTCTAGAACACCGGGCACCCAGTCTCC
2061MUC1	GACGCTCGAGAGCATTCTTCTCAGTAGAGC
2062MUC1	GACGCTCGAGCTATCTAGACAAGTTGGCAGAAGTGGC
2063MUC1	CGAGTACCCCACCTACCACACCCATGGGC

(57) 청구의 범위

청구항 1.

MUC-1 항원을 코드화하는 핵산 분자로서, 생체내에서 면역 반응을 유도할 수 있으며, 전체 길이의 MUC-1에 비해 재조합에 대한 감수성이 감소된 핵산 분자.

청구항 2.

1 내지 15개의 완전한 VNTR 반복 유닛(VNTR perfect repeat unit)을 포함하는, MUC-1 항원을 코드화하는 핵산 분자.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 8개 미만의 완전한 VNTR 반복 유닛을 포함함을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 4.

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 하나 이상의 VNTR이 글리코실화 가능성이 감소되도록 변이됨을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항중의 어느 한 항에 있어서, FLSFHISNL, NSSLEDPSTDYYQELQRDISE 및 NLTISDVSV로 구성된 군으로부터 선택된 에피토프를 코드화하는 서열과 인코포레이팅(incorporating)됨을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 6.

제 1항 내지 제 5항중의 어느 한 항에 있어서, 분자가 DNA 분자임을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 7.
제 6항에 따른 DNA 분자를 포함하는 플라스미드.

청구항 8.
제 1항 내지 제 6항중의 어느 한 항에 따른 핵산에 의해 코드화된 단백질.

청구항 9.
제 1항 내지 제 6항중의 어느 한 항에 따른 핵산, 제 7항에 따른 플라스미드 또는 제 8항에 따른 단백질, 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 10.
제 9항에 있어서, 담체가 미세입자임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 11.
제 10항에 있어서, 미세입자가 금임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 12.
제 9항 내지 제 11항중의 어느 한 항에 있어서, 애주번트를 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 13.
의약에 사용하기 위한, 제 1항 내지 제 6항중의 어느 한 항에 따른 핵산, 제 7항에 따른 플라스미드, 제 8항에 따른 단백질 또는 제 9항 내지 제 12항중의 어느 한 항에 따른 약제 조성물.

청구항 14.
MUC-1 발현 종양을 치료하거나 예방하기 위한 약제 제조에서의 제 1항 내지 제 6항중의 어느 한 항에 따른 핵산의 용도.

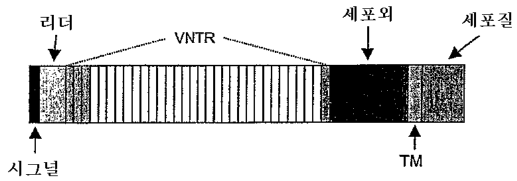
청구항 15.
MUC-1 발현 종양을 치료하거나 예방하기 위한 약제 제조에서의 제 8항에 따른 단백질의 용도.

청구항 16.
유효량의 제 1항 내지 제 6항중의 어느 한 항에 따른 핵산, 제 7항에 따른 플라스미드 또는 제 8항에 따른 단백질을 투여하는 것을 포함하여, 종양 또는 전이를 치료하거나 예방하는 방법.

도면

도면1

MUC1 작제물-삽입물



키

- 시그널 서열
- 리더 서열
- 부정형 VNTR 반복 유닛
- 완전한 VNTR 반복 유닛
- 비- VNTR 세포외 도메인
- 트랜스맴브레인 도메인
- 세포질 도메인

약어

TM	트랜스맴브레인 도메인
CYT	세포질 도메인
ss	시그널 서열
VNTR	반복유전자의 임의 반복부

도면2a

플라스미드 JNW283으로부터의 MUC1 서열. BamHI 부위는 이중 밑줄로 나타내었다. 단백질 서열은 단일문자 형태로 나타내었다. 출발 코돈 및 종료 코돈은 굵게 표시하였다. VNTR 반복 서열은 밑줄로 나타내었으며, FseI 부위는 굵은 밑줄로 나타내었다. 플라스미드 pcDNA3-FL-MUC1(ICRF)로부터의 FL-MUC1 서열은 pcDNA-FL-MUC1 플라스미드에서 약32회 반복되는 밑줄친 VNTR 서열을 제외한 하기 서열과 동일하다.

```
GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTCCCCA
CCCATTTCACCACCACCATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC
                  M  T  P  G  T  Q  S  P  F  F  L  L  L  L  L - 15

TCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCCAGGTGGAGAAA
  T  V  L  T  V  V  T  G  S  G  H  A  S  S  T  P  G  G  E  K - 35

AGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGA
  E  T  S  A  T  Q  R  S  S  V  P  S  S  T  E  K  N  A  V  S - 55

GTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGG
  M  T  S  S  V  L  S  S  H  S  P  G  S  G  S  S  T  T  Q  G - 75

GACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCAGCTGCCACCTGGG
  Q  D  V  T  L  A  P  A  T  E  P  A  S  G  S  A  A  T  W  G - 95

GACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAG
  Q  D  V  T  S  V  P  V  T  R  P  A  L  G  S  T  T  P  P  A - 115

CCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
  H  D  V  T  S  A  P  D  N  K  P  A  P  G  S  T  A  P  P  A - 135

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
  H  G  V  T  S  A  P  D  T  R  P  A  P  G  S  T  A  P  P  A - 155

CCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCTCCAG
  H  G  V  T  S  A  P  D  N  R  P  A  L  G  S  T  A  P  P  V - 175

TCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA
  H  N  V  T  S  A  S  G  S  A  S  G  S  A  S  T  L  V  H  N - 195

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC
  G  T  S  A  R  A  T  T  T  P  A  S  K  S  T  P  F  S  I  P - 215

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA
  S  H  H  S  D  T  P  T  T  L  A  S  H  S  T  K  T  D  A  S - 235

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC
```

도면2b

S T H H S T V P P L T S S N H S T S P Q - 255

AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA
L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 275

ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG
S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 295

AATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA
M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 315

GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC
P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 335

ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA
D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 355

CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCCTTTCTCTGCCCAGTCTGGGGCTG
I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 375

GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA
V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 395

TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG
V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 415

ACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCCACCTACCACACCC
I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 435

ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG
G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 455

GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT
N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 475

TGTAGGGGCACGTCGCCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCCATTCCACTCCACTCAG
* - 476

GTTCTTCAGGGCCAGAGCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTTCAGGTGG
GCTGCTCACACCGTCCTTCAGAGGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGGA
AGCTCATGTGGGCCCCTGAGGCTCATGCCTGGGAAGTGTTGTGGTGGGGGCTCCCAGGAG
GACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCC

도면3a

플라스미드 JNW358로부터의 MUC1 발현 카세트. 단백질 서열은 단일 문자 형태로 나타내었다. Nhel 부위는 이중 밑줄로 나타내었다. Xhol 부위는 점선으로 나타내었다. Xbal 부위는 이탤릭체로 나타내었다. 출발 코돈 및 종료 코돈은 굵게 표시하였다. VNTR 반복 서열은 밑줄로 나타내었으며, Fsel 부위는 굵은 밑줄로 나타내었다. FL-MUC1 서열은 JNW358에서 약32회 반복되는 밑줄친 VNTR 서열을 제외한 하기 서열과 동일하다.

