



공개특허 10-2025-0002803



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0002803
(43) 공개일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/001157 (2025.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-7040786(분할)

(22) 출원일자(국제) 2017년02월03일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-7025572
원출원일자(국제) 2017년02월03일
심사청구일자 2022년01월28일

(85) 번역문제출일자 2024년12월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/016557

(87) 국제공개번호 WO 2017/136758
국제공개일자 2017년08월10일

(30) 우선권주장
62/291,601 2016년02월05일 미국(US)

(71) 출원인
이노비오 파마수티컬즈, 인크.
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트
110 저먼타운 파이크 660

(72) 발명자
웬, 지안
미국 19422-2200 펜실베니아주 블루 벨 스위트
400 빌딩 18 센트리 파크웨이 웨스트 1787, 이노
비오 파마수티컬즈, 인크.

(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

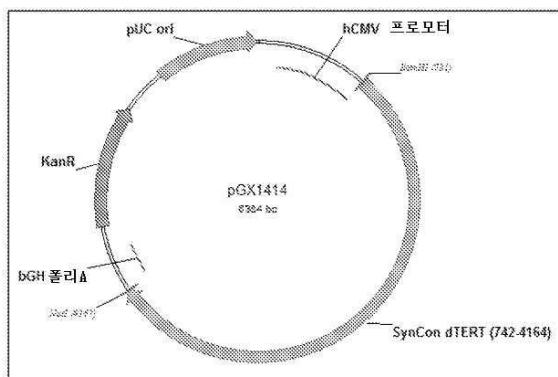
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 암 백신 및 이를 이용하는 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 개 텔로머라제 역전사효소(dTERT) 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 백신뿐만 아니라 TERT에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 그리고 포유류에서 암을 치료하기 위해 상기 백신을 이용하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/4748 (2013.01)

C12N 9/1276 (2013.01)

C12Y 207/07049 (2013.01)

A61K 2039/55527 (2013.01)

A61K 2039/55538 (2013.01)

A61K 2039/572 (2013.01)

A61K 2039/585 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열, 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열; 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 서열번호 2에 대해 95% 동일성인 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1에 대해 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2에 대해 95% 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 플라스미드인, 백신.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 플라스미드는 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는, 백신.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 아주번트를 더 포함하는, 백신.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 아주번트는 IL-12, IL-15, IL-28 또는 RANTES인, 백신.

청구항 10

포유류에서 텔로머라제 역전사효소(TERT)에 대해 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 면역 반응 유도가 필요한 포유류에게 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 상기 핵산 분자는 상기 포유류에서 발현되며, 다음의 면역 반응 중 하나 이상이 유도되는, 면역 반응을 유도하는 방법:

(a) TERT에 특이적인 채액성 면역 반응,

(b) 상기 백신을 투여하지 않은 포유류에 비해 증가된 수준의 종양 피사 인자- α (TNF- α) 및 인터페론- γ (IFN- γ)를 포함하는 염증 반응, 및

(c) TERT에 특이적인 세포의 면역 반응.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 TERT는 개 TERT(dTERT)인, 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 12

제10항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류는 암을 갖는, 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 13

포유류에서 암을 치료하는 방법으로서, 암 치료가 필요한 포유류에게 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 백신 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 상기 핵산 분자는 상기 포유류에서 발현되며 상기 암이 치료되는, 포유류에서 암을 치료하는 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백신은 전기천공법을 통해 투여되는, 포유류에서 암을 치료하는 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류는 개인, 포유류에서 암을 치료하는 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전립선암, 간암, 자궁경부암, 재발성 호흡기 유두종증(RRP), 항문암, 두경부암, 혈액암, 백혈병, 림프종, 골수종, 폐 암종, 비소세포 폐 암종, 식도 편평 세포 암종, 방광암, 결장직장암, 위암, 간암종, 뇌암, 교모세포종, 췌장암, 활액 암종, 고환암 및 위암, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 포유류에서 암을 치료하는 방법.

청구항 17

서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 18

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 분자.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 20

서열번호 2의 아미노산 서열 또는 서열번호 2에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 21

개 텔로머라제 역전사효소(dTERT) 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 백신으로서,

상기 폴리뉴클레오타이드 서열은, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열; 서열번호 5의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 이들의 임의의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 백신.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 백신.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 백신.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 핵산 분자는 폴리뉴클레오타이드, 백신.

청구항 25

제24항에 있어서, 애주번트를 더 포함하는, 백신.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28 또는 RANTES인, 백신.

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 백신은 포유류에서 텔로머라제 역전사효소(TERT)에 대해 면역 반응을 유도하기 위한 것이며,

상기 면역 반응은,

- (a) TERT에 특이적인 체액성 면역 반응,
- (b) 상기 백신을 투여하지 않은 포유류에 비해 증가된 수준의 인터페론- γ (IFN- γ)를 포함하는 염증 반응, 및
- (c) TERT에 특이적인 세포의 면역 반응

중 하나 이상을 포함하는 것인,

백신.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 TERT는 개 TERT(dTERT)인, 백신.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 포유류는 암을 갖는 것인, 백신.

청구항 30

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류에서 암을 치료하기 위한, 백신.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 백신은 전기천공법을 통해 투여되는 것인, 백신.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 포유류는 개인, 백신.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전립선암, 간암, 자궁경부암, 재발성 호흡기 유두종증(RRP), 항문암, 두경부암, 혈액암, 백혈병, 림프종, 골수종, 폐 암종, 비소세포 폐 암종, 식도 편평 세포 암종, 방광암, 결장직장암, 위암, 간암종, 뇌암, 교모세포종, 췌장암, 활액 암종, 고환암 및 위암, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 백신.

청구항 34

서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열; 또는

서열번호 5의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열

을 포함하는, 개 텔로머라제 역전사효소(dTERT) 항원을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 35

서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원(들)에 대한 상호 참조

본 출원은 2016년 2월 5일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/291,601호에 대한 유익을 주장하며, 이 기초출원은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입된다.

[0003] 전자적으로 제출된 매체의 참고에 의한 편입

본 명세서와 함께 동시에 제출되고 다음과 같이 확인되는 컴퓨터 판독 가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열 목록이 전문이 참고로 편입된다: 2017년 2월 3일자로 생성된 파일명 "VGX0151W0_ST25.txt"의 1개의 47,931 바이트 ASCII(텍스트).

[0005] 기술분야

본 명세서에서 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법 및 종양 성장에 대한 보호를 제공하는 백신이 개시된다.

배경 기술

[0007] 암은 전세계의 주된 사망 원인이며, 미국에서 모든 4가지 사망 중 한 가지를 거의 차지하는 두 번째로 흔한 사망 원인이다. 암은 종양 정상 세포를 세포로 형질전환시키는 단일 세포로부터 생긴다. 이러한 형질전환은 종종 전암성 병변으로부터 악성 종양으로 진행되는 단계 과정이다. 노화, 유전적 기여 및 외부 제제, 예컨대 물리적 발암물질(예를 들어, 자외선 및 이온 방사선)에 대한 노출, 화학적 발암물질(예를 들어, 석면, 담배 연기 성분 등) 및 생물학적 발암물질(예를 들어, 특정 바이러스, 박테리아 및 기생충)을 포함하는 다수의 인자는 이런 진행에 기여한다.

[0008] 암의 예방, 진단 및 치료는 다수의 상이한 형태를 취할 수 있다. 예방은 소인적 요인(예를 들어, 특정 유전자 변이)의 선별, 거동 변경(예를 들어, 흡연, 식이요법 및 신체활동량) 및 바이러스에 대한 백신접종(예를 들어, 인유두종 바이러스 B형 간염 바이러스)에 대한 선별을 포함할 수 있다. 치료는 화학요법, 방사선요법 및 종양 또는 암성 조직의 수술적 제거를 포함할 수 있다. 수많은 예방 및 치료의 이용 가능성에도 불구하고, 이러한 방법은 종종 가까운 장래에 암을 효과적으로 예방하고/하거나 치료하는 데 제한된 성공으로 충족된다.

[0009] 따라서, 암의 예방 및/또는 치료를 위한 조성물 및 방법의 동정 및 개발을 위한 필요가 존재한다. 더 나아가, 암에 걸린 대상체에서 질환 진행을 지연시키고/시키거나 사망률을 감소시키기 위한 더 효과적인 치료가 필요하다.

발명의 내용

[0010] 본 발명의 양상은 텔로머라제 역전사효소 암 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 백신을 포함한다. 백신은 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열, 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열; 서열 번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 서열번호 2에 대해 적어도 95% 동일성인 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0011] 본 발명의 다른 양상은 포유류에서 텔로머라제 역전사효소(TERT)에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 포함하되, 이 방법은 치료가 필요한 포유류에게 제1항의 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 핵산 분자는 포유류에서 발현되고 다음의 면역 반응 중 하나 이상이 유도된다: (a) TERT에 특이적인 체액성 면역 반응, (b) 비치료 포유류에 비해 증가된 수준의 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 및 인터페론- γ (IFN- γ)를 포함하는 면역 반응, 및 (c) TERT에 특이적인 세포 면역 반응.

[0012] 본 발명의 일부 양상은 포유류에서 암을 치료하는 방법을 추가로 포함하되, 이 방법은 치료가 필요한 포유류에

게 상기-기재한 백신 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 포유류에서 폴리뉴클레오타이드가 발현되고 암이 치료된다.

도면의 간단한 설명

[0013]

본 명세서에 개시된 그리고 도면에 추가로 기재하는 바와 같은 서열은 다음과 같다:

서열번호 1은 합성 공통(SYNCON) dTERT에 대응한다.

서열번호 2는 서열번호 1에 의해 암호화된 아미노산 서열에 대응한다.

서열번호 3은 플라스미드 pGX1414에 대한 핵산 서열(삽입물로서 서열번호 1을 함유하는 pGX0001)에 대응한다.

서열번호 4는 dTERT-PL을 암호화하는 핵산 서열(서열번호 5)에 대응하는데, 이는 텔로머라제 활성이 없는 7개의 점 돌연변이를 갖는 개 텔로머라제 역전사효소(dTERT) 폴리펩타이드이다(치환: R579Y, D996Y, K633A, R638A, D719A, Y724A 및 D876A. 서열번호 4는 pGX1415 삽입물이다.

서열번호 5(dTERT-PL)는 서열번호 4에 의해 암호화된 아미노산 서열에 대응한다.

서열번호 6은 서열번호 5의 면역우성 에피토프에 대응한다.

서열번호 7은 dTERT에 대한 아미노산 서열에 대응한다.

도 1은 실시예 1에 기재된 플라스미드 백터 pGX1414(서열번호 3)의 다이어그램을 도시한 도면.

도 2는 실시예 1에 기재된 플라스미드 백터 pGX0001의 다이어그램을 도시한 도면.

도 3A는 실시예 2에 기재된 바와 같은 마우스에서의 pGX1414(서열번호 3) 면역 스케줄의 다이어그램을 도시한 도면. 도 3B는 pGX1414(서열번호 3)에 의해 유도된 총 SYNCON dTERT(서열번호 1)-특이적 IFN- γ 반응을 도시하는 그래프. 도 3C는 pGX1414에 의해 유도되는 총 천연 dTERT-특이적 IFN- γ 반응을 도시하는 그래프. pGX1414를 이용하는 4회의 면역화 후에 IFN- γ 분비 세포/10⁶개의 비장세포의 빈도를 IFN- γ ELISpot 분석에 의해 결정하였다. 각각의 마우스(5마리 마우스/그룹)로부터의 비장세포를 SYNCON dTERT 웨პ타이드(서열번호 2) 또는 천연 dTERT 웨პ타이드(서열번호 7) 중 하나로 자극하였다. 결과를 평균 ± SEM으로서 제시한다.

도 4는 개 TERT 백신접종 프로그램으로부터의 효소-결합 면역스팟(ELISpot) 결과를 도시한 도면. pGX1414를 이용하여 10mg/ml로 7마리의 개를 면역화시켰다. 결과를 제0주(면역화 없음, 사전 채혈), 제4주(사전 채혈 후 면역화 #1), 제8주(사전 채혈 후 면역화 #2) 및 제12주(사전 채혈 후 면역화 #3)로 나타낸다. 상기 결과는 TERT DNA 백신접종이 개에서의 세포 매개 면역 반응을 유도한다는 것을 나타낸다.

도 5A는 삽입물로서 서열번호 4를 함유하는 플라스미드 백터 pGX0001인 플라스미드 백터 pGX1415의 다이어그램을 도시한 도면. 도 5B는 명명된 효소에 의해 분해된 플라스미드 pGX1415의 겔 전기영동 결과를 도시한 도면.

도 6는 형질감염 세포에서 개 TERT-PL(서열번호 5를 암호화하는 서열번호 4)의 고수준 발현을 도시한 도면. 293T 세포를 서열번호 5를 암호화하는 pVax1 또는 개 TERT-PL DNA 작제물(10 μ g)에 의해 형질감염시켰다. 형질감염 후 2일에, 세포를 형질감염 세포 내 TERT의 발현을 위해 항-TERT 항체로 고정시키고 염색하였다.

도 7은 dTERT-PL에 대한 면역 스케줄(pGX1415로서 투여)의 다이어그램을 도시한 도면.