G

CTAGCGCCACCATGTCTAGAACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC
M S R T P G T Q S P F F L L L L L - 17

TCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCCAGGTGGAGAAA
T V L T V V T G S G H A S S T P G G E K - 37

AGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGA
E T S A T Q R S S V P S S T E K N A V S - 57

GTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGG
M T S S V L S S H S P G S G S S T T Q G - 77

GACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCAGCTGCCACCTGGG
Q D V T L A P A T E P A S G S A A T W G - 97

GACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAG
Q D V T S V P V T R P A L G S T T P P A - 117

CCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H D V T S A P D N K P A P G S T A P P A - 137

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 157

CCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCTCCAG
H G V T S A P D N R P A L G S T A P P V - 177

TCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA
H N V T S A S G S A S G S A S T L V H N - 197

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC
G T S A R A T T T P A S K S T P F S I P - 217

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA
S H H S D T P T T L A S H S T K T D A S - 237

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC

도면3b

S T H H S T V P P L T S S N H S T S P Q - 257

AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA
L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 277

ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG
S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 297

AATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA
M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 317

GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC
P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 337

ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA
D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 357

CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCCTTTCTCTGCCCAGTCTGGGGCTG
I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 377

GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA
V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 397

TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG
V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 417

ACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCCACCTACCACACCC
I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 437

ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG
G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 457

GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT
N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 477

TG*TCTAGA***TAG**CTCGAG
S R * - 480

도면4a

플라스미드 JNW319로부터의 7x VNTR MUC1 서열. BamHI 부위는 이중 밑줄로 나타내었다. 단백질 서열은 단일 문자 형태로 나타내었다. 출발 코돈 및 종료 코돈은 굵게 표시하였다. VNTR 반복 서열은 밑줄로 나타내었으며, FseI 부위는 굵은 밑줄로 나타내었다. VNTR 서열에서 자연적으로 발생하는 아미노산 다형성은 별표로 나타내었다.

GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTCCCCA
CCCATTTCACCACCACC**ATG**ACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC
M T P G T Q S P F F L L L L L - 15

TCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCCAGGTGGAGAAA
T V L T V V T G S G H A S S T P G G E K - 35

AGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGA
E T S A T Q R S S V P S S T E K N A V S - 55

GTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGG
M T S S V L S S H S P G S G S S T T Q G - 75

GACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCAGCTGCCACCTGGG
Q D V T L A P A T E P A S G S A A T W G - 95

GACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAG
Q D V T S V P V T R P A L G S T T P P A - 115

CCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H D V T S A P D N K P A P G S T A P P A - 135

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 155

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 175

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 195

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCCGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 215

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCCGCCCCGGGCTCCACCGCGCCCGCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P A* A - 235

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCAAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P Q* A - 255

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 275

도면4b

```
CCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCTCCAG
  H  G  V  T  S  A  P  D  N  R  P  A  L  G  S  T  A  P  P  V - 295

TCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA
  H  N  V  T  S  A  S  G  S  A  S  G  S  A  S  T  L  V  H  N - 315

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC
  G  T  S  A  R  A  T  T  T  P  A  S  K  S  T  P  F  S  I  P - 335

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA
  S  H  H  S  D  T  P  T  T  L  A  S  H  S  T  K  T  D  A  S - 355

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC
  S  T  H  H  S  T  V  P  P  L  T  S  S  N  H  S  T  S  P  Q - 375

AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA
  L  S  T  G  V  S  F  F  F  L  S  F  H  I  S  N  L  Q  F  N - 395

ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG
  S  S  L  E  D  P  S  T  D  Y  Y  Q  E  L  Q  R  D  I  S  E - 415

AAATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA
  M  F  L  Q  I  Y  K  Q  G  G  F  L  G  L  S  N  I  K  F  R - 435

GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC
  P  G  S  V  V  V  Q  L  T  L  A  F  R  E  G  T  I  N  V  H - 455

ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA
  D  V  E  T  Q  F  N  Q  Y  K  T  E  A  A  S  R  Y  N  L  T - 475

CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCCTTTCTCTGCCCAGTCTGGGGCTG
  I  S  D  V  S  V  S  D  V  P  F  P  F  S  A  Q  S  G  A  G - 495

GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA
  V  P  G  W  G  I  A  L  L  V  L  V  C  V  L  V  A  L  A  I - 515

TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG
  V  Y  L  I  A  L  A  V  C  Q  C  R  R  K  N  Y  G  Q  L  D - 535

ACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCCACCTACCACACCC
  I  F  P  A  R  D  T  Y  H  P  M  S  E  Y  P  T  Y  H  T  H - 555

ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG
  G  R  Y  V  P  P  S  S  T  D  R  S  P  Y  E  K  V  S  A  G - 575

GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT
  N  G  G  S  S  L  S  Y  T  N  P  A  V  A  A  T  S  A  N  L - 595

TGTAGGGGCACGTCGCCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCCATTCCACTCCACTCAG
  *                                                           - 596

GTTCTTCAGGGCCAGAGCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTTCAGGTGG
GCTGCTCACACCGTCCTTCAGAGGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGGA
AGCTCATGTGGGCCCCTGAGGCTCATGCCTGGGAAGTGTTGTGGTGGGGGCTCCCAGGAG
GACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCC
```

도면5a

플라스미드 JNW321로부터의 2x VNTR MUC1 서열. BamHI 부위는 이중 밑줄로 나타내었다. 단백질 서열은 단일 문자 형태로 나타내었다. 출발 코돈 및 종료 코돈은 굵게 표시하였다. VNTR 반복 서열은 밑줄로 나타내었으며, Fsel 부위는 굵은 밑줄로 나타내었다.

```
GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTCCCCA
CCCATTTCACCACCACCATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC
                  M  T  P  G  T  Q  S  P  F  F  L  L  L  L  L - 15

TCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCCAGGTGGAGAAA
  T  V  L  T  V  V  T  G  S  G  H  A  S  S  T  P  G  G  E  K - 35

AGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGA
  E  T  S  A  T  Q  R  S  S  V  P  S  S  T  E  K  N  A  V  S - 55

GTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGG
  M  T  S  S  V  L  S  S  H  S  P  G  S  G  S  S  T  T  Q  G - 75

GACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCAGCTGCCACCTGGG
  Q  D  V  T  L  A  P  A  T  E  P  A  S  G  S  A  A  T  W  G - 95

GACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAG
  Q  D  V  T  S  V  P  V  T  R  P  A  L  G  S  T  T  P  P  A - 115

CCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
  H  D  V  T  S  A  P  D  N  K  P  A  P  G  S  T  A  P  P  A - 135

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCAAG
  H  G  V  T  S  A  P  D  T  R  P  A  P  G  S  T  A  P  Q  A - 155

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG
  H  G  V  T  S  A  P  D  T  R  P  A  P  G  S  T  A  P  P  A - 175

CCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCTCCAG
  H  G  V  T  S  A  P  D  N  R  P  A  L  G  S  T  A  P  P  V - 195

TCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA
  H  N  V  T  S  A  S  G  S  A  S  G  S  A  S  T  L  V  H  N - 215

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC
  G  T  S  A  R  A  T  T  T  P  A  S  K  S  T  P  F  S  I  P - 235

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA
  S  H  H  S  D  T  P  T  T  L  A  S  H  S  T  K  T  D  A  S - 255

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC
  S  T  H  H  S  T  V  P  P  L  T  S  S  N  H  S  T  S  P  Q - 275

AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA
  L  S  T  G  V  S  F  F  F  L  S  F  H  I  S  N  L  Q  F  N - 295
```

도면5b

```
ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG
  S  S  L  E  D  P  S  T  D  Y  Y  Q  E  L  Q  R  D  I  S  E - 315

AAATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA
  M  F  L  Q  I  Y  K  Q  G  G  F  L  G  L  S  N  I  K  F  R - 335

GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC
  P  G  S  V  V  V  Q  L  T  L  A  F  R  E  G  T  I  N  V  H - 355

ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA
  D  V  E  T  Q  F  N  Q  Y  K  T  E  A  A  S  R  Y  N  L  T - 375

CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCCTTTCTCTGCCCAGTCTGGGGCTG
  I  S  D  V  S  V  S  D  V  P  F  P  F  S  A  Q  S  G  A  G - 395

GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA
  V  P  G  W  G  I  A  L  L  V  L  V  C  V  L  V  A  L  A  I - 415

TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG
  V  Y  L  I  A  L  A  V  C  Q  C  R  R  K  N  Y  G  Q  L  D - 435

ACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCCACCTACCACACCC
  I  F  P  A  R  D  T  Y  H  P  M  S  E  Y  P  T  Y  H  T  H - 455

ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG
  G  R  Y  V  P  P  S  S  T  D  R  S  P  Y  E  K  V  S  A  G - 475

GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT
  N  G  G  S  S  L  S  Y  T  N  P  A  V  A  A  T  S  A  N  L - 495

TGTAGGGGCACGTCGCCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCCATTCCACTCCACTCAG
  *                                                           - 496

GTTCTTCAGGGCCAGAGCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTTCAGGTGG
GCTGCTCACACCGTCCTTCAGAGGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGGA
AGCTCATGTGGGCCCCTGAGGCTCATGCCTGGGAAGTGTTGTGGTGGGGGCTCCCAGGAG
GACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCC
```

도면6a

플라스미드 JNW656으로부터의 7x VNTR MUC1 발현 카세트. NheI 부위는 이중 밑줄로 나타내었다. XhoI 부위는 점선으로 나타내었다. XbaI 부위는 이탤릭체로 나타내었다. 단백질 서열은 단일 문자 형태로 나타내었다. 출발 코돈 및 종료 코돈은 굵게 표시하였다. 7x VNTR 반복 서열은 밑줄로 나타내었으며, FseI 부위는 굵은 밑줄로 나타내었다. VNTR 서열에서 자연적으로 발생하는 아미노산 다형성은 별표로 나타내었다. 최적화된 Kozak 서열은 우물정자로 나타내었다.

```
          ######
    GCTAGCGCCACCATGTCTAGAACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTG
                M S R T P G T Q S P F F L L    - 14

CTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCCAGGT
L L L T V L T V V T G S G H A S S T P G   - 34

GGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAAT
G E K E T S A T Q R S S V P S S T E K N   - 54

GCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACC
A V S M T S S V L S S H S P G S G S S T   - 74

ACTCAGGGACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCAGCTGCC
T Q G Q D V T L A P A T E P A S G S A A   - 94

ACCTGGGGACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACC
T W G Q D V T S V P V T R P A L G S T T   - 114

CCGCCAGCCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCC
P P A H D V T S A P D N K P A P G S T A   - 134

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A   - 154

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A   - 174

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A   - 194

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCCGCCCCGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A   - 214

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCCGCCCCGGGCTCCACCGCG
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A   - 234

CCCGCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCC
P A* A H G V T S A P D T R P A P G S T A  - 254

CCCCAAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCC
P Q* A H G V T S A P D T R P A P G S T A  - 274

CCCCCAGCCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D N R P A L G S T A   - 294
```

도면6b

CCTCCAGTCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTG
P P V H N V T S A S G S A S G S A S T L - 314

GTGCACAACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTC
V H N G T S A R A T T T P A S K S T P F - 334

TCAATTCCCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACT
S I P S H H S D T P T T L A S H S T K T - 354

GATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACT
D A S S T H H S T V P P L T S S N H S T - 374

TCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTC
S P Q L S T G V S F F F L S F H I S N L - 394

CAGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGAC
Q F N S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D - 414

ATTTCTGAAATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATT
I S E M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I - 434

AAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATC
K F R P G S V V V Q L T L A F R E G T I - 454

AATGTCCACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATAT
N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y - 474

AACCTGACGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCCTTTCTCTGCCCAGTCT
N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S - 494

GGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCG
G A G V P G W G I A L L V L V C V L V A - 514

CTGGCCATTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGG
L A I V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G - 534

CAGCTGGACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCCACCTAC
Q L D I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y - 554

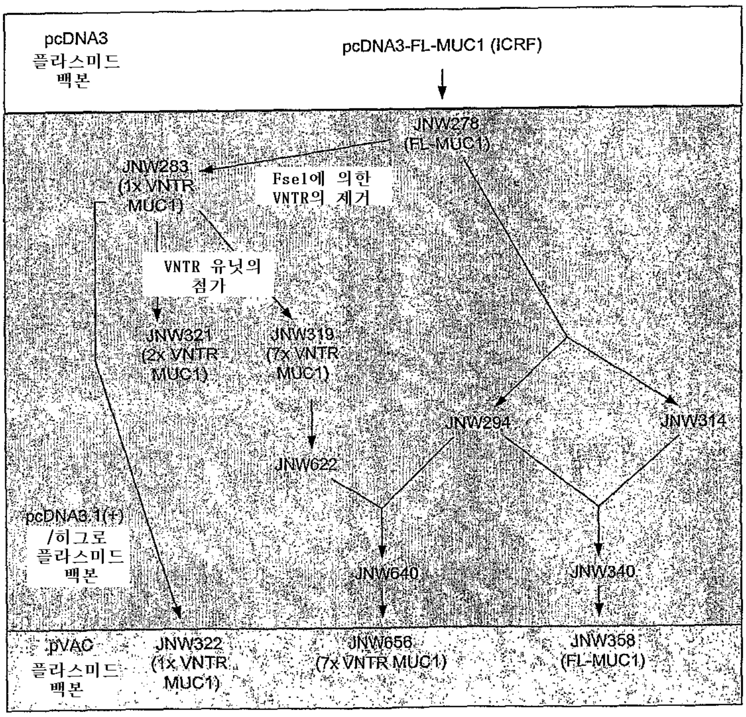
CACACCCATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTT
H T H G R Y V P P S S T D R S P Y E K V - 574

TCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCT
S A G N G G S S L S Y T N P A V A A T S - 594