도 8은 dTERT-PL(pGX1415로서 투여) 백신에 의한 세포 면역 반응의 유도는 마우스라는 것을 도시한 도면. dTERT-PL(pGX1415)에 의해 유도되는 세포 면역 반응을 C57BL/6 마우스에서 시험하였다. 백신(25 μ g)으로부터의 3 번째 면역화의 1주 후의 총 dTERT-특이적 IFN- γ 반응. 각각의 마우스(4마리 마우스/그룹)으로부터의 비장세포를 dTERT 웨პ타이드 풀을 이용하여 별개로 자극하였다. 데이터는 dTERT-PL DNA 백신접종 후 면역 반응의 장기간 지속을 시사한다. 결과는 조합된 웨პ타이드 풀을 평균 ± SEM로서 제시한다.

도 9는 C57/BL6 마우스에서 dTERT-PL (pGX1415) DNA 백신의 우세한 세포독성 T 럼프구(CTL) 에피토프의 예측을 도시한 도면. 전기천공법에 의한 3회 백신접종 후 마우스에서 개 특이적 dTERT-PL DNA 플라스미드는 상당한 세포 면역 반응을 유발한다. 개 TERT의 고수준의 IFN- γ T 세포 특이적 면역우성 및 아우성(subdominant) 에피토프를 비장에서 관찰하였다. dTERT-PL DNA 백신의 면역우성 에피토프로서 에피토프 FNSVHLRELSEAEVR(서열번호 6)을 (ELIspot을 이용하는 에피토프 맵핑을 통해) 동정하였다. X-축 상에서 기질 풀의 수를 동정하였다.

도 10은 DNA 작제물(pGX1415) 발현 개 TERT(서열번호 5)에 의한 면역화 후 체액성 면역 반응을 도시한 도면.

(A) 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 나타내는 면역화된 마우스의 혈청 중의 총 IgG 항체 역가. 마우스의 각각의 그룹(n=5)을 50 μ g의 dTERT-PL DNA로 면역화시켰다. (B) dTERT를 암호화하는 DNA 플라스미드 백신으로 형질감염시키고, 마우스로부터의 면역 혈청으로 처리한 293T 세포에서의 면역형광 분석(IFA)에 의해 특이성을 검출하였다. pVax1 혈청에 비해 dTERT-PL 백신접종 마우스 혈청에서의 ELISA에 의한 항-TERT 총 IgG 수준 및 IFA에 의한 특이성을 관찰하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

본 발명의 양상은 특정 암 및 종양을 치료하거나 또는 예방하도록 특화될 수 있는 백신을 포함한다. 항원은 본 명세서에서 개TERT, 개-TERT, 또는 dTERT로서 지칭되는 카니스 패밀리아리스(*Canis familiaris*)(개)로부터 단리된 암 관련 항원 텔로머라제 역전사효소에 대해 설계되었다. 예를 들어, 항원 공통(예를 들어, 서열번호 5를 암호화하는 서열번호 4) 서열은 암 관련 항원 dTERT에 대해 설계되었다. 개 암은 인간과 유사한 발생률로 일어나고, 예를 들어, 조직학적 외관, 종양 유전자, 생물학적 거동 및 통상적인 요법에 대한 반응을 포함하는 인간 암에 의한 다수의 특징을 공유한다. 인간에서 관찰되는 바와 같이, TERT 활성은 대부분 종양 조직으로 국한되며 대다수의 정상 개 조직에 없다. 이렇게 해서, 본 발명은 포유류, 특히 개에서의 암 면역요법에 대한 항원으로서 dTERT 공통 서열을 이용한다. dTERT 항원은 특정 암의 특화된 백신 예방 및 치료를 허용하기 위해 본 발명의 백신에서 다른 암 관련 항원, 예를 들어, 타이로시나제(Tyr), 바람직하게는 흑색종(PRAME) 발현 항원, 타이로시나제 관련 단백질 1(Tyrp1), 고환암 항원(NY-ESO-1), B형 간염 바이러스 항원 및 월름 종양 1 항원(WT-1)과 조합하여 사용될 수 있다. 백신은 예방 또는 치료가 필요한 대상체의 암의 특징 또는 예방을 위한 특정 암 항원의 임의의 조합을 제공할 수 있다.

[0015]

재조합 암 항원은 항원-특이적 T 세포 및/또는 고역가 항체 반응을 유도함으로써, 항원을 발현시키는 암 또는 종양과 관련되거나 또는 이에 대해 반응성인 면역 반응을 유도하거나 또는 유발할 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 유발된 면역 반응은 세포성, 체액성 또는 세포성과 체액성 면역 반응 둘 다일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 유발된 세포 면역 반응은 인터페론-감마(IFN- γ) 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNF- α)의 유도 또는 분비를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 유도 또는 유발된 면역 반응은 항원을 발현시키는 종양 또는 암을 촉진시키는 하나 이상의 면역 억제 인자, 예를 들어, 이하로 제한되는 것은 아니지만, MHC 제시를 하향 조절하는 인자, 항원-특이적 조절 T 세포(Treg), PD-L1, FasL, 사이토카인을 상향 조절하는 인자 예컨대 IL-10 및 TFG- β , 종양 관련 대식세포, 종양 관련 섬유아세포, 면역 억제 세포에 의해 생성되는 가용성 인자, CTLA-4, PD-1, MDSC, MCP-1 및 면역관문 분자를 감소시키거나 또는 저해할 수 있다.

[0016]

1. 정의

[0017]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 상충되는 경우에, 정의를 포함하는 본 문현으로 조절할 것이다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 동일한 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질을 이하에 기재한다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히 및 다른 참고문헌은 그들의 전문이 참고로 포함된다. 본 명세서에 개시된 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 특정 실시형태를 기재하는 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0018]

본 명세서에서 사용되는 용어 "포함한다(comprise(s))", "포함한다(include(s))", "갖는", "가지다", "할 수 있다", "함유하다(contain(s))" 및 이들의 변형은 추가적인 작용 또는 구조의 가능성을 불가능하게 하지 않는 제약을 두지 않은 용어 또는 단어가 되는 것으로 의도된다. 단수 용어는 문맥에서 달리 명확하게 나타나지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 본 개시내용은 또한 명확하게 제시되든 아니든 본 명세서에 제시된 실시형태 또는 요소를 "포함하고", "이루어지고" 그리고 "본질적으로 이루어진" 다른 실시형태를 상정한다.

[0019]

본 명세서의 수치적 범위의 열거에 대해, 동일한 정도의 정확도 사이에 있는 각각의 개재 숫자는 분명하게 상정된다. 예를 들어, 범위 6 내지 9에 대해, 6 및 9에 추가로 숫자 7 및 8이 상정되며, 범위 6.0 내지 7.0에 대해, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0이 명확하게 상정된다.

[0020]

본 명세서에 사용되는 "애주번트"는 DNA 플라스미드에 의해 암호화된 항원 및 본 명세서에서 이후에 기재되는 암호화 핵산의 면역원성을 향상시키기 위해 본 명세서에 기재된 DNA 플라스미드 백신에 첨가된 임의의 분자를 의미한다.

[0021]

본 명세서에서 사용되는 "항체"는 Fab, F(ab')2, Fd 및 단일쇄 항체, 다이어바디(diabodies), 이중특이성 항체,

이작용성 항체 및 이의 유도체를 포함하는 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 부류, 또는 이들의 단편 또는 유도체의 항체를 의미한다. 항체는 목적으로 하는 애피토프 또는 그들로부터 유래된 서열에 대해 충분한 결합 특이성을 나타내는 포유류의 혈청 샘플, 다클론성 항체, 친화도 정제 항체 또는 이들의 혼합물로부터 단리된 항체일 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 사용되는 "암호 서열" 또는 "암호화 핵산"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미한다. 암호 서열은 핵산이 투여되는 개체 또는 포유류의 세포 내 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 "상보체" 또는 "상보성"은 핵산이 핵산 분자의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 사이의 왓슨-크릭(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 후거스틴(Hoogsteen) 염기쌍을 의미할 수 있다는 것을 의미한다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 "공통" 또는 "공통 서열"은 상이한 유기체로부터의 동일한 유전자에 대한 다중 서열의 정렬 분석에 기반하는 폴리펩타이드 서열을 의미한다. 공통 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 핵산 서열이 준비될 수 있다. 이러한 단백질을 암호화하는 공통 서열 및/또는 핵산 분자를 포함하는 단백질을 포함하는 백신은 항원에 대해 광범위 면역을 유도하기 위해 사용될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되는 "전기천공법", "전기 침투 가능화(electro-permeabilization)" 또는 "전기-역학 향상(electro-kinetic enhancement)"은 생체분자 내 생체 분자 내 미시적 경로(기공)를 유도하기 위한 막관동 전기장 펄스의 사용을 의미하며; 그들의 존재는 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온 및 물과 같은 생체분자가 세포막의 한쪽 측면으로부터 다른 쪽 측면까지 통과하도록 허용한다.

[0026] 핵산 서열에 대해 본 명세서에 사용되는 "단편"은 본 명세서에 개시된 항원과 교차 반응하는 포유류에서 면역 반응을 유발할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열 또는 이의 일부를 의미한다. 단편은 이하에 제시되는 단백질 단편을 암호화하는 다양한 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나로부터 선택되는 DNA 단편일 수 있다. 단편은 이하에 제시되는 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.

[0027] 폴리펩타이드 서열에 대해 "단편" 또는 "면역원성 단편"은 본 명세서에 개시된 항원과 교차 반응하는 포유류에서 면역 반응을 유발할 수 있는 폴리펩타이드를 의미한다. 단편은 이하의 다양한 아미노산 서열 중 적어도 하나로부터 선택된 폴리펩타이드 단편일 수 있다. 공통 단백질의 단편은 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.

[0028] 본 명세서에 사용되는 용어 "유전자 작제물"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 암호 서열은 핵산이 투여되는 개체의 세포 내 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현 가능한 형태"는 개체의 세포 내에 존재할 때, 암호 서열이 발현되도록 단백질을 암호화하는 암호 서열에 작동 가능하게 연결된 필요한 조절 요소를 함유하는 유전자 작제물을 지칭한다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상동성"은 상보성 정도를 지칭한다. 부분적 상동성 또는 완전한 상동성(즉, 동일성)이 있을 수 있다. 표적 핵산에 대한 혼성화로부터 완전히 상보성인 서열을 적어도 부분적으로 저해하는 부분적 상보성 서열은 기능적 용어 "실질적으로 상동성"을 이용하여 지칭된다. 이중-가닥 핵산 서열, 예컨대 cDNA 또는 게놈 클론에 대해 사용될 때, 본 명세서에서 사용되는 용어 "실질적으로 상동성"은 낮은 염격성 조건 하에 이중-가닥 핵산 서열 가닥에 혼성화될 수 있는 프로브를 지칭한다. 단일-가닥 핵산 서열에 대해 사용될 때, 본 명세서에서 사용되는 용어 "실질적으로 상동성"은 낮은 염격성의 조건 하에서 단일-가닥 핵산 주형 서열에 혼성화될 수 있는(즉, 상보체인) 프로브를 지칭한다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역관문 저해제"는 면역계 내 임의의 성분의 억제를 방지하는 임의의 핵산 또는 단백질, 예컨대 MHC 부류 제시, T 세포 제시 및/또는 분화, B 세포 제시 및/또는 분화, 및 사이토카인, 케모카인 또는 면역 세포 증식 및/또는 분화를 위한 신호전달을 지칭한다.

[0031] 2 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 "동일한" 또는 "동일성"은 서열이 구체화된 영역에 걸쳐 동일한 잔기의 구체화된 백분율을 가진다는 것을 의미한다. 백분율은 2개의 서열을 최적으로 정렬하고, 구체화된 영역에 걸쳐 2개의 서열을 비교하며, 동일한 잔기가 서열 둘 다에서 생기는 위치의 수

를 결정하여 매칭된 위치의 수를 얻고, 매칭된 위치의 수를 구체화된 영역 내 위치의 총 수로 나누고 나서, 결과에 100을 곱하여서 서열 동일성 백분율을 얻음으로써 계산될 수 있다. 두 서열이 상이한 길이를 갖거나 정렬이 하나 이상의 엇갈린 말단을 생성하고 구체화된 비교 영역이 단일 서열만을 포함하는 경우에, 단일 서열 잔기는 분모에 포함되지만, 계산의 분자에는 포함되지 않는다. DNA와 RNA를 비교할 때, 티민(T) 및 유라실(U)은 동등한 것으로 고려될 수 있다. 동일성은 수동으로 또는 컴퓨터 서열 알고리즘, 예컨대 BLAST 또는 BLAST 2.0을 이용함으로써 수행될 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 "면역 반응"은 항원 도입에 대한 반응에서 숙주의, 예를 들어 포유류의 면역계의 활성화를 의미한다. 면역 반응은 세포성 또는 체액성 반응, 또는 둘 다의 형태일 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 함께 공유 결합된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미한다. 단일 가닥의 도시는 또한 상보성 가닥의 서열을 나타낸다. 따라서, 핵산은 또한 도시된 단일 가닥의 상보성 가닥을 포함한다. 주어진 핵산과 동일한 목적을 위해 핵산의 다양한 변이체가 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 상보체를 포함한다. 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건 하에서 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화되는 프로브를 포함한다.