GCCAACTTG*TCTAGA*TAGCTCGAG - 600
A N L S R *

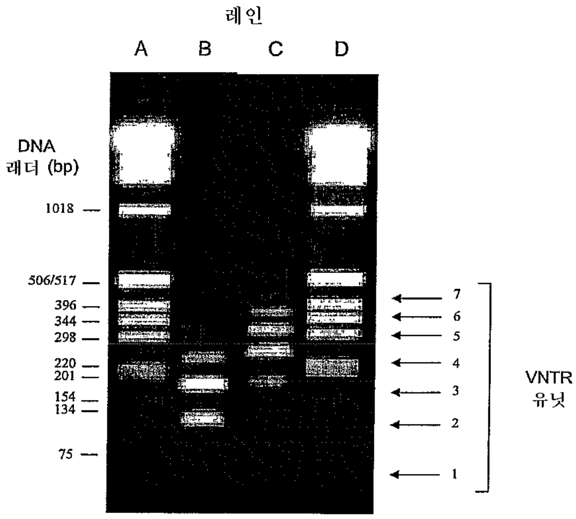
도면7

상이한 플라스미드 작제물 사이의 상호관계를 나타내는 흐름도. 흰색 박스는 pcDNA3 백본을 갖는 플라스미드를 나타낸다. 밝은 회색 박스는 pVAC 백복을 갖는 플라스미드를 나타내고, 어두운 회색 박스는 pcDNA3.1(+)/히그로 백본을 갖는 플라스미드를 나타낸다.



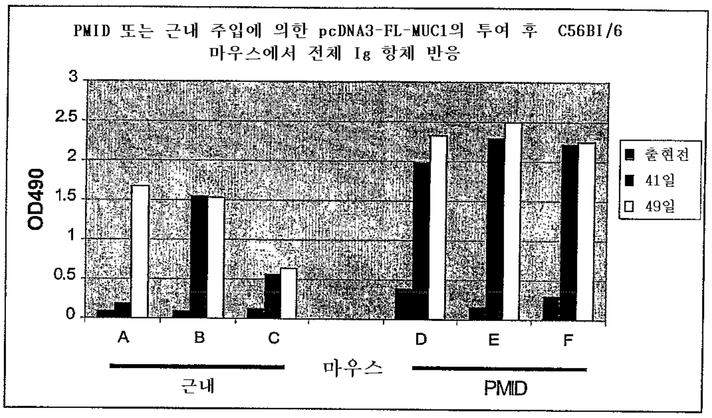
도면8

VNTR 유닛의 정제



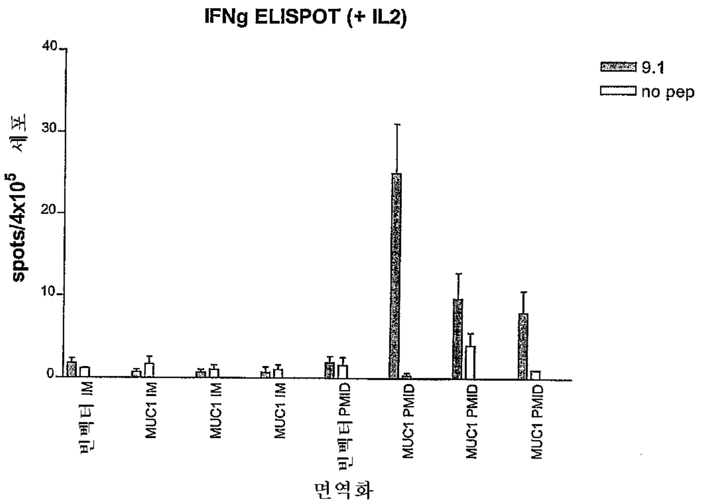
도면9

PMID(마우스 D-F) 또는 근내 주입(마우스 A-C)에 의한 pcDNA3-FL-MUC1의 투여 후 C56BI/6 마우스에서 전체 Ig 항체 반응



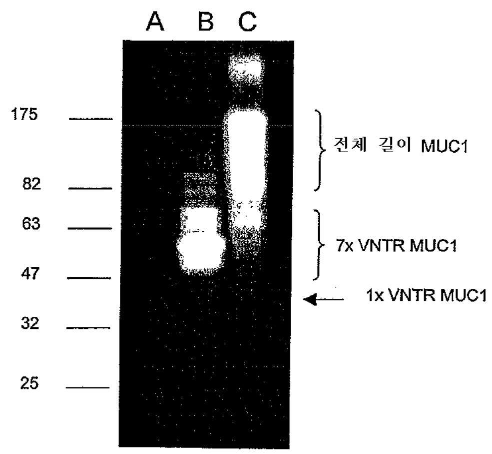
도면10

pcDNA3-FL-MUC1(MUC1) 또는 pcDNA3(빈 벡터)로 PMID 및 근내(IM) 면역화시킨 후 항-MUC1 세포 반응의 비교, C57BL/6 마우스를 0일,21일 및 42일째에 면역화시키고, 55일째에 검정을 수행하였다. 그래프는 IL-2의 존재하에 펩티드 SAPDTRPAP(9.1)에 대한 IFNγ 반응을 나타낸다.



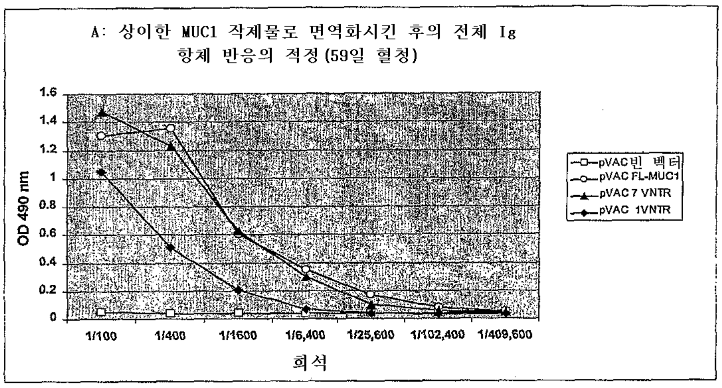
도면11

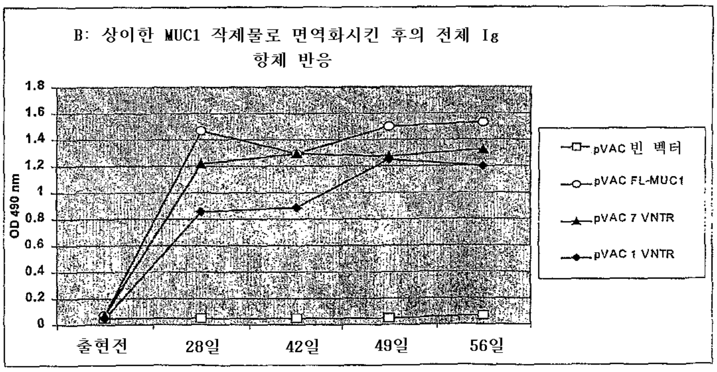
MUCI 작제물로 일시적 트랜스펙션시킨 후 CHO 세포의 웨스턴 블롯 검정. CHO 세포를 A) JNW332(Ix VNTR MUC1), B) JNW656(7x VNTR MUC1) 및 C) JNW358(FL-MUC1)으로 트랜스펙션시켰다