[0034] 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 또는 이중 가닥 서열과 단일 가닥 서열 둘 다의 부분을 함유할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈과 cDNA, RNA 또는 혼성체일 수 있으며, 여기서 핵산은 데옥시리보-와 리보-뉴클레오타이드의 조합물, 및 유라실, 아데닌, 티민, 사이토신, 구아닌, 이노신, 잔틴 하이포잔틴, 아이소사이토신 및 아이소구아닌을 포함하는 염기의 조합물을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법에 의해 또는 재조합 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 그것이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있다는 것을 의미한다. 프로모터는 그의 제어 하에서 유전자의 5'(상류) 또는 3'(하류)에 위치될 수 있다. 프로모터와 유전자 사이의 거리는 프로모터가 유래된 유전자에서 그것이 제어하는 프로모터와 유전자 사이의 거리와 거의 동일할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 이 거리의 변형은 프로모터 기능의 상실 없이 제공될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 "펩타이드", "단백질" 또는 "폴리펩타이드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있고, 천연, 합성 또는 천연과 합성의 조합일 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 "프로모터"는 세포 내 핵산의 발현을 수여하거나, 활성화시키거나 또는 향상시킬 수 있는 합성 또는 천연-유래 분자를 의미한다. 프로모터는 발현을 추가로 향상시키기 위해 그리고 이의 공간적 발현 및/또는 일시적 발현을 변경시키기 위해 하나 이상의 특이적 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 원위 인핸서 또는 리프레서를 포함할 수 있는데, 이는 전사의 시작 부위로부터 수천 개의 염기쌍만큼 많이 위치될 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 기관에 대해 또는 발현이 일어나는 발생 단계에 대해 또는 외적 자극, 예컨대 생리적 스트레스, 병원균, 금속 이온 또는 유도체에 반응하여 구성적으로 또는 상이하게 유전자 성분의 발현을 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 오퍼레이터-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 또는 SV40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함한다.

[0038] "신호 펩타이드" 및 "리더 서열"은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되고, 본 명세서에 제시된 단백질의 아미노 말단에 연결될 수 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 신호 펩타이드/리더 서열은 전형적으로 단백질의 국소화를 지시한다. 본 명세서에서 사용되는 신호 펩타이드/리더 서열은 바람직하게는 그것이 생성되는 세포로부터의 단백질의 분비를 용이하게 한다. 신호 펩타이드/리더 서열은 종종 세포로부터 분해 시 성숙 단백질로서 종종 지칭되는 단백질의 나머지로부터 종종 절단된다. 신호 펩타이드/리더 서열은 단백질의 아미노 말단(즉, N 말단)에 연결된다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 "엄격한 혼성화 조건"은 제1 핵산 서열(예를 들어, 프로브)가, 예컨대 핵산의 복합체 혼합물에서 제2 핵산 서열(예를 들어, 표적)에 혼성화되는 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 상이한 환경에서 상이할 것이다. 엄격한 조건은 정해진 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열 융점(T_m)보다 약 5 내지 10°C 더 낮도록 선택될 수 있다. T_m 은 표적에 대한 프로브 상보성의 50%가 평형 상태에서 표적 서열에

흔성화하는 (정해진 이온 강도, pH 및 혼산 농도 하의) 온도일 수 있다(표적 서열은 T_m에서 과량으로 존재할 수 있기 때문에, 프로브의 50%는 평형상태로 점유된다). 염격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 1.0M 미만의 나트륨 이온, 예컨대 약 0.01 내지 1.0M 나트륨 이온 농도(또는 다른 염)이고 온도는 짧은 프로브(예를 들어, 약 10 내지 50개의 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 30°C이고 긴 프로브(예를 들어, 약 50개 초과의 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 60°C인 것일 수 있다. 염격한 조건은 또한 탈안정제, 예컨대 품아마이드의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 흔성화를 위해, 양의 신호는 배경 흔성화의 적어도 2 내지 10배 일 수 있다. 예시적인 염격한 흔성화 조건은 다음을 포함한다: 50% 품아마이드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42°C, 또는 5x SSC, 1% SDS에서 인큐베이션한 다음, 65°C에서 인큐베이션, 65°C에서 0.2x SSC 및 0.1% SDS 중에서 세척.

[0040] 본 명세서에 사용되는 "대상체"는 본 명세서에 기대된 백신에 의한 면역화를 원하거나 또는 필요한 포유류를 의미할 수 있다. 포유류는 개, 인간, 침팬지, 고양이, 말, 소, 마우스 또는 래트일 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "실질적으로 상보성"은 제1 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540개 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 영역에 걸쳐 제2 서열의 상보체에 대해 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% 동일하다는 것, 또는 2개의 서열이 염격한 흔성화 조건 하에서 흔성화된다는 것을 의미한다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 동일한"은 제1 서열이 제2 서열의 상보체에 대해 실질적으로 상보성이라면, 제1 서열 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 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 영역에 걸쳐, 또는 혼산에 대해 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% 동일하다는 것을 의미한다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "치료" 또는 "치료하는"은 질환을 예방하거나, 억제하거나 또는 완전히 제거하는 수단을 통해 질환으로부터 동물을 보호하는 것을 의미할 수 있다. 질환을 예방하는 것은 질환의 개시 전에 동물에 대해 본 발명의 백신을 투여하는 것을 수반한다. 질환을 억제하는 것은 질환의 유도 후이지만 그의 임상 출현 전에 동물에 대해 본 발명의 백신을 투여하는 것을 수반한다. 질환을 억누르는 것은 질환의 임상 출현 전에 동물에 대해 본 발명의 백신을 투여하는 것을 수반한다.

[0044] 혼산에 관해 본 명세서에서 사용되는 "변이체"는 (i) 기준 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 단편; (ii) 기준 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부의 상보체; (iii) 기준 혼산 또는 이의 상보체에 대해 실질적으로 동일한 혼산; 또는 (iv) 기준 혼산, 이의 상보체 또는 이에 대해 실질적으로 동일한 서열에 대해 염격한 조건 하에 흔성화되는 혼산을 의미한다.

[0045] 웹타이드 또는 폴리웹타이드에 대한 "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 기준 단백질에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 유사한 특성(예를 들어, 친수성, 하전 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로의 아미노산의 대체는 전형적으로 부수적 변화를 수반하는 것으로 당업계에 인식되어 있다. 이를 부수적 변화는, 당업계에서 이해되는 바와 같이 부분적으로 아미노산의 소수성 지수를 고려함으로써 확인될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132 (1982)] 참조). 아미노산의 소수성 지수는 그의 소수성 및 전하의 고려사항에 기반한다. 유사한 소수성 지수의 아미노산은 치환될 수 있고, 단백질 기능을 여전히 보유한다는 것은 당업계에 공지되어 있다. 일 양상에서, ±2의 소수성 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 보유하는 치환을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 웹타이드에 관해 아미노산의 친수성의 고려는 항원성 및 면역원성과 상당히 상관관계가 있는 것으로 보고된 유용한 측정인 해당 웹타이드의 가장 큰 국소 평균 친수성을 허용한다(예를 들어, 미국 특허 제4,554,101호 참조). 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에 이해되는 바와 같이 생물학적 활성, 예를 들어, 면역원성을 보유하는 웹타이드를 초래할 수 있다. 치환은 서로 ±2 내의 친수성 값을 갖는 아미노산에 의해 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수와 친수성 값을 둘 다 해당 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향받는다. 해당 관찰과 일치되게, 생물학적 기능에 적합한 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 나타내는 바와 같은 아미노산의 상대적 유사성 및 특히 해당 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다.

[0046] 변이체는 전체 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 대해 실질적으로 동일한 혼산 서열일 수 있다. 혼산 서열

은 유전자 서열 또는 이의 단편에 대해 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 서열의 전장 또는 이의 단편에 대해 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.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 복제기점을 함유하는 핵산 서열을 의미한다. 벡터는 바이러스 벡터, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체(BAC), 또는 효모 인공 염색체(YAC)일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자기-복제성 염색체외 벡터일 수 있으며, 바람직하게는 DNA 플라스미드이다. 벡터는 하나 이상의 이종성 핵산 서열을 함유하거나 또는 포함할 수 있다.

2. 백신

[0049] 본 발명은 항암 백신에 관한 것이다. 백신은 1종 이상의 암 항원 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 1종 이상의 암 항원을 암호화하는 1종 이상의 핵산 분자를 포함할 수 있다. 백신은 종양 성장을 방지할 수 있다. 백신은 종양 성장을 감소시킬 수 있다. 백신은 종양 세포의 전이를 방지할 수 있다. 일부 예에서, 백신은 간암, 전립선암, 흑색종, 혈액암(예를 들어, 림프종, 다발성 골수종 및 백혈병), 두경부암, 교모세포종, 재발성 호흡기 유두종증(recurrent respiratory papillomatosis: RRP) 및 암, 자궁경부암, 뇌암, 신세포암종, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암종), 방광암, 유방암, 자궁암, 고환암, 결장암, 담낭암, 후두암, 갑상선암, 위암, 침샘암 또는 췌장암을 치료하기 위해 표적화될 수 있다.

[0050] 백신 개발의 제1 단계는 면역계에 의해 인식되지 않고 자기-항원인 암 항원을 동정하는 것이다. 동정된 암 항원은 면역계에 의해 인식되도록 자기 항원으로부터 외래 항원까지 변화된다. 자기 항원으로부터 외래 항원까지 재조합 암 항원의 핵산 및 아미노산 서열의 재설계는 면역계에 의한 항원의 관용(tolerance)을 파괴한다. 관용을 파괴하기 위해, 몇몇 재설계 측정은 이하에 기재하는 바와 같은 암 항원에 적용될 수 있다.

[0051] 공통 암 항원을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 설계하기 위한 한 가지 방법은 천연 암 항원의 전반적인 아미노산 서열에서 특정 아미노산을 변화시키는 돌연변이를 도입하는 것이다. 돌연변이의 도입은 동물 대상체에 대해 보편적으로 적용될 수 없지만, 얻어진 아미노산 서열이 관용을 파괴하거나 또는 면역 반응을 생성하기 위해 외래 항원을 고려하는데 충분하게 변화하도록 암 항원을 크게 변형시키지 않는다. 다른 방법은 대응하는 천연 암 항원에 대해 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 핵산 또는 아미노산 서열 동일성을 갖는 공통 재조합 암 항원을 생성하는 것일 수 있다. 천연 암 항원은 특정 암 또는 암 종양과 정상적으로 관련되는 항원이다. 암 항원에 따라서, 암 항원의 공통 서열은 포유류 종에 걸쳐 있거나 또는 종의 하위 유형 내이거나 또는 바이러스 균주 또는 혈청형에 걸쳐 있을 수 있다. 일부 암 항원은 암 항원의 야생형 아미노산 서열로부터 크게 변하지 않는다. 일부 암 항원은 공통 서열이 생성될 수 없는 종에 따라 상당히 다른 핵산/아미노산 서열을 가진다. 이를 예에서, 대응하는 천연 암 항원에 대해 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 핵산 또는 아미노산 서열 동일성을 갖는 관용을 파괴하고 면역 반응을 생성하는 재조합 암 항원이 생성된다.

[0052] 백신의 재조합 암 항원은 그 자체로서 인식되지 않으며, 따라서 관용을 파괴한다. 관용의 파괴는 항원-특이적 T 세포 및/또는 고역가 항체 반응을 유도함으로써, 항원을 발현시키는 암 또는 종양과 관련되거나 또는 이에 대해 반응성인 면역 반응을 유도하거나 또는 유발할 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 유발된 면역 반응은 세포성 반응, 체액성 또는 세포성 반응과 체액성 면역 반응 둘 다일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 유발된 세포 면역 반응은 인터페론-감마(IFN- γ) 및/또는 종양 피사 인자 알파(TNF- α)의 유도 또는 분비를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 백신은 백신을 받지 않은 비처리 포유류에 비해 증가된 수준의 종양 피사 인자- α (TNF- α) 및 인터페론- γ (IFN- γ)를 포함하는 포유류에서 면역 반응을 유도할 수 있다. 다른 실시형태에서, 유도 또는 유발된 면역 반응은 항원을 발현시키는 종양 또는 암을 촉진시키는 하나 이상의 면역 억제 인자, 예를 들어, 이하로 제한되는 것은 아니지만, MHC 제시를 하향 조절하는 인자, 항원-특이적 조절 T 세포(Treg), PD-L1, FasL, 사이토카인을 상향 조절하는 인자 예컨대 IL-10 및 TFG- β 종양 관련 대식세포, 종양 관련 섬유아세포, 면역 억제 세포에 의해 생성되는 가용성 인자, CTLA-4, PD-1, MDSC, MCP-1 및 면역관문 분자를 감소시키거나 또는 저해할 수 있다.

[0053] 특정 실시형태에서, 상기 백신은 (1) 단핵구 화학주성 단백질-1(MCP-1) 생성을 차단함으로써, 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 자연시키고 종양 성장을 억제하는 항체를 생성하는 B 세포 반응을 통한 체액성 면역; (2) 종양 세포를 공격하고 사멸시키는 세포독성 T 림프구, 예컨대 CD8 $^{+}$ (CTL)의 증가; (3) T 헬퍼 세포 반응의 증가; (4) 그리고 IFN- γ 및 TNF- α , 또는 바람직하게는 앞서 언급한 것 모두를 통한 염증 반응의 증가를 유도함으로써 종양

세포의 클리어런스를 매개하거나 또는 성장을 방지할 수 있다. 백신은 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44% 및 45%만큼 무중양 생존을 증가시킬 수 있다. 백신은 면역화 후에 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%만큼 감소시킬 수 있다. 백신은 골수 유래 억제 세포에 의해 분비된 사이토카인인 단핵구 화학주성 단백질 1(MCP-1)의 증가를 방지하고 차단시킬 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%만큼 증가시킬 수 있다.

[0054] 백신은 백신을 투여하지 않은 대상체에서의 세포 면역 반응에 비해 백신을 투여한 대상체에서의 세포 면역 반응을 약 50배 내지 약 6000배, 약 50배 내지 약 5500배, 약 50배 내지 약 5000배, 약 50배 내지 약 4500배, 약 100배 내지 약 6000배, 약 150배 내지 약 6000배, 약 200배 내지 약 6000배, 약 250배 내지 약 6000배 또는 약 300배 내지 약 6000배만큼 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 백신은 백신을 투여하지 않은 대상체에서의 세포 면역 반응에 비해 백신을 투여한 대상체에서의 세포 면역 반응을 약 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배, 550배, 600배, 650배, 700배, 750배, 800배, 850배, 900배, 950배, 1000배, 1100배, 1200배, 1300배, 1400배, 1500배, 1600배, 1700배, 1800배, 1900배, 2000배, 2100배, 2200배, 2300배, 2400배, 2500배, 2600배, 2700배, 2800배, 2900배, 3000배, 3100배, 3200배, 3300배, 3400배, 3500배, 3600배, 3700배, 3800배, 3900배, 4000배, 4100배, 4200배, 4300배, 4400배, 4500배, 4600배, 4700배, 4800배, 4900배, 5000배, 5100배, 5200배, 5300배, 5400배, 5500배, 5600배, 5700배, 5800배, 5900배 또는 6000배만큼 증가시킬 수 있다.

[0055] 백신은 백신을 투여하지 않은 대상체에서의 인터페론 감마 수준(IFN- γ)에 비해 백신을 투여한 대상체에서의 IFN- γ 수준을 약 50배 내지 약 6000배, 약 50배 내지 약 5500배, 약 50배 내지 약 5000배, 약 50배 내지 약 4500배, 약 100배 내지 약 6000배, 약 150배 내지 약 6000배, 약 200배 내지 약 6000배, 약 250배 내지 약 6000배 또는 약 300배 내지 약 6000배만큼 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 백신은 백신을 투여하지 않은 대상체에서의 IFN- γ 수준에 비해 백신을 투여한 대상체에서의 IFN- γ 수준을 약 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배, 550배, 600배, 650배, 700배, 750배, 800배, 850배, 900배, 950배, 1000배, 1100배, 1200배, 1300배, 1400배, 1500배, 1600배, 1700배, 1800배, 1900배, 2000배, 2100배, 2200배, 2300배, 2400배, 2500배, 2600배, 2700배, 2800배, 2900배, 3000배, 3100배, 3200배, 3300배, 3400배, 3500배, 3600배, 3700배, 3800배, 3900배, 4000배, 4100배, 4200배, 4300배, 4400배, 4500배, 4600배, 4700배, 4800배, 4900배, 5000배, 5100배, 5200배, 5300배, 5400배, 5500배, 5600배, 5700배, 5800배, 5900배 또는 6000배만큼 증가시킬 수 있다.

[0056] 백신은 DNA 백신일 수 있다. DNA 백신은, 예를 들어, 미국 특허 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 있다. DNA 백신은 염색체 내로의 도입을 저해하는 요소 또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0057] 백신은 1종 이상의 암 항원의 RNA 분자일 수 있다. RNA 백신은 세포 내로 도입될 수 있다.

[0058] 본 발명의 백신은 효과적인 백신에 필요한 특징, 예컨대 백신 그 자체가 질병 또는 사망을 야기하지 않도록 안전함; 질병에 대한 보호; 중화 항체 유도; 보호 T 세포 반응의 유도; 및 투여의 용이함, 거의 없는 부작용, 생물학적 안정성 및 저렴한 용량 당 비용의 제공을 가질 수 있다. 백신은 본 명세서에 논의되는 암 항원을 함유함으로써 이를 특징 중 일부 또는 모두를 달성할 수 있다.

[0059] a.dTERT

[0060] 본 발명의 백신은 암 항원 dTERT, 이의 단편, 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. dTERT는 염색체 단축에 기인하는 세포사를 방지하기 위해 텔로머라제의 말단 상에서 TTAGGG 태그를 합성하는 개(카니스 파밀리아리스) 텔로머라제 역전사효소이다. dTERT 단백질은 1123개의 아미노산 잔기로 이루어지며, TERT 패밀리 구성원의 모든 신호 모티프를 함유한다. 이전에 동정된 포유류 TERT 단백질과의 서열 비교는 dTERT가 인간 TERT(hTERT) 단백질에 대해 가장 높은 수준의 서열 유사성을 나타낸다는 것을 입증한다(예를 들어, 문헌[Nasir et al., *Gene*, 336(1): 105-13 (2004)] 참조). dTERT 아미노산 서열이 동정되었으며, 이 중 몇몇은 젠뱅크 데이터베이스에 기탁되었다(예를 들어, 젠뱅크 수탁 번호 NP_001026800, NP_001026800.1, XP_004411686, XP_004768446, XP_004812556, EFB14781, XP_004812554, XP_004768447, XP_004440093, XP_004411687, XP_004812555, XP_004274558, NP_937983, AAC51724, NP_001177896, XP_004380340, NP_001039707, XP_003950543, NP_001231229 및 DAA17756 참조). 과증식성 개 세포 및 인간 세포는 각각 dTERT 및 hTERT의 비정상적으로 높은 발현을 가질 수 있다.

hTERT 암 항원은, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2014/0186384호 및 국제 특허 출원 공개 WO 2014/144885에 추가로 기재되어 있다.

[0061] 추가적으로, hTERT 유전자로 형질감염된 수지상 세포에서 hTERT 발현은 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 유도하고 항원-특이적 방식으로 CD4⁺ T 세포를 유발할 수 있기 때문에, 이는 dTERT 항원이 면역치료 방법에서, 예컨대 본 명세서에 기재된 것에서 노쇠를 자연시키기 위해 그리고 선택 항원을 제시하는 그들의 능력을 지속시키기 위해 항원 제시 세포(APC) 내에서 발현될 수 있다는 것을 시사한다.

[0062] dTERT 항원은 흑색종, 전립선암, 간암, 자궁경부암, 재발성 호흡기 유두종증(RRP), 및 항문암, 두경부암, 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 골수종), 폐 암종(예를 들어, 비소세포 폐 암종), 식도 편평 세포 암종, 방광암, 결장직장암, 위암, 간암종, 뇌암(예를 들어, 고모세포종), 췌장암, 활액 암종, 고환암, 및 위암을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 개암과 관련되거나 또는 이에 의해 발현될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 dTERT 항원을 포함할 때 본 백신은 임의의 앞서 언급한 암에 걸린 포유류 대상체(예를 들어, 개)를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0063] dTERT 항원은 항원-특이적 T 세포 및/또는 고역가 항체 반응을 유도함으로써, 항원을 발현시키는 암 또는 종양과 관련되거나 또는 이에 대해 반응성인 면역 반응을 유도하거나 또는 유발할 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 유발된 면역 반응은 세포성 반응, 체액성 또는 세포성 반응과 체액성 면역 반응 둘 다일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 유발된 세포 면역 반응은 인터페론-감마(IFN-γ) 및/또는 종양 피사 인자 알파(TNF-α)의 유도 또는 분비를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 백신은 백신을 받지 않은 비처리 포유류에 비해 증가된 수준의 종양 피사 인자-α(TNF-α) 및 인터페론-γ(IFN-γ)를 포함하는 포유류에서 염증 반응을 유도할 수 있다. 다른 실시형태에서, 유도 또는 유발된 면역 반응은 항원을 발현시키는 종양 또는 암을 촉진시키는 하나 이상의 면역 억제 인자, 예를 들어, 이하로 제한되는 것은 아니지만, MHC 제시를 하향 조절하는 인자, 항원-특이적 조절 T 세포(Treg), PD-L1, FasL, 사이토카인을 상향 조절하는 인자 예컨대 IL-10 및 TFG-β, 종양 관련 대식세포, 종양 관련 섬유아세포, 면역 억제 세포에 의해 생성되는 가용성 인자, CTLA-4, PD-1, MDSC, MCP-1 및 면역관문 분자를 감소시키거나 또는 저해할 수 있다.

[0064] dTERT 항원은 그들을 항-dTERT 면역 반응이 유도될 수 있는 면역원으로서 특히 유효하게 만드는 에피토프를 포함할 수 있다. 예를 들어, 에피토프는 아미노산 서열 FNSVHLRELSEAEVR(서열번호 6)을 포함할 수 있다. 에피토프는 서열번호 6일 수 있다. dTERT 항원은 전장 dTERT 번역 산물, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, dTERT 항원은 공통 아미노산 서열을 포함한다.

[0065] dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산 서열은 코돈 사용빈도 및 대응하는 RNA 전사체에 대해 최적화될 수 있다. dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 숙주, 바람직하게는 포유류, 세포에서 발현을 위해 코돈- 및/또는 RNA-최적화될 수 있다. 일부 실시형태에서, dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산 서열은 번역 효율을 증가시키기 위해 코작(Kozak) 서열(예를 들어, GCC ACC)을 포함할 수 있다. dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 번역 종결의 효율을 증가시키기 위해 다중 중단 코돈(예를 들어, TGA TGA)을 포함할 수 있다.

[0066] dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 또한 면역글로불린 E(IgE) 리더 서열을 암호화할 수 있다. IgE 리더 서열의 아미노산 서열이 펩타이드 결합에 의해 dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원의 아미노산 서열에 연결되도록 dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 IgE 리더 서열을 추가로 암호화할 수 있다. 일부 실시형태에서, dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 IgE 리더 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 없거나 또는 뉴클레오타이드 서열을 함유하지 않는다.

[0067] 일부 실시형태에서, dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 이종성 핵산 서열일 수 있고/있거나 하나 이상의 이종성 핵산 서열을 함유할 수 있다. dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 또는 잔기가 각각 다른 아미노산 또는 잔기로 대체되거나 또는 치환되도록 dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 야생형 dTERT 항원에 대해 돌연변이될 수 있다. dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원의 아미노산 서열 내 하나 이상의 잔기가 각각 다른 잔기로 대체되거나 또는 치환됨으로써, 면역체가 더 이상 dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원, dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원, 또는 이들의 조합물을 암호화하는 핵산이 투여된 포유류에서 dTERT의 관용을 야기하지 않도록, dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 야생형 dTERT 항원에 대해 돌연변이될 수 있다. 일 실시형태에서, 예를 들어, dTERT 아미노산 서열은 다음의 아미노산 치환 중 하나 이상을 포함하도록 dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 야생형

dTERT 항원에 대해 돌연변이될 수 있다: R579Y, D996Y, K633A, R638A, D719A, Y724A 및/또는 D876A. 바람직하게는, dTERT 아미노산 서열이 다음의 아미노산 치환을 모두 포함하도록 dTERT 항원 또는 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산은 야생형 dTERT 항원에 대해 돌연변이된다: R579Y, D996Y, K633A, R638A, D719A, Y724A 및 D876A. 임의의 특정 이론에 의해 구속되지 않고, 치환 R579Y 및 D996Y는 관용을 파괴하는 데 연루되며(예를 들어, 문헌[Gross et al., *J. Clin. Invest.*, 113: 425-433(2004)] 참조), 그리고 치환 K633A, R638A, D719A, Y724A 및 D876A는 텔로머라제 활성을 없애는 데 연루되는 것으로 여겨진다(예를 들어, 문헌[Weinrich et al., *Nature Genetics*, 17: 498-502 (1997)] 참조).

[0068] 공통 dTERT 항원을 암호화하는 핵산 서열은, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1을 포함할 수 있다. 서열번호 1은 IgE 리더 서열에 연결된 dTERT 단백질을 암호화한다. 다른 실시형태에서, dTERT 단백질은 IgE 리더 서열이 없거나 또는 이에 연결될 수 있다. 서열번호 1은 도 1에 제시되며, 서열번호 2는 도 2에 제시된다.

[0069] 일부 실시형태에서, dTERT 항원을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 1에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, dTERT 항원을 암호화하는 핵산 서열은 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열일 수 있다. dTERT 항원의 아미노산 서열은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열의 전장 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열일 수 있다.

[0070] 일부 실시형태는 dTERT 단백질, dTERT 단백질의 면역원성 단편, 및 상동성 단백질의 면역원성 단편에 대해 상동성인 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 서열에 대해 95%까지의 상동성, 서열에 대해 96%까지의 상동성, 서열에 대해 97%까지의 상동성, 서열에 대해 98%까지의 상동성, 서열에 대해 99%까지의 상동성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 마찬가지로, 본 명세서에 제시된 면역원성 단편 및 본 명세서에 제시된 단백질에 대해 상동성인 단백질의 면역원성 단편을 암호화하는 핵산 서열이 또한 제공된다.

[0071] 일부 실시형태는 본 명세서의 핵산 암호 서열에 대해 95% 상동성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 핵산 암호 서열에 대해 96% 상동성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 핵산 암호 서열에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 핵산 암호 서열에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 핵산 암호 서열에 대해 99% 상동성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 공통 단백질의 암호 서열에 대해 상동성인 본 명세서에 개시된 암호 서열을 갖는 핵산 분자는 본 명세서에 개시된 상동성 단백질 서열을 암호화하는 암호 서열의 5' 말단에 연결된 IgE 리더 서열을 암호화하는 서열을 포함한다.