도면12

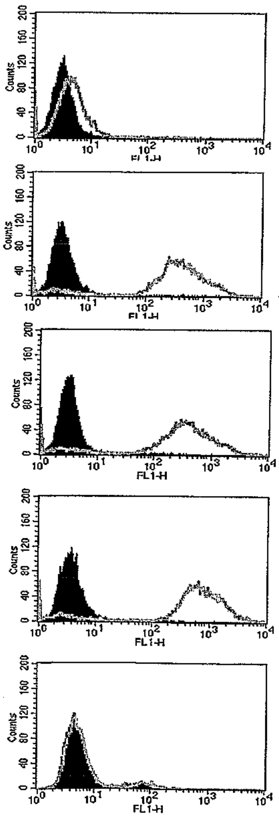
pVAC(빈 벡터), JNW358(FL-MUC1) 및 JNW656(7x VNTR MUC1) 및 JNW332 (1x VNTR MUC1)으로 PMID 면역화시킨 후의 항-MUC1 항체 반응의 A)적정 및 B)반응성





도면13

빈 벡터, FL-MUC1(JNW358), 7x VNTR MUC1(JNW656) 및 1x VNTR MUC1(JNW332)로 면역화된 마우스로부터의 혈청으로 염색된 B16 어미 세포 및 B16F0MUC1 종양 세포의 FACS 프로파일. 검은색 프로파일은 출혈전 혈청으로부터의 염색을 나타내며, 흰색 프로파일은 3회 면역화후에 취해진 심장 혈액 샘플로부터의 염색을 나타낸다.



B16F0MUC1 세포
빈 벡터

B16F0MUC1 세포
FL-MUC1 (JNW358)

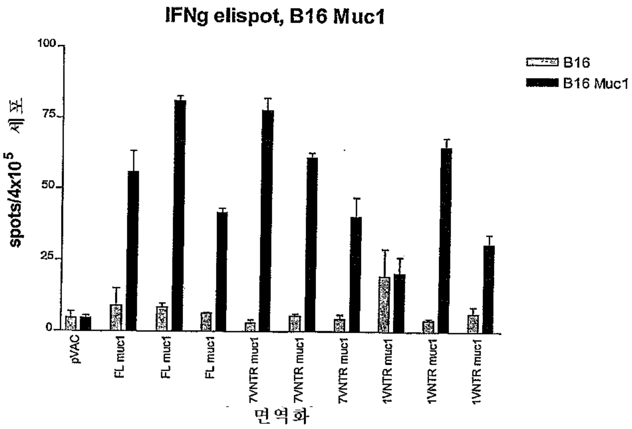
B16F0MUC1 세포
7x VNTR MUC1 (JNW656)

B16F0MUC1 세포
1x VNTR MUC1 (JNW332)

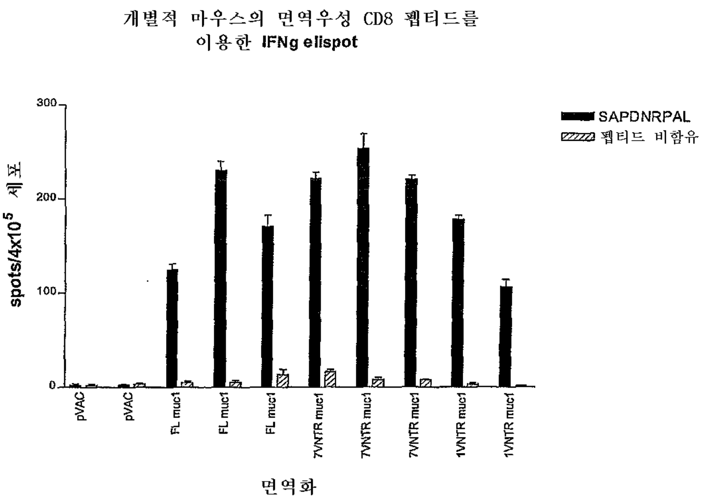
B16 어미 세포
7x VNTR MUC1 (JNW656)

도면14a

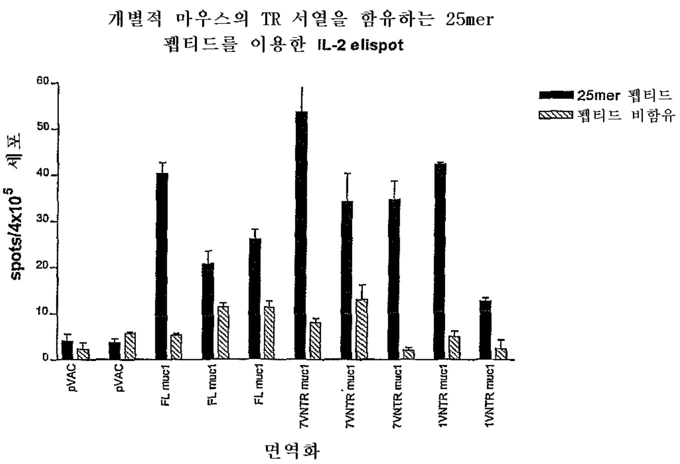
pVAC(빈 벡터), JNW358(FL-MUC1) 및 JNW656(7x VNTR MUC1) 및 JNW332 (1x VNTR MUC1)으로 PMID 면역화시킨 후의 항-MUC1 세포 반응. C57BL/6 마우스를 0일, 21일 및 42일째에 면역화시키고, 49일째에 검정을 수행하였다 그래프는 B16 MUC1 종양 세포에 대한 IFNɣ 반응을 나타낸다. 그래프 b는 SAPDNRPAL 펩티드에 대한 IFNɣ 반응을 나타낸다. 그래프 c는 TR 서열을 나타내는 25mer 펩티드에 대한 IL-2 반응을 나타낸다. 그래프 d 및 e는 MUC1 펩티드 범위에 대한 풀링된 스플레노사이(그룹당 마우스 3마리)의 IFNɣ 및 IL-2 반응을 나타낸다