[0072] 일부 실시형태는 전장 dTERT 단백질, dTERT 단백질의 면역원성 단편, 및 dTERT 단백질에 대해 동일성을 갖는 단백질의 면역원성 단편에 대해 특정 동일성 백분율을 갖는 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 전장 dTERT 서열에 대해 80%까지의 동일성, 전장 서열에 대해 85%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 90%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 91%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 92%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 93%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 94%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 95%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 96%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 97%까지의 동일성, 전장 dTERT 서열에 대해 98%까지의 동일성 및 전장 dTERT 서열에 대해 99%까지의 동일성을 갖는 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 마찬가지로, 본 명세서에 제시된 면역원성 단편 및 본 명세서에 제시된 dTERT 단백질에 대해 상기 나타낸 것과 유사한 동일성 백분율을 갖는 단백질의 면역원성 단편을 암호화하는 핵산 서열이 또한 제공된다.

[0073] 일부 실시형태는 서열번호 1의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 1의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55% 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다. 단편은 서열번호 1에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도

98% 또는 적어도 99% 상동성일 수 있다. 단편은 서열번호 1의 단편에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예컨대, 면역글로불린 리더, 예컨대 IgE 리더를 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열을 암호화하는 암호 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, IgE 리더를 암호화하는 암호 서열이 없다.

[0074] 다른 실시형태에서, dTERT 항원의 아미노산 서열은 IgE 리더에 연결된 dTERT 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 서열번호 2를 포함한다. IgE 리더에 연결된 dTERT 단백질의 아미노산 서열은 또한 인간 인플루엔자 혈구응집소(HA) 태그에 연결될 수 있다.

[0075] 본 발명의 일부 실시형태는 서열번호 2에 대해 상동성인 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 95% 상동성을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 96% 상동성을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 99% 상동성을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다.

[0076] 일부 실시형태는 서열번호 2에 대해 동일한 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 91% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 93% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 94% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 96% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태는 서열번호 2에 제시된 바와 같은 전장 아미노산 서열에 대해 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역원성 단백질에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 단백질은 리더 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 단백질은 IgE 리더 서열이 없다.

[0077] 단백질의 단편은 단백질의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55% 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 서열번호 2의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 면역원성 단편은 서열번호 2의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55% 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예컨대, 면역글로불린 리더, 예컨대 IgE 리더를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, IgE 리더 서열이 없다.

[0078] 서열번호 2의 면역원성 단편에 대해 상동성인 아미노산 서열을 갖는 단백질의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 이러한 면역원성 단편은 서열번호 2에 대해 95% 이상의 상동성인 단백질의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태는 본 명세서의 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 96% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 단백질 서열

의 면역원성 단편에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 99% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예컨대, 면역글로불린 리더, 예컨대 IgE 리더를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, IgE 리더가 없다.

서열번호 2의 면역원성 단편에 대해 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 이러한 면역원성 단편은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55% 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예컨대, 면역글로불린 리더, 예컨대 IgE 리더를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, IgE 리더가 없다.

단백질의 N 말단에 대해 신호 펩타이드 또는 리더 서열을 연결하는 것에 관해 본 명세서에 언급된 바와 같이, 신호 펩타이드/리더 서열은 신호 펩타이드 암호 서열이 없는 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 시작 코돈에 의해 암호화된 단백질의 N 말단 메티온인을 대체한다.

우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 3240개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 1의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 3300개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 1의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 3360개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 1의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 3420개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 1의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 3480개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 1의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 1의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호 서열을 포함하지 않는다.

서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 10개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 15개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2 또는 서열 5의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 20개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 25개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 35개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 40개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 바람직하게는 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 포함하는 45개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 2의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호 서열을 포함하지 않는다.

[0084] 단편은 15개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 20개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 24개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 30개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 36개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 42개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 48개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 54개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 60개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 72개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 90개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 120개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 150개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 180개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 210개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 240개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 260개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 290개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 320개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 350개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 380개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 410개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 440개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 470개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 500개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 530개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 560개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 590개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 620개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 650개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 680개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 710개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 740개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 770개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 800개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 830개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 860개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 890개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 920개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 950개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 980개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1010개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1040개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1070개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1200개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1230개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1260개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1290개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1320개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1350개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1380개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1410개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1440개 미만의 아미노산, 일부 실시형태에서 1470개 미만의 아미노산 및 일부 실시형태에서 1500개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

b. 추가적인 암 항원

[0085] [0086] 본 발명의 백신은 상기 기재한 dTERT 항원에 추가로 1종 이상의 암 항원을 포함하거나 또는 암호화할 수 있다. 이와 관련하여, 1종 이상의 추가적인 암 항원은 핵산 서열, 아미노산 서열, 또는 이들의 조합일 수 있다. 핵산 서열은 DNA, RNA, cDNA, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산 서열은 또한 웨타이드 결합에 의해 암 항원에 연결된 링커 또는 태그 서열을 암호화하는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 아미노산 서열은 단백질, 웨타이드, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이의 조합일 수 있다. 1종 이상의 추가적인 암 항원은 재조합 암 항원일 수 있다.

3. 면역관문 저해제와 조합한 백신

[0087] [0088] 면역관문 분자의 저해제는 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 웨타이드 결합에 의해 면역관문 저해제에 연결된 링커 또는 태그 서열을 암호화하는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 소분자는 단백질 또는 핵산, 또는 생물학적 과정의 조절자에 의해 결합되는 효소 기질, 리간드(또는 이의 유사체)로서 작용할 수 있는 저분자량, 예를 들어, 800 달톤 미만의 유기 또는 무기 화합물일 수 있다. 아미노산 서열은 단백질, 웨타이드, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이의 조합일 수 있다.

[0089] 일부 실시형태에서, 면역관문 저해제는 항체, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이의 조합을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열일 수 있다. 다른 실시형태에서, 면역관문 저해제는 항체, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이의 조합일 수 있다.

4. 백신 작제물 및 플라스미드

[0090] [0091] 본 백신은 상기 기재된 항원 및/또는 항체를 암호화하는 핵산 작제물 또는 플라스미드를 포함할 수 있다. 핵산 작제물 또는 플라스미드는 하나 이상의 이종성 핵산 서열을 포함하거나 또는 함유할 수 있다. 본 명세서에서 상기 기재한 항원 및/또는 항체를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있는 유전자 작제물이 제공된다. 유전자 작제물은 염색체외 분자를 기능화하는 것으로서 세포에 제공될 수 있다. 유전자 작제물은 동원체, 텔로미라제 또

는 플라스미드 또는 코스미드를 포함하는 선형 꼬마염색체일 수 있다. 유전자 작제물은 하나 이상의 이종성 핵산 서열을 포함하거나 또는 함유할 수 있다.

[0092] 유전자 작제물은 임의의 순서로 상기 기재한 항원 및/또는 항체를 발현시키는 플라스미드의 형태일 수 있다.

[0093] 유전자 작제물은 또한 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스-연관 바이러스(AAV) 및 재조합 백시니아 바이러스를 포함하는 재조합 바이러스 벡터의 계놈의 일부일 수 있다. 유전자 작제물은 세포 내에 살아있는 약독된 생 미생물 또는 재조합 미생물 벡터 내 유전자 물질의 일부일 수 있다.

[0094] 유전자 작제물은 핵산의 암호 서열의 유전자 발현을 위한 조절 요소를 포함할 수 있다. 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 개시 코돈, 중단 코돈 또는 폴리아데닐화 신호일 수 있다.

[0095] 핵산 서열은 벡터일 수 있는 유전자 작제물을 구성할 수 있다. 벡터는 포유류에서 면역 반응을 유발하는 데 효과적인 양으로 포유류의 세포에서 상기 기재한 항원 및/또는 항체를 발현시킬 수 있다. 벡터는 재조합체일 수 있다. 벡터는 상기 기재된 항원 및/또는 항체를 암호화하는 하나 이상의 이종성 핵산 분자를 포함할 수 있다. 벡터는 플라스미드일 수 있다. 벡터는 상기 기재한 항원 및/또는 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 이용하여 숙주 세포를 형질감염시키는 데 유용할 수 있되, 형질감염된 숙주 세포는 상기 기재한 항원 및/또는 항체가 발현되는 조건 하에 배양되고 유지된다.

[0096] 암호 서열은 안정성 및 고수준의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 일부 예에서, 코돈은 RNA 내 2차 구조 형성, 예컨대 분자내 결합에 기인하여 형성된 것을 감소시키도록 선택된다.

[0097] 벡터는 상기 기재한 항원 및/또는 항체를 암호화하는 하나 이상의 이종성 핵산 분자를 포함할 수 있고 1종 이상의 암 항원 암호 서열(들)의 상류일 수 있는 개시 코돈, 및 상기 기재한 항원 및/또는 항체의 암호 서열(들)의 하류일 수 있는 정지 코돈을 추가로 포함할 수 있다. 개시 및 종결 코돈은 상기 기재한 항원 및/또는 항체의 암호 서열(들)을 갖는 프레임 내에 있을 수 있다. 벡터는 또한 상기 기재한 항원 및/또는 항체의 암호 서열(들)에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 기재한 항원 및/또는 항체의 암호 서열(들)에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 시미안 바이러스 40(SV40)으로부터의 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 프로모터, 예컨대 소 면역결핍 바이러스(BIV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스(Moloney virus) 프로모터, 조류 백혈병 바이러스(ALV) 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, 예컨대 CMV 급초기 프로모터, 엡스타인 바르 바이러스(EBV) 프로모터, 또는 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 적합한 단백질일 수 있다. 프로모터는 또한 포유류 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 혼모글로빈 프로모터, 근육 크레아틴 프로모터, 또는 메탈로티오네인 프로모터로부터의 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 천연 또는 합성인 조직-특이적 프로모터, 예컨대 근육- 또는 피부-특이적 프로모터일 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0175727호 참조).

[0098] 벡터는 또한 상기 기재한 항원 및/또는 항체의 암호 서열(들)의 하류일 수 있는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 폴리아데닐화 신호는, 예를 들어, SV40 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호 또는 인간 β -글로빈 폴리아데닐화 신호를 포함하는 임의의 적합한 폴리아데닐화 신호일 수 있다. SV40 폴리아데닐화 신호는 pCEP4 벡터(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 인비트로젠(Invitrogen))로부터의 폴리아데닐화 신호일 수 있다.

[0099] 벡터는 또한 상기 기재한 항원 및/또는 항체 상류에서 인핸서를 포함할 수 있다. 인핸서는 DNA 발현에 필수적일 수 있다. 인핸서는 임의의 적합한 포유류 유전자, 예를 들어 액틴, 마이오신, 혼모글로빈, 근육 크레아틴 또는 바이러스, 예를 들어, CMV, HA, RSV 또는 EBV로부터 단리되거나 또는 유래될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 기능 인핸서는, 예를 들어, 미국 특허 제5,593,972호 및 제5,962,428호, 및 국제 특허 출원 WO 94/016737에 기재되어 있다.

[0100] 벡터는 또한 염색체외로 벡터를 유지하기 위해 그리고 세포 내 벡터의 다중 복제물을 생성하기 위해 포유류 복제 기점을 포함할 수 있다. 벡터는 엡스타인 바르 바이러스 복제 기점 및 통합이 없이 고복제물 에피솜 복제를 생성할 수 있는 핵 항원 EBNA-1 암호 영역을 포함할 수 있는 인비트로젠(캘리포니아주 샌디에이고에 소재)으로부터의 pVAX1, pCEP4 또는 pREP4일 수 있다. 벡터는 pVAX1 또는 이의 변이체일 수 있다. 예를 들어, pVAX1 변이체 플라스미드 pGX0001은 백본 벡터 플라스미드 pVAX1(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 인비트로젠)의 2998개 염기쌍 변이체이다. pGX0001 플라스미드는 다음의 요소를 포함한다: (a) 염기 137 내지 724에 위치된 CMV 프로모터, (b) 염기 664 내지 683에 위치된 T7 프로모터/프라이밍 부위, (c) 염기 696 내지 811에 위치된 다중 클로

닝 부위, (d) 염기 829 내지 1053에 위치된 소 GH 폴리아데닐화 신호, (e) 염기 1226 내지 2020에 위치된 카나 마이신 내성(Kan^R) 유전자, 및 (f) 염기 2320 내지 2993에 위치된 pUC 기점.

[0101] 인비트로젠으로부터 입수 가능한 pVAX1의 서열에 기반하여, 추가적인 돌연변이는 본 발명의 백신을 생산하기 위해 pVAX1로 이루어질 수 있다. 일 실시형태에서, 다음의 돌연변이는 pVAX1의 핵산 서열에서 이루어질 수 있다:

[0102] CMV 프로모터 내 C>G241

[0103] 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGH 폴리A) 하류의 C>T 1158 골격

[0104] 카나마이신 내성 유전자(Kan^R) 하류의 A> - 2092 골격

[0105] pUC 복제기점(pUC or i)에서 C>T 2493

[0106] RNaseH 부위 상류의 pUC Ori의 가장 말단에서 G>C 2969, 및

[0107] 염기쌍 2, 3 및 4는 CMV 프로모터 상류의 골격에서 ACT로부터 CTG까지 변할 수 있다.

[0108] 벡터는 또한 조절 서열을 포함할 수 있으며, 이는 벡터가 투여되는 포유류(예를 들어, 개) 세포 내 유전자 발현에 상당히 적합할 수 있다. 본 명세서에 개시된 1종 이상의 암 항원 서열은 특정 숙주 세포 내 암호 서열의 더 효율적인 전사를 허용하는 하나 이상의 코돈을 포함할 수 있다.

[0109] 벡터는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)(이콜라이)에서 단백질 생성을 위해 사용될 수 있는 pSE420(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 인비트로젠)일 수 있다. 벡터는 또한 효모의 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주에서 단백질 생성을 위해 사용될 수 있는 pYES2(캘리포니아주 샌디에이고 인비트로젠)일 수 있다. 벡터는 또한 곤충 세포에서 단백질 생성을 위해 사용될 수 있는 MAXBAC(상표명) 완전한 바클로바이러스 발현 시스템(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 인비트로젠)을 가질 수 있다. 벡터는 또한 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 단백질 생성을 위해 사용될 수 있는 pcDNA I 또는 pcDNA3(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 인비트로젠)일 수 있다. 벡터는 일상적인 기법 및 용이하게 입수 가능한 출발물질, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989)]에 기재된 것을 이용하여 생성될 수 있다.

[0110] 일 실시형태에서, 본 발명의 백신은 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드 벡터이다.

[0111] **5. 백신의 약제학적 조성물**

[0112] 백신은 약제학적 조성물, 즉, 백신 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물의 형태일 수 있다. 약제학적 조성물은 백신을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 약 5 나노그램 내지 약 10mg DNA의 백신을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약 25 나노그램 내지 약 5mg DNA의 백신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 50 나노그램 내지 약 1mg DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 1,500 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 800 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 5 내지 약 500 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 10 내지 약 250 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 15 내지 약 150 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 20 내지 약 100 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 75 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 30 내지 약 50 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 35 내지 약 40 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 100 내지 약 200 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 10 내지 약 100 마이크로그램 DNA의 백신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 20 내지 약 80 마이크로그램 DNA의 백신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 60 마이크로그램 DNA의 백신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 30 내지 약 50 마이크로그램 DNA의 백신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 35 내지 약 45 마이크로그램 DNA의 백신을 포함한다. 일부 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 내지 약 800 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 500 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 25 내지 약 300 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다. 일부 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 100 내지 약 200 마이크로그램 DNA의 백신을 함유한다.

[0113]

일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 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, 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, 1000, 1005, 1010, 1015, 1020, 1025, 1030, 1035, 1040, 1045, 1050, 1055, 1060, 1065, 1070, 1075, 1080, 1085, 1090, 1095, 1100, 1105, 1110, 1115, 1120, 1125, 1130, 1135, 1140, 1145, 1150, 1155, 1160, 1165, 1170, 1175, 1180, 1185, 1190, 1195, 1200, 1205, 1210, 1215, 1220, 1225, 1230, 1235, 1240, 1245, 1250, 1255, 1260, 1265, 1270, 1275, 1280, 1285, 1290, 1295, 1300, 1305, 1310, 1315, 1320, 1325, 1330, 1335, 1340, 1345, 1350, 1355, 1360, 1365, 1370, 1375, 1380, 1385, 1390, 1395, 1400, 1405, 1410, 1415, 1420, 1425, 1430, 1435, 1440, 1445, 1450, 1455, 1460, 1465, 1470, 1475, 1480, 1485, 1490, 1495, 1500, 1505, 1510, 1515, 1520, 1525, 1530, 1535, 1540, 1545, 1550, 1555, 1560, 1565, 1570, 1575, 1580, 1585, 1590, 1595, 1600, 1605, 1610, 1615, 1620, 1625, 1630, 1635, 1640, 1645, 1650, 1655, 1660, 1665, 1670, 1675, 1680, 1685, 1690, 1695, 1700, 1705, 1710, 1715, 1720, 1725, 1730, 1735, 1740, 1745, 1750, 1755, 1760, 1765, 1770, 1775, 1780, 1785, 1790, 1795 또는 1800 마이크로그램 DNA의 백신을 포함한다.

[0114]

다른 실시형태에서, 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, 1000, 1005, 1010, 1015, 1020, 1025, 1030, 1035, 1040, 1045, 1050, 1055, 1060, 1065, 1070, 1075, 1080, 1085, 1090, 1095, 1100, 1105, 1110, 1115, 1120, 1125, 1130, 1135, 1140, 1145, 1150, 1155, 1160, 1165, 1170, 1175, 1180, 1185, 1190, 1195, 1200, 1205, 1210, 1215, 1220, 1225, 1230, 1235, 1240, 1245, 1250, 1255, 1260, 1265, 1270, 1275, 1280, 1285, 1290, 1295, 1300, 1305, 1310, 1315, 1320, 1325, 1330, 1335, 1340, 1345, 1350, 1355, 1360, 1365, 1370, 1375, 1380, 1385, 1390, 1395, 1400, 1405, 1410, 1415, 1420, 1425, 1430, 1435, 1440, 1445, 1450, 1455, 1460, 1465, 1470, 1475, 1480, 1485, 1490, 1495, 1500, 1505, 1510, 1515, 1520, 1525, 1530, 1535, 1540, 1545, 1550, 1555, 1560, 1565, 1570, 1575, 1580, 1585, 1590, 1595, 1600, 1605, 1610, 1615, 1620, 1625, 1630, 1635, 1640, 1645, 1650, 1655, 1660, 1665, 1670, 1675, 1680, 1685, 1690, 1695, 1700, 1705, 1710, 1715, 1720, 1725, 1730, 1735, 1740, 1745, 1750, 1755, 1760, 1765, 1770, 1775, 1780, 1785, 1790, 1795 또는 1800 마이크로그램까지의 그리고 이들을 포함하는 DNA의 백신을 포함할 수 있다.

[0115]

약제학적 조성물은 사용될 투여 방식에 따른 제형화 목적을 위해 다른 제제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적 조성물이 주사 가능한 약제학적 조성물인 경우에, 그들은 멸균, 무발열원 및 무 미립자이다. 바람직하게는 등장성 제형이 사용된다. 일반적으로, 등장성을 위한 첨가제는 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 솔비톨 및 락토스를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 등장성 용액, 예컨대 인산염 완충 식염수가 바람직하다. 안정제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제형화를 위해 혈관수축제가 첨가된다.

[0116]

백신 또는 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 비히클, 애주번트, 담체 또는 화석제로서 기능성 분자일 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 표면 활성제, 예컨대 면역 자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 애주번트, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 무라밀 펩타이드, 퀴논 유사체, 소수포, 예컨대 스쿠알렌

및 스쿠알렌, 하이알루론산, 지질, 리포좀, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다음이온, 다양이온 또는 나노입자를 포함할 수 있는 형질감염 촉진제 또는 다른 공지된 형질감염 촉진제일 수 있다.

[0117] 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트(LGS) 또는 지질을 포함하는 다음이온, 다양이온일 수 있다. 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트일 수 있으며, 더 바람직하게는, 폴리-L-글루타메이트는 6mg/ml 미만의 농도로 백신 중에 존재할 수 있다. 형질감염 촉진제는 또한 표면 활성제, 예컨대 면역 자극 복합체(ISCMS), 프로인트 불완전 애주번트, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 무라밀 펩타이드, 퀴논 유사체, 소수포, 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 및 하이알루론산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 백신 조성물은 또한 1종 이상의 형질감염 촉진제, 예를 들어, DNA-리포좀 혼합물로서 지질, 리포좀(예를 들어, 레시틴 리포좀 또는 당업계에 공지된 다른 리포좀)(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 93/24640 참조), 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다음이온, 다양이온 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트(LGS) 또는 지질을 포함하는 다음이온, 다양이온일 수 있다. 백신 중의 형질감염제의 농도는 4mg/ml 미만, 2mg/ml 미만, 1mg/ml 미만, 0.750mg/ml 미만, 0.500mg/ml 미만, 0.250mg/ml 미만, 0.100mg/ml 미만, 0.050mg/ml 미만 또는 0.010mg/ml 미만이다.

[0118] 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 애주번트일 수 있다. 애주번트는 대안의 플라스미드에서 발현되는 다른 유전자일 수 있거나 또는 백신 중에서 상기 플라스미드와의 조합물로 단백질로서 전달된다. 애주번트는 α -인터페론(IFN- α), β -인터페론(IFN- β), γ -인터페론, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNF α , TNF β GM-CSF, 상피 성장 인자(EGF), 경피 T 세포-유인 케모카인(CTACK), 상피 흉선-발현 케모카인(TECK), 점막-연관 상피 케모카인(MEC), 결실된 신호 서열을 갖는 IL-15를 포함하고 선택적으로 IgE로부터의 신호 펩타이드를 포함하는 IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, 상피 성장 인자(EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 또는 이들의 조합일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 애주번트는 IL-12이다.

[0119] 유용한 애주번트일 수 있는 다른 유전자는 하기를 암호화하는 것이다: 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, F1t, 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, p65Re1, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, 비활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFKB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, OX40, OX40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이들의 기능성 단편.

6. 특정 암을 치료하기 위한 백신

[0120] 본 발명의 백신은 포유류에서 특정 암 또는 종양을 치료하기 위한 암 항원으로서만 dTERT 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 백신은 포유류(예를 들어, 개)에서 특정 암 또는 종양을 치료하기 위해 1종 이상의 암 항원을 암호화하는 하나 이상의 추가적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, dTERT 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명의 백신은 1종 이상의 별개의 백신과 조합하여 포유류에게 투여될 수 있으며, 이를 각각은 포유류에서 특정 암 또는 종양을 치료하기 위해 하나 이상의 추가적인 암 항원, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 암호화하거나 또는 포함한다.

[0121] 암 또는 종양을 치료하는 본 발명의 방법이 TERT 항원 단독, 또는 하나 이상의 추가적인 암 항원과 조합된 TERT 항원을 표적화하는지의 여부에 따라서, 다양한 암 또는 다른 종양 유형은 백신에 의해 표적화될 수 있다. 이러한 암은, 예를 들어, 흑색종, 전립선암, 간암, 자궁경부암, 재발성 호흡기 유두종증(RRP), 항문암, 두경부암, 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 골수종), 폐 암종(예를 들어, 비소세포 폐 암종), 식도 편평 세포 암종, 방광암, 결장직장암, 위암, 간암종, 뇌암(예를 들어, 교모세포종), 췌장암, 활액 암종, 고환암 및 위암을 포함할 수 있다.

7. 백신접종 방법

[0122] 본 명세서에서 본 발명의 백신, 바람직하게는 치료 또는 예방이 필요한 포유류에서 약제학적으로 허용 가능한 조성물의 일부로서 본 발명의 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하거나 또는 예방하는 방법이 제공된

다. 백신 또는 백신접종을 투여하는 방법은 치료적 및/또는 예방적 면역 반응을 유도하도록 제공될 수 있다. 백신접종 과정은 본 명세서에 개시된 바와 같은 암 항원 중 하나 이상에 대해 포유류에서 면역 반응을 생성할 수 있다. 백신은 포유류의 면역계의 활성을 조절하고 면역 반응을 향상시키기 위해 개체에게 투여될 수 있다. 백신 투여는 세포에서 발현되고, 따라서 면역계가 세포성, 체액성 또는 세포성과 체액성 반응을 인식하고 유도할 때 세포 표면에 전달되는 핵산 분자로서 본 명세서에 개시된 바와 같은 1종 이상의 암 항원의 형질감염일 수 있다. 백신의 투여는 포유류에게 본 명세서에 논의하는 바와 같은 백신을 투여함으로써 1종 이상의 암 항원에 대해 포유류에서 면역 반응을 유도하거나 또는 유발하기 위해 사용될 수 있다.

[0125] 포유류에 대한 백신의 투여 시, 그리고 포유류 세포 내로 백터의 투여 시, 형질감염 세포는 본 명세서에 개시된 1종 이상의 암 항원을 발현시키고 분비할 것이다. 이들 분비된 단백질, 또는 합성 항원은 면역계에 의해 외래로서 인식되는데, 이는 1종 이상의 암 항원에 대해 만들어진 항체, 및/또는 1종 이상의 암 항원에 대해 특이적으로 T-세포 반응을 포함할 수 있는 면역 반응을 시작할 것이다. 일부 예에서, 본 명세서에서 논의된 백신에 의해 백신접종된 포유류는 프라이밍된 면역계를 가질 것이고, 본 명세서에 개시된 바와 같은 1종 이상의 암 항원에 의해 시험감염될 때, 프라이밍된 면역계는 체액성이든, 세포성이든 또는 세포성과 체액성 면역 반응 둘 다를 통하여 본 명세서에 개시된 바와 같은 후속적 암 항원의 빠른 클리어런스를 허용할 것이다. 백신은 개체의 면역계의 활성을 조절함으로써 면역 반응을 향상시키기 위해 개체에게 투여될 수 있다.

[0126] DNA 백신을 투여하는 방법을 투여하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제4,945,050호 및 제5,036,006호에 기재되어 있다.

[0127] 백신은 포유류에서 면역 반응을 유발하기 위해 포유류에게 투여될 수 있다. 포유류는 개과(개), 인간, 비-인간 영장류, 소, 돼지, 양, 염소, 영양, 들소, 물소, 솟과, 사슴, 고슴도치, 코끼리, 라마, 알파카, 마우스, 래트 또는 닭일 수 있다. 바람직하게는, 포유류는 개, 인간, 소, 돼지 또는 닭이다.