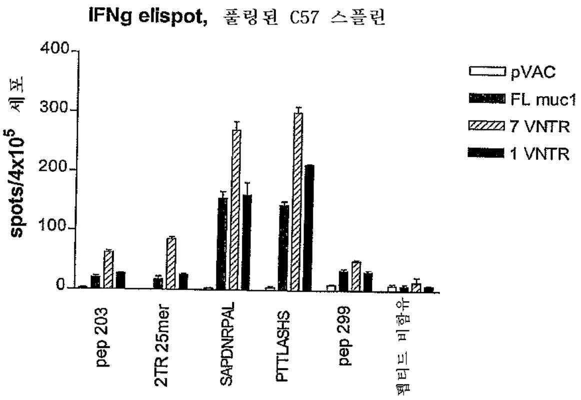
도면14b



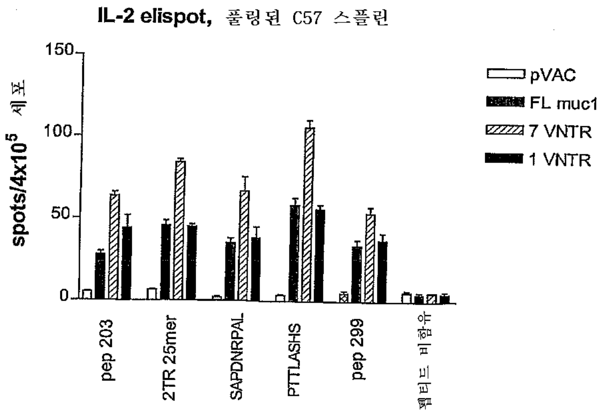
도면14c



도면14d

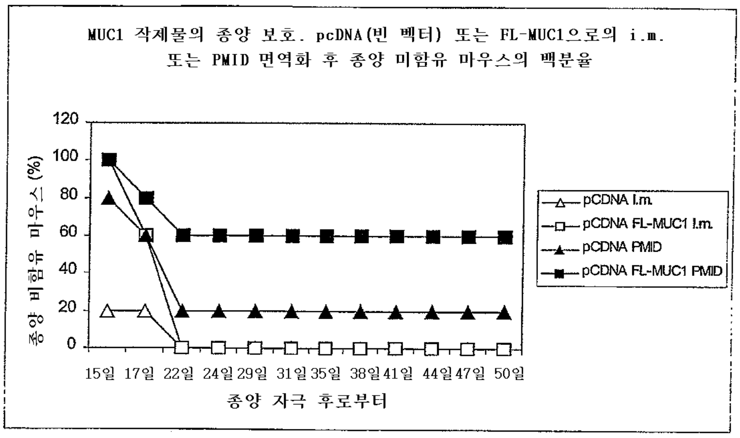


도면14e



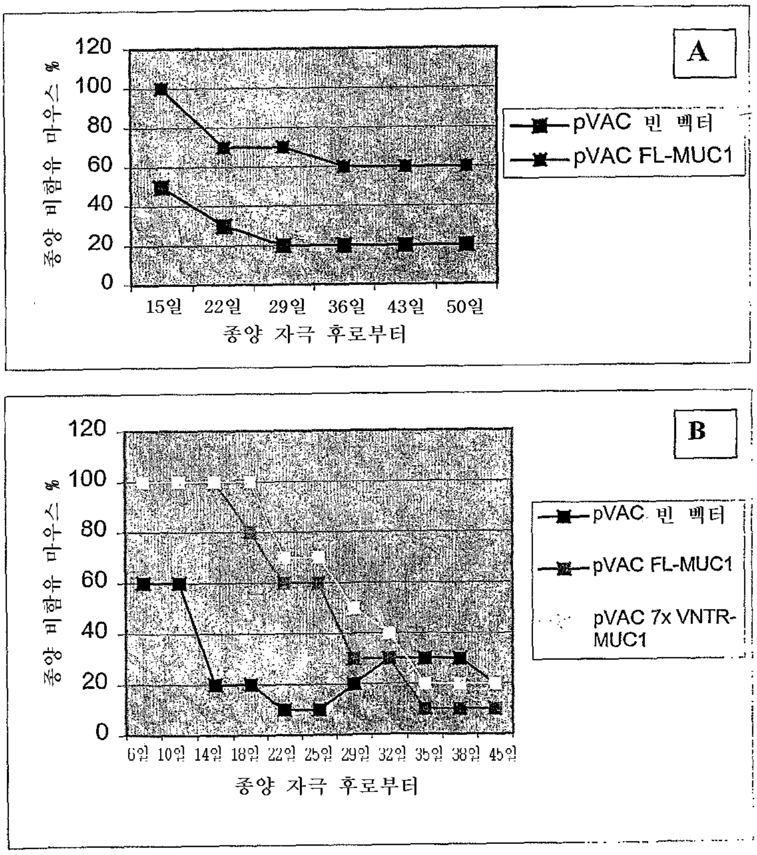
도면15

pcDNA3-FL-MUC1 또는 pcDNA3.1(빈 벡터)의 3회 투여 및 B16F0MUC1 세포로의 종양 자극 후 종양 비함유 마우스의 백분율



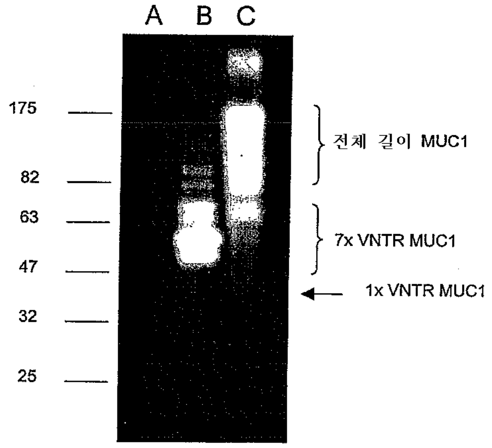
도면16

MUC1 PMID 작제물에 의한 종양 보호. pVAC(빈 벡터), JNW358(FL-MUC1) 또는 7x VNTR MUC1(JNW656)으로의 유전자-건 면역화후 종양 비함유 마우스의 백분율



도면17

MUC1 작제물로 일시적인 트랜스펙션 시킨 후의 CHO 세포의 웨스턴 블롯 검정. CHO 세포를 A) JNW332(1x VNTR MUC1) B) JNW656(7x VNTR MUC1) 및 C) JNW358(FL-MUC1)으로 트랜스펙션시켰다.



SEQUENCE LISTING

<110> Glaxo group ltd

<120> Vaccines

<130> PG4751

<140> PCT/ep03 05594

<141> 2003-05-23

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His

1 5 10 15

Gly Val Thr Ser

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His

1 5 10 15

Gly Val Thr Ser

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 3

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln

1 5 10 15

Asp Val Thr Ser

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 4

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

1 5 10 15

Asp Val Thr Ser

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 5

Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His

1 5 10 15

Gly Val Thr Ser

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 6

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His

1 5 10 15

Asn Val Thr Ser

20

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Elispot sequence

<400> 7

Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu

1 5

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Elispot sequence

<400> 8

Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val

20 25

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Elispot sequence

<400> 9

Asp Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Thr Glu Pro Ala

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Elispot sequence

<400> 10

Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

1 5 10 15

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Elispot sequence

<400> 11

Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser

1 5

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cataaataat aaatacaata attaatttct cg 32

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

gcctccttaa agcatttcat acacacagc 29

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 14

Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu

1 5

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> human

<400> 15

Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln

1 5 10 15

Arg Asp Ile Ser Glu

20

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 16

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val

1 5

<210> 17

<211> 1774

<212> DNA

<213> human

<400> 17

ggatccgctc cacctctcaa gcagccagcg cctgcctgaa tctgttctgc cccctcccca 60

cccatttcac caccaccatg acaccgggca cccagtctcc tttcttcctg ctgctgctcc 120

tcacagtgct tacagttgtt acaggttctg gtcatgcaag ctctacccca ggtggagaaa 180

aggagacttc ggctacccag agaagttcag tgcccagctc tactgagaag aatgctgtga 240

gtatgaccag cagcgtactc tccagccaca gccccggttc aggctcctcc accactcagg 300

gacaggatgt cactctggcc ccggccacgg aaccagcttc aggttcagct gccacctggg 360

gacaggatgt cacctcggtc ccagtcacca ggccagccct gggctccacc accccgccag 420

cccacgatgt cacctcagcc ccggacaaca agccagcccc gggctccacc gccccccccag 480

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gccccccccag 540

cccatggtgt cacctcggcc ccggacaaca ggcccgcctt gggctccacc gcccctccag 600 tccacaatgt cacctcggcc tcaggctctg catcaggctc agcttctact ctggtgcaca 660