[0128] 백신 용량은 $1\mu\text{g}$ 내지 10mg 활성 성분/kg 체중/시간일 수 있고, $20\mu\text{g}$ 내지 10mg 성분/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 용량의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 이상의 용량일 수 있다.

a. 백신에 의해 면역 반응을 생성하는 방법

[0130] 치료적 또는 예방적 면역 반응을 포함하는, 포유류에서 면역 반응을 생성하기 위해 백신이 사용될 수 있다. 면역 반응은 본 명세서에 개시된 1종 이상의 암 항원과 관련된 항체 및/또는 살해 T 세포를 생성할 수 있다. 이러한 항체 및 T 세포는 단리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 포유류에서 텔로머라제 역전사효소(TERT)(예를 들어, hTERT 또는 dTERT)에 대해 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하되, 이 방법은 면역 반응의 유도가 필요한 포유류에서 본 명세서에 기재된 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 핵산 분자는 포유류에서 발현되며, 다음의 면역 반응 중 하나 이상이 유도된다: (a) TERT에 특이적인 체액성 면역 반응, (b) 백신이 투여되지 않은 포유류에 비해 증가된 수준의 종양 피사 인자- α (TNF- α) 및 인터페론- γ (IFN- γ)를 포함하는 염증 반응, 및 (c) TERT에 특이적인 세포의 면역 반응.

[0131] 일부 실시형태는 면역 반응의 생성이 필요한 포유류에게 백신을 투여하는 단계를 포함하는 본 명세서에 개시된 1종 이상의 암 항원에 대해 면역 반응을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태는 암 또는 종양의 예방적 백신접종이 필요한 포유류에 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 기재한 바와 같은 1종 이상의 암 항원을 발현시키는 암 또는 종양에 대해 포유류를 예방적으로 백신접종하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태는 암 또는 종양의 치료적 백신접종이 필요한 포유류에게 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 1종 이상의 암 항원을 발현시키는 암 또는 종양으로 고통 받는 포유류를 치료적으로 백신접종하는 방법을 제공한다. 백신의 투여 전에 본 명세서에 개시된 1종 이상의 암 항원을 발현시키는 암 또는 종양의 진단은 일상적인 진단 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

b. 백신을 이용하는 암 치료 방법

[0133] 면역 반응 유발이 필요한 포유류 또는 대상체에서 암 또는 종양(예를 들어, 흑색종, 두경부, 자궁경부, 간, 전립선, 혈액암, 식도 편평, 위 등)에 대해 반응성이거나 또는 관련된 포유류에서의 면역 반응을 생성하거나 또는 유발하기 위해 백신이 사용될 수 있다. 유발된 면역 반응은 암 또는 종양 성장을 방지할 수 있다.

[0134] 유발된 면역 반응은 암성 또는 종양 세포의 전이를 방지하고/하거나 감소시킬 수 있다. 따라서, 백신은 백신이 투여된 포유류 또는 대상체에서 암 또는 종양을 치료하고/하거나 방지하는 방법에서 사용될 수 있다. 백신에서

사용되는 항원에 따라서, 치료된 암 또는 종양은, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 흑색종, 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 골수종), 폐 암종(예를 들어, 비소 세포 폐 암종), 식도 편평 세포 암종, 방광암, 결장직장암, 식도, 위암, 간암종, 두경부암, 뇌암(예를 들어, 교모세포종), 항문암, 췌장암, 윤활액 암종, 전립선암, 고환암, 간암, 자궁경부암, 재발성 호흡기 유두종증(RRP), 피부암 및 위암과 같은 당업계에 공지되어 있거나 본 명세서에 기재된 임의의 유형의 암일 수 있다.

[0135] 일부 실시형태에서, 투여되는 백신은 (1) 단핵구 화학주성 단백질-1(MCP-1) 생성을 차단하는 항체를 생성하기 위해 B 세포 반응을 통해 체액성 면역을 유도함으로써, 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 저연시키고 종양 성장을 억제하며; (2) 종양 세포를 공격하고 사멸시키기 위해 세포독성 T 림프구, 예컨대 CD8⁺(CTL)을 증가시키고; (3) T 헬퍼 세포 반응을 증가시키며; (4) 비처리 포유류에 비해 IFN-γ 및 TNF-α를 통해 염증 반응, 또는 바람직하게는 모든 앞서 언급한 반응을 증가시킴으로써 종양 세포의 클리어런스를 매개하거나 또는 종양 세포의 성장을 방지할 수 있다.

[0136] 일부 실시형태에서, 면역 반응은 백신을 투여한 대상체에서 다양한 조직 또는 시스템(예를 들어, 뇌 또는 신경계)에 대한 손상 또는 이의 염증을 야기하지 않는 체액성 면역 반응 및/또는 항원-특이적 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 생성할 수 있다.

[0137] 일부 실시형태에서, 투여되는 백신은 대상체에서 무 종양 생존을 증가시키거나, 종양 덩어리를 감소시키거나, 종양 생존을 증가시키거나, 또는 이들의 조합일 수 있다. 투여되는 백신은 대상체에서 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% 및 60%만큼 무 종양 생존을 증가시킬 수 있다. 투여되는 백신은 면역화 후 대상체에서 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% 및 70%만큼 종양 덩어리를 감소시킬 수 있다. 투여되는 백신은 대상체에서 골수 유래 억제 세포에 의해 분비되는 사이토카인인 단핵구 화학주성 단백질 1(MCP-1)의 증가를 방지하고 차단시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여되는 백신은 대상체에서 암성 또는 종양 조직 내에서의 MCP-1의 증가를 방지 및 차단시킴으로써, 대상체에서 암성 또는 종양 조직의 혈관화를 감소시킬 수 있다.

[0138] 투여되는 백신은 대상체에서 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% 및 70%만큼 종양 생존을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 백신은 백신을 투여한 대상체에서 손상시키거나 또는 질환 또는 사망을 야기하는 일 없이 하나 이상의 항원을 발현시키는 암 또는 종양을 클리어런스 또는 제거하기 위해 암성 또는 종양 세포 또는 조직을 표적화하는 항원-특이적 면역 반응을 확립하도록 말초(이하에 더 상세하게 기재하는 바와 같음)에 투여될 수 있다.

[0139] 투여되는 백신은 약 50배 내지 약 6000배, 약 50배 내지 약 5500배, 약 50배 내지 약 5000배, 약 50배 내지 약 4500배, 약 100배 내지 약 6000배, 약 150배 내지 약 6000배, 약 200배 내지 약 6000배, 약 250배 내지 약 6000배, 또는 약 300배 내지 약 6000배만큼 대상체에서 세포 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여되는 백신은 약 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배, 550배, 600배, 650배, 700배, 750배, 800배, 850배, 900배, 950배, 1000배, 1100배, 1200배, 1300배, 1400배, 1500배, 1600배, 1700배, 1800배, 1900배, 2000배, 2100배, 2200배, 2300배, 2400배, 2500배, 2600배, 2700배, 2800배, 2900배, 3000배, 3100배, 3200배, 3300배, 3400배, 3500배, 3600배, 3700배, 3800배, 3900배, 4000배, 4100배, 4200배, 4300배, 4400배, 4500배, 4600배, 4700배, 4800배, 4900배, 5000배, 5100배, 5200배, 5300배, 5400배, 5500배, 5600배, 5700배, 5800배, 5900배 또는 6000배만큼 대상체에서 세포 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

[0140] 투여되는 백신은 본 발명의 백신으로 치료하지 않은 대상체에 비해 약 50배 내지 약 6000배, 약 50배 내지 약 5500배, 약 50배 내지 약 5000배, 약 50배 내지 약 4500배, 약 100배 내지 약 6000배, 약 150배 내지 약 6000배, 약 200배 내지 약 6000배, 약 250배 내지 약 6000배, 또는 약 300배 내지 약 6000배만큼 대상체에서 인터페론 감마(IFN-γ) 수준을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여되는 백신은 본 발명의 백신으로 치료하지 않은 대상체에 비해 약 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배, 550배, 600배, 650배, 700배, 750배, 800배, 850배, 900배, 950배, 1000배, 1100배, 1200배, 1300배, 1400배, 1500배,

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

[0141] 백신 용량은 1 μ g 내지 10mg 활성 성분/kg 체중/시간일 수 있고, 20 μ g 내지 10mg 성분/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 치료에 대한 백신 투약 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다.

8. 투여 경로

[0143] 백신 또는 약제학적 조성물은, 예를 들어, 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입, 구강 투여, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 척추강내, 관절내 또는 이들의 조합을 포함하는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 수의학적 용도를 위해, 조성물은 정상 수의학적 실행에 따라 적합하게 허용 가능한 제형으로서 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 가장 적절한 투약 요법 및 투여 경로를 용이하게 결정할 수 있다. 백신은 전통적인 주사기, 무바늘 주사 장치, "유전자총" 또는 다른 물리적 방법, 예컨대 전기천공법("EP"), "유체 역학 방법" 또는 초음파에 의해 투여될 수 있다.

[0144] 백신은 생체내 전기천공법, 리포좀 매개, 나노입자 촉진, 재조합 백터, 예컨대 재조합 아데노바이러스, 재조합 AAV 및 재조합 백시니아 바이러스에 의한 그리고 이들이 없는 DNA 주사(또한 DNA 백신접종으로서 지칭)를 포함하는 몇몇 잘 공지된 기법에 의해 포유류에게 투여될 수 있다. 백신의 1종 이상의 암 항원은 DNA 주사 및/또는 생체내 전기천공법을 통해 투여될 수 있다.

a. 전기천공법

[0146] 백신 또는 약제학적 조성물은 전기천공법에 의해 투여될 수 있다. 전기천공법을 통한 백신의 투여는 포유류의 목적으로 하는 조직에 세포막내 형태에 대한 가역적 기공을 야기하는 데 효과적인 에너지 펄스를 전달하도록 구성된 전기천공법 장치를 이용하여 수행될 수 있으며, 바람직한 에너지 펄스는 사용자에 의해 사전 설정한 전류 유입과 비슷한 정전류이다. 전기천공법 장치는 전기천공법 부품 및 전극 어셈블리 또는 조작 어셈블리를 포함할 수 있다. 전기천공 부품은 컨트롤러, 전류 파형 생성기, 임피던스 시험기, 파형 로거, 입력 요소, 상태 보고 요소, 통신 포트, 기억 부품, 전원 및 파워 스위치를 포함하는 전기 천공 장치의 다양한 요소 중 하나 이상을 포함하고 혼입할 수 있다. 전기천공법은 플라스미드에 의한 세포의 형질감염을 용이하게 하기 위해 생체내 전기천공법 장치, 예를 들어 CELLECTRA(등록상표) EP 시스템(이노바이오 파마슈티칼스 인코포레이티드(Inovio Pharmaceuticals, Inc.), 펜실베이니아주 폴리머스 미팅) 또는 엘러건(Elgen) 전기천공기(이노바이오 파마슈티칼스 인코포레이티드)를 이용하여 수행될 수 있다.

[0147] 본 발명의 DNA 백신의 투여를 용이하게 할 수 있는 전기천공법 장치 및 전기천공 방법의 예는, 예를 들어, 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 제2005/0052630호에 기재된 것을 포함한다. DNA 백신의 투여를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 다른 전기천공법 장치 및 전기천공 방법은, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2008/0091135호에 기재되어 있는 것을 포함한다.

[0148] 미국 특허 제7,245,963호는 신체 또는 식물 내 선택 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 용이하게 하기 위한 모듈 전극 시스템 및 그들의 용도를 기재한다. 모듈 전극 시스템은 복수의 바늘 전극; 피하주사 바늘; 프로그램 가능한 정전류 펄스로부터 복수의 바늘 전극까지 전도성 연결을 제공하는 전기 커넥터; 및 전원을 포함할 수 있다. 오퍼레이터는 지지체 구조 상에 장착되고 그들을 신체 또는 식물 내 선택 조직 내로 단단히 삽입하는 복수의 바늘 전극을 잡을 수 있다. 이어서, 생체분자는 선택된 조직 내로 피하주사 바늘을 통해 투여된다. 프로그램 가능한 정전류 펄스 컨트롤러는 활성화되고, 정전류 전기 펄스는 복수의 바늘 전극에 적용된다. 적용된 정전류 전기 펄스는 복수의 전극 사이의 세포 내로 생체 분자의 도입을 용이하게 한다.

[0149] 미국 특허 공개 제2005/0052630호는 신체 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 효과적으로 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 전기천공법 장치를 기재한다. 전기천공법 장치는 작동이 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 구체화되는 전기역학 장치("EKD 장치")를 포함한다. EKD 장치는 사용자 제어에 기반한 어레이 내 전극과 펄스 매개변수의 입력 사이의 일련의 프로그램 가능한 정전류 펄스 패턴을 생성하고, 전류 파형 데이터의 저장 및 획득을 허용한다. 전기천공법 장치는 또한 다수의 바늘 전극을 갖는 대체 가능한 전극 디스크, 주사 바늘에 대한 중앙 주사 통로, 및 제거 가능한 가이드 디스크를 포함한다.

[0150] 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 출원 공개 제2005/0052630호에 기재된 전극 어레이 및 방법은 근육과 같은 조직뿐만 아니라 조직 또는 기관 내로 깊은 침투에 적합할 수 있다. 전극 어레이의 구성 때문에, 주사 바늘은 또한 표적 기관 내로 완전하게 삽입되고, 주사는 전극에 의해 사전에 기술된 면적에서의 표적 사안에 대해 수직으로 투여된다. 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 출원 공개 제2005/005263호에 기재된 전극은 바람직하게는 20mm 길이 및 21 게이지이다.

[0151] 추가적으로, 일부 실시형태에서, 전기천공 장치는, 예를 들어, 미국 특허 제5,273,525호; 제6,110,161호; 제6,261,281호; 제6,958,060호; 및 제6,939,862호에 기재된 장치일 수 있다. 더 나아가, 임의의 다양한 장치를 이용하는 DNA의 투여에 관한 미국 특허 제6,697,669호, 및 DNA를 주사하는 방법에 관한 미국 특허 제7,328,064호에 기재되어 있는 방법은 또한 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다.