acggcacctc tgccagggct accacaaccc cagccagcaa gagcactcca ttctcaattc 720

ccagccacca ctctgatact cctaccaccc ttgccagcca tagcaccaag actgatgcca 780

gtagcactca ccatagcacg gtacctcctc tcacctcctc caatcacagc acttctcccc 840

agttgtctac tggggtctct ttctttttcc tgtcttttca catttcaaac ctccagttta 900

attcctctct ggaagatccc agcaccgact actaccaaga gctgcagaga gacatttctg 960

aatgtttttg cagatttata aacaaggggg ttttctgggc ctctccaata ttaagttcag 1020

gccaggatct gtggtggtac aattgactct ggccttccga gaaggtacca tcaatgtcca 1080

cgacgtggag acacagttca atcagtataa aacggaagca gcctctcgat ataacctgac 1140

gatctcagac gtcagcgtga gtgatgtgcc atttcctttc tctgcccagt ctggggctgg 1200

ggtgccaggc tggggcatcg cgctgctggt gctggtctgt gttctggttg cgctggccat 1260

tgtctatctc attgccttgg ctgtctgtca gtgccgccga aagaactacg ggcagctgga 1320

catctttcca gcccgggata cctaccatcc tatgagcgag taccccacct accacaccca 1380

tgggcgctat gtgcccccta gcagtaccga tcgtagcccc tatgagaagg tttctgcagg 1440

taatggtggc agcagcctct cttacacaaa cccagcagtg gcagccactt ctgccaactt 1500

gtaggggcac gtcgcccgct gagctgagtg gccagccagt gccattccac tccactcagg 1560

ttcttcaggg ccagagcccc tgcaccctgt ttgggctggt gagctgggag ttcaggtggg 1620

ctgctcacac cgtccttcag aggccccacc aatttctcgg acacttctca gtgtgtggaa 1680

gctcatgtgg gcccctgagg ctcatgcctg ggaagtgttg tggtgggggc tcccaggagg 1740

actggcccag agagccctga gatagcgggg atcc 1774

<210> 18

<211> 475

<212> PRT

<213> human

<400> 18

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His

50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu

65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln

85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr

100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro

115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr

130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser

145 150 155 160

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His

165 170 175

Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu

180 185 190

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

195 200 205

Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr

210 215 220

Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser

225 230 235 240

Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu

245 250 255

Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu

260 265 270

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

275 280 285

Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly

290 295 300

Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val

305 310 315 320

Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp

325 330 335

Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr

340 345 350

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe

355 360 365

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

370 375 380

Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala

385 390 395 400

Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile

405 410 415

Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr

420 425 430

His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro

435 440 445

Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr

450 455 460

Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

465 470 475

<210> 19

<211> 1457

<212> DNA

<213> human

<400> 19

gctagcgcca ccatgtctag aacaccgggc acccagtctc ctttcttcct gctgctgctc 60

ctcacagtgc ttacagttgt tacaggttct ggtcatgcaa gctctacccc aggtggagaa 120

aaggagactt cggctaccca gagaagttca gtgcccagct ctactgagaa gaatgctgtg 180

agtatgacca gcagcgtact ctccagccac agccccggtt caggctcctc caccactcag 240

ggacaggatg tcactctggc cccggccacg gaaccagctt caggttcagc tgccacctgg 300

ggacaggatg tcacctcggt cccagtcacc aggccagccc tgggctccac caccccgcca 360

gcccacgatg tcacctcagc cccggacaac aagccagccc cgggctccac cgcccccca 420 gcccacggtg tcacctcggc cccggacacc aggccggccc cgggctccac cgcccccccca 480

gcccatggtg tcacctcggc cccggacaac aggcccgcct tgggctccac cgcccctcca 540

gtccacaatg tcacctcggc ctcaggctct gcatcaggct cagcttctac tctggtgcac 600

aacggcacct ctgccagggc taccacaacc ccagccagca agagcactcc attctcaatt 660

cccagccacc actctgatac tcctaccacc cttgccagcc atagcaccaa gactgatgcc 720

agtagcactc accatagcac ggtacctcct ctcacctcct ccaatcacag cacttctccc 780

cagttgtcta ctggggtctc tttctttttc ctgtcttttc acatttcaaa cctccagttt 840

aattcctctc tggaagatcc cagcaccgac tactaccaag agctgcagag agacatttct 900

gaatgttttt gcagatttat aaacaagggg gttttctggg cctctccaat attaagttca 960

ggccaggatc tgtggtggta caattgactc tggccttccg agaaggtacc atcaatgtcc 1020

acgacgtgga gacacagttc aatcagtata aaacggaagc agcctctcga tataacctga 1080

cgatctcaga cgtcagcgtg agtgatgtgc catttccttt ctctgcccag tctggggctg 1140

gggtgccagg ctggggcatc gcgctgctgg tgctggtctg tgttctggtt gcgctggcca 1200

ttgtctatct cattgccttg gctgtctgtc agtgccgccg aaagaactac gggcagctgg 1260

acatctttcc agcccgggat acctaccatc ctatgagcga gtaccccacc taccacaccc 1320

atgggcgcta tgtgcccccct agcagtaccg atcgtagccc ctatgagaag gtttctgcag 1380

gtaatggtgg cagcagcctc tcttacacaa acccagcagt ggcagccact tctgccaact 1440

tgtctagata gctcgag 1457

<210> 20

<211> 479

<212> PRT

<213> human

<400> 20

Met Ser Arg Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser

50 55 60

Ser His Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val

65 70 75 80

Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp

85 90 95

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

100 105 110

Thr Thr Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro

115 120 125

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

130 135 140

Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val

145 150 155 160

Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro

165 170 175

Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser

180 185 190

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

195 200 205

Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro

210 215 220

Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His

225 230 235 240

His Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro

245 250 255

Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser

260 265 270

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

275 280 285

Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys

290 295 300

Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser

305 310 315 320

Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val

325 330 335

His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser

340 345 350

Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe

355 360 365

Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala

370 375 380

Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu

385 390 395 400

Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu

405 410 415

Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro

420 425 430

Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg

435 440 445

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

450 455 460

Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu Ser Arg

465 470 475

<210> 21

<211> 2135

<212> DNA

<213> human

<400> 21

ggatccgctc cacctctcaa gcagccagcg cctgcctgaa tctgttctgc cccctcccca 60

cccatttcac caccaccatg acaccgggca cccagtctcc tttcttcctg ctgctgctcc 120

tcacagtgct tacagttgtt acaggttctg gtcatgcaag ctctacccca ggtggagaaa 180

aggagacttc ggctacccag agaagttcag tgcccagctc tactgagaag aatgctgtga 240

gtatgaccag cagcgtactc tccagccaca gccccggttc aggctcctcc accactcagg 300

gacaggatgt cactctggcc ccggccacgg aaccagcttc aggttcagct gccacctggg 360

gacaggatgt cacctcggtc ccagtcacca ggccagccct gggctccacc accccgccag 420

cccacgatgt cacctcagcc ccggacaaca agccagcccc gggctccacc gcccccccag 480

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag 540 cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag 600

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag 660

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggcccgcccc gggctccacc gcccccccag 720

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggcccgcccc gggctccacc gcgcccgcag 780

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccaag 840

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag 900

cccatggtgt cacctcggcc ccggacaaca ggcccgcctt gggctccacc gcccctccag 960

tccacaatgt cacctcggcc tcaggctctg catcaggctc agcttctact ctggtgcaca 1020

acggcacctc tgccagggct accacaaccc cagccagcaa gagcactcca ttctcaattc 1080

ccagccacca ctctgatact cctaccaccc ttgccagcca tagcaccaag actgatgcca 1140

gtagcactca ccatagcacg gtacctcctc tcacctcctc caatcacagc acttctcccc 1200

agttgtctac tggggtctct ttctttttcc tgtcttttca catttcaaac ctccagttta 1260

attcctctct ggaagatccc agcaccgact actaccaaga gctgcagaga gacatttctg 1320

aaatgttttt gcagatttat aaacaagggg gttttctggg cctctccaat attaagttca 1380

ggccaggatc tgtggtggta caattgactc tggccttccg agaaggtacc atcaatgtcc 1440

acgacgtgga gacacagttc aatcagtata aaacggaagc agcctctcga tataacctga 1500

cgatctcaga cgtcagcgtg agtgatgtgc catttccttt ctctgcccag tctggggctg 1560

gggtgccagg ctggggcatc gcgctgctgg tgctggtctg tgttctggtt gcgctggcca 1620

ttgtctatct cattgccttg gctgtctgtc agtgccgccg aaagaactac gggcagctgg 1680

acatctttcc agcccgggat acctaccatc ctatgagcga gtaccccacc taccacaccc 1740

atgggcgcta tgtgcccccct agcagtaccg atcgtagccc ctatgagaag gtttctgcag 1800

gtaatggtgg cagcagcctc tcttacacaa acccagcagt ggcagccact tctgccaact 1860

tgtaggggca cgtcgcccgc tgagctgagt ggccagccag tgccattcca ctccactcag 1920

gttcttcagg gccagagccc ctgcaccctg tttgggctgg tgagctggga gttcaggtgg 1980

gctgctcaca ccgtccttca gaggccccac caatttctcg gacacttctc agtgtgtgga 2040

agctcatgtg ggcccctgag gctcatgcct gggaagtgtt gtggtggggg ctcccaggag 2100

gactggccca gagagccctg agatagcggg gatcc 2135

<210> 22

<211> 595

<212> PRT

<213> human

<400> 22

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15
Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30
Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45
Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60
Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80
Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95
Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110
Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140
Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160
Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175
Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
180 185 190
Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
195 200 205
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
210 215 220
Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His Gly Val Thr Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Gln Ala His
245 250 255
Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
260 265 270

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu
275 280 285

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser
290 295 300

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg
305 310 315 320

Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser
325 330 335

His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr
340 345 350

Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser
355 360 365

Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe
370 375 380

Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp
385 390 395 400

Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met
405 410 415

Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile
420 425 430

Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg
435 440 445

Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr
450 455 460

Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser
465 470 475 480

Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val
485 490 495

Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala
500 505 510

Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
515 520 525

Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His
530 535 540

Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro

545 550 555 560

Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn

565 570 575

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

580 585 590

Ala Asn Leu

595

<210> 23

<211> 1835

<212> DNA

<213> human

<400> 23

ggatccgctc cacctctcaa gcagccagcg cctgcctgaa tctgttctgc cccctcccca 60

cccatttcac caccaccatg acaccgggca cccagtctcc tttcttcctg ctgctgctcc 120

tcacagtgct tacagttgtt acaggttctg gtcatgcaag ctctacccca ggtggagaaa 180

aggagacttc ggctacccag agaagttcag tgcccagctc tactgagaag aatgctgtga 240

gtatgaccag cagcgtactc tccagccaca gccccggttc aggctcctcc accactcagg 300

gacaggatgt cactctggcc ccggccacgg aaccagcttc aggttcagct gccacctggg 360

gacaggatgt cacctcggtc ccagtcacca ggccagccct gggctccacc accccgccag 420

cccacgatgt cacctcagcc ccggacaaca agccagcccc gggctccacc gccccccag 480

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gccccccaag 540

cccacggtgt cacctcggcc ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag 600

cccatggtgt cacctcggcc ccggacaaca ggcccgcctt gggctccacc gcccctccag 660

tccacaatgt cacctcggcc tcaggctctg catcaggctc agcttctact ctggtgcaca 720

acggcacctc tgccagggct accacaaccc cagccagcaa gagcactcca ttctcaattc 780

ccagccacca ctctgatact cctaccaccc ttgccagcca tagcaccaag actgatgcca 840

gtagcactca ccatagcacg gtacctcctc tcacctcctc caatcacagc acttctcccc 900

agttgtctac tggggtctct ttctttttcc tgtcttttca catttcaaac ctccagttta 960

attcctctct ggaagatccc agcaccgact actaccaaga gctgcagaga gacatttctg 1020

aaatgttttt gcagatttat aaacaagggg gttttctggg cctctccaat attaagttca 1080 ggccaggatc tgtggtggta caattgactc tggccttccg agaaggtacc atcaatgtcc 1140

acgacgtgga gacacagttc aatcagtata aaacggaagc agcctctcga tataacctga 1200

cgatctcaga cgtcagcgtg agtgatgtgc catttccttt ctctgcccag tctggggctg 1260

gggtgccagg ctggggcatc gcgctgctgg tgctggtctg tgttctggtt gcgctggcca 1320

ttgtctatct cattgccttg gctgtctgtc agtgccgccg aaagaactac gggcagctgg 1380

acatctttcc agcccgggat acctaccatc ctatgagcga gtaccccacc taccacaccc 1440

atgggcgcta tgtgcccccct agcagtaccg atcgtagccc ctatgagaag gtttctgcag 1500

gtaatggtgg cagcagcctc tcttacacaa acccagcagt ggcagccact tctgccaact 1560

tgtaggggca cgtcgcccgc tgagctgagt ggccagccag tgccattcca ctccactcag 1620

gttcttcagg gccagagccc ctgcaccctg tttgggctgg tgagctggga gttcaggtgg 1680

gctgctcaca ccgtccttca gaggccccac caatttctcg gacacttctc agtgtgtgga 1740

agctcatgtg ggcccctgag gctcatgcct gggaagtgtt gtggtggggg ctcccaggag 1800

gactggccca gagagccctg agatagcggg gatcc 1835

<210> 24

<211> 495

<212> PRT

<213> human

<400> 24

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His

50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu

65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln

85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr

100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Gln Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala
180 185 190

Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser
195 200 205

Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr
210 215 220

Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp
225 230 235 240

Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser
245 250 255

Thr His His Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr
260 265 270

Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His
275 280 285

Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp
290 295 300

Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile
305 310 315 320

Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro
325 330 335

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

Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
355 360 365

Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val
370 375 380

Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly

385 390 395 400

Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val

405 410 415

Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly

420 425 430

Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu

435 440 445

Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr

450 455 460

Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser

465 470 475 480

Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

485 490 495