9. 백신의 제조 방법

[0153] 본 명세서에 논의된 백신을 포함하는 DNA 플라스미드의 제조를 위한 방법이 본 명세서에서 제공된다. 당업계에 공지된 방법을 이용하여 대규모 발현 탱크에서 세포 배양물을 접종하기 위해 포유류 발현 플라스미드 내로 최종 서브클로닝 단계 후에 DNA 플라스미드가 사용될 수 있다.

[0154] 본 발명의 EP 장치와 함께 사용하기 위한 DNA 플라스미드는 공지된 장치 및 기법의 조합을 이용하여 제형화되거나 또는 제조될 수 있지만, 바람직하게는 그들은, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2009/0004716에 기재된 최적화된 플라스미드 제조 기법을 이용하여 제조된다. 일부 실시형태에서, 이들 연구에서 사용되는 DNA 플라스미드는 10mg/ml 이상의 농도에서 제형화될 수 있다. 제조 기법은 또한 미국 특허 출원 공개 제2009/0004716호 및 미국 특허 제7,238,522호에 기재된 것에 추가로 당업자에게 통상적으로 공지된 것인 다양한 장치 및 프로토콜을 포함하거나 또는 혼입한다.

[0155] 본 발명은 다음의 비제한적 실시예에 의해 도시되는 다중 양상을 가진다.

10. 실시예

실시예 1

[0158] 본 실시예는 dTERT 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드 백신을 생산하는 방법을 기재한다.

[0159] pGX1414는 인간 CMV 프로모터(hCMV 프로모터) 및 소 성장 호르몬 폴리-아데닐화 신호(bGH 폴리A)에 작동 가능하게 연결된 합성 공통 개 텔로머라제 역전사효소(SYNCON dTERT)를 암호화하는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 플라스미드이다. 플라스미드 골격은 카나마이신 내성 유전자(Kan^R) 및 플라스미드 복제기점(pUC or i)을 포함한다. pGX1414의 유전자 요소는 표 1에 제시되어 있고, pGX1414의 개략적 다이어그램은 도 1에 도시되어 있다.

표 1

요소	염기쌍
hCMV 프로모터	137-724
SynCon dTERT 암호 서열	742-4164
bGH 폴리A	4215-4439
카나마이신 내성 유전자(Kan ^R)	4612-5406
pUC Or i	5705-6378

[0161] BamHI 및 NotI 부위에서 pGX0001 내로 합성 공통 개 텔로머라제 역전사효소(SYNCON dTERT)를 클로닝함으로써 pGX1414를 생성하였다. 공통 개 TERT 서열을 생성하기 위해, 19개의 TERT 서열을 젠뱅크로부터 수집하고 나서, 클러스탈 W(Clustal W)(DNASTAR)를 이용하는 서열 정렬을 수행한 후에 공통 서열을 얻었다. 큰 다양성(소프트웨어에 의한 '불일치 수준 1 및 2'로서 정의)을 갖는 잔기를 함유하는 위치에서, 아미노산의 선택은 천연 개 TERT에 가중치를 두었다.

[0162] 공통 개 TERT 서열을 생성하기 위해 사용한 젠뱅크 접근 번호는 다음과 같다: NP_001026800, NP_001026800.1, XP_004411686, XP_004768446, XP_004812556, EFB14781, XP_004812554, XP_004768447, XP_004440093, XP_004411687, XP_004812555, XP_004274558, NP_937983, AAC51724, NP_001177896, XP_004380340,

NP_001039707, XP_003950543, NP_001231229 및 DAA17756.

[0163] 일단 공통 dTERT 서열을 얻으면, 2개의 돌연변이(R579Y 및 D996Y)를 혼입하여 관용을 파괴하는 것을 도왔다(예를 들어, 문헌[Gross et al., *J. Clin. Invest.*, 113: 425-433 (2004)] 참조). 추가적으로, 텔로머라제 활성을 없애기 위해 5개의 돌연변이(K633A, R638A, D719A, Y724A 및 D876A)를 도입하였다(예를 들어, 문헌[Weinrich et al., *Nature Genetics*, 17: 498-502 (1997)] 참조). 최종 변형 공통 dTERT 서열은 천연 개 TERT 아미노산 서열과 95.4% 서열 동일성을 공유한다. 상류의 코작(Kozak) 서열 및 IgE 리더 서열을 N-말단에 첨가하여 발현을 증가시켰다. 발현 수준을 최대화하기 위해, 공통 dTERT 서열의 코돈 사용빈도를 포유류 유전자의 코돈 바이어스에 적합화시켰다. RNA 전사를 위한 DNA 최적화를 또한 수행하였다: 매우 높은(>80%) 또는 매우 낮은(<30%) GC 함량의 영역 및 시스-작용성 서열 모티프, 예컨대 내부 TATA 박스, 카이-부위 및 리보솜 유입 부위는 회피되었다. BamHI 및 NotI를 이용하여 합성한 SYNCON dTERT를 분해하고 나서, 발현 벡터 pGX0001 내로 클로닝시켰다.

[0164] 공통 dTERT 암호 서열(서열번호 1)을 인간 거대세포바이러스 급-초기 프로모터(hCMV 프로모터)와 bGH 폴리A 사이의 pGX0001(변형된 pVAX1 발현 벡터) 내로 클로닝시켰다. 본래의 pVAX1 발현 벡터를 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)(캘리포니아주 칼스베드에 소재)로부터 얻었다. 변형된 pVAX1(pGX0001) 발현 벡터의 맵을 도 2에 나타낸다.

[0165] pGX0001을 생성하기 위해 pVAX1 내로 도입된 변형은 라이프 테크놀로지스로부터 입수 가능한 pVAX1의 보고된 서열에 기반하였다. 이를 변형을 이하에 제시하고, 플라스미드 종록 또는 항원 전사 및 면역을 지연시키지 않는다. 골격으로서 pGX0001을 이용하는 임의의 플라스미드 산물에서 지금까지 pGX0001 서열의 추가적인 변화는 관찰되지 않았다.

[0166] CMV 프로모터에서 C>G 241

[0167] 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 (bGH 폴리A) 하류의 C>T 1158 골격

[0168] 카나마이신 내성 유전자(KanR) 하류의 A> - 2092 골격

[0169] pUC 복제기점(pUC ori)에서 C>T 2493

[0170] RNASEH 부위 상류의 pUC Ori의 가장 말단에서 G>C 2969, 및

[0171] 염기쌍 2, 3 및 4는 CMV 프로모터 상류의 골격에서 ACT로부터 CTG까지 변하였다.

[0172] 본 실시예의 결과는 본 발명의 백신의 생성을 입증한다.

실시예 2

[0174] 본 실시예는 마우스에서 본 발명의 dTERT-발현 백신의 면역원성을 입증한다.

[0175] C57BL/6 마우스에서 세포-매개 면역 반응을 유도하기 위한 pGX1414(실시예 1에 기재)의 능력을 시험하였다. 간략하게, 암컷 8주령 C57BL/6 마우스(n=5)를 2개의 그룹으로 나누었다: 미경험 그룹 및 대퇴사두근 내로 근육내 주사(IM) 다음에 CELLECTRA(등록상표) 적응 상수 전류 장치(펜실베이니아주 플러머스 미팅에 소재한 인바이오파마슈티칼스 인코포레이티드(Inovio Pharmaceuticals Inc.))를 이용하는 전기천공법(EP)에 의해 25g의 pGX1414에 의한 면역화 그룹. 1초 지연만큼 떨어진 52ms 펄스폭의 2개의 0.1Amp 펄스를 전달하도록 장치를 구성하였다. 마우스는 2주 간격으로 4회 면역화를 받았다. 마지막 면역화의 1주 후에, 마우스를 희생시키고 나서, 비장을 회수하고, 비장세포를 단리시키고 나서, 마우스 IFN- γ ELISpot 분석을 수행하여 앞서 기재한 바와 같은 항원-특이적 세포 반응을 평가하였다(Yan et al., *Cancer Immunology Research* (2013))(도 3A 참조). 간략하게, ELISpot 96-웰 플레이트를 PBS 중에 희석시킨 마우스 IFN- γ 미네소타주 미네아폴리스에 소재한 알앤디 시스템즈(R&D Systems))에 대해 단클론성 항체로 코팅시키고 나서, 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 다음날, 플레이트를 세척하고 나서, 1% BSA 및 5% 수크로스로 보충한 PBS를 이용하여 실온에서 2시간 동안 차단시켰다. 완전 배양 배지(10% FBS로 보충한 RPMI 1640)에서 재현탁시킨 2×10^5 개 세포/웰의 유입 세포 수에서 연구 그룹 둘 다로부터의 마우스 비장세포를 3회 중복하여 독립적으로 첨가하였다. 젠스크립트(GenScript)(뉴저지주 피츠카타웨이)에 의해 합성하고 9개의 아미노산 만큼 중복되는 15개의 아미노산을 각각 함유하며, 실시예 1에 기재한 전체 천연 개 TERT(dTERT) 단백질 또는 SYNCON dTERT 단백질 중 하나를 나타내는 웹타이드의 2개 세트를 2 μ g/ml 웹타이드의 농도로 4개의 풀로 풀링시켰다. 각각 콘카발린 A를 5 μ g/ml에서 양성 대조군으로서 사용하고 완전 배양 배지를 음성 대조군으로서 사용하였다. 비장세포 및 웹타이드 함유 플레이트를 5% CO₂ 분위기 인큐베이터에서 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 세척하고 나서, 바이오틴일화된 항-마우

스 IFN- γ 검출 항체를 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고 나서, 색상 전개는 제조업자의 설명서(엘리스팟 블루 컬러 모듈(ELISpot Blue Color Module), 미네소타주 미네아폴리스에 소재한 알앤디 시스템즈)에 따랐다. 자동화된 ELISPOT 판독기(오하이오주 세이커 하이츠에 소재한 셀룰러 테크놀로지(Cellular Technology))를 이용하여 플레이트 상의 스팟을 계수화하였다. 데이터 디스플레이를 위해 스팟 형성 단위(Spot Forming Unit: SFU)의 평균 수를 1×10^6 개의 비장세포로 조절하였다.

[0176] 도 3B에 나타낸 바와 같이, pGX1414-면역화 마우스에서 SYNCON dTERT 웨타이드의 4개 풀에 대한 총 반응은 448 $\pm 10^3$ SFU/ 10^6 개의 비장세포였는데, 이는 미경험 그룹에서의 배경 반응보다 상당히 더 컸다(17 ± 8 SFU/ 10^6 개의 비장세포)($p < 0.05$). 추가로, 천연 dTERT 웨타이드에 대해 pGX1414에 의해 유도된 면역 반응을 평가하였다. pGX1414-면역화 마우스에서 천연 dTERT 웨타이드의 4개 풀에 대한 상가적 반응은 266 ± 98 SFU/ 10^6 개의 비장세포인 반면, 미경험 그룹에서의 배경 반응은 도 3C에 나타내는 바와 같이 14 ± 4 SFU/ 10^6 개의 비장세포($p < 0.05$)였다.

[0177] 본 실시예의 결과는 본 발명의 dTERT-암호화 백신이 마우스에서 매칭 SYNCON dTERT뿐만 아니라 천연 dTERT 웨타이드 둘 다에 대해 면역 반응을 생성할 수 있다는 것을 입증한다.

[0178] 본 실시예의 결과는 본 발명의 백신의 생성을 입증한다.

실시예 3

[0180] pGX1415는 서열번호 5를 암호화하는 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 플라스미드이다. 서열번호 5는 텔로머라제 활성이 없는 7개의 점 돌연변이(치환: R579Y, D996Y, K633A, R638A, D719A, Y724A 및 D876A를 초래)를 갖고, 인간 CMV 프로모터(hCMV 프로모터) 및 소 성장 호르몬 폴리-아데닐화 신호(bGH 폴리A)에 작동 가능하게 연결된 개 텔로머라제 역전사효소(dTERT) 폴리웨타이드이다. 플라스미드 골격은 카나마이신 내성 유전자(Kan^R) 및 플라스미드 복제기점(pUC ori)을 포함한다. pGX1415의 유전자 요소는 표 2에 제시되어 있고, pGX1415의 개략적 다이어그램은 도 5에 도시되어 있다.

표 2

요소	염기쌍
hCMV 프로모터	137-724
dTERT-PL 암호 서열	742-4164
bGH 폴리A	4208-4432
카나마이신 내성 유전자(Kan ^R)	4605-5399
pUC Ori	5698-6371

[0182] BamHI 및 XhoI 부위에서 pGX0001 내로 서열번호 4의 클로닝에 의해 pGX1415를 생성하였다.

[0183] 앞서 언급한 상세한 설명 및 수반하는 실시예는 단지 예시적이며, 첨부하는 청구범위 및 그들의 동등물에 의해 서만 정해지는 본 발명의 범주에 대한 제한으로서 취해져서는 안 된다는 것이 이해된다.

[0184] 개시되는 실시형태에 대한 다양한 변화 및 변형은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 화학 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 조성물, 제형 또는 사용 방법에 관한 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 이러한 변화 및 변형은 이의 정신과 범주로부터 벗어나는 일 없이 이루어질 수 있다.

[0185] 완전함의 이유로, 본 개시내용의 다양한 양상을 다음의 넘버링 조항에서 제시한다:

[0186] 조항 1. 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열, 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열; 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 서열번호 2에 대해 적어도 95% 동일성인 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 백신.

[0187] 조항 2. 조항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

[0188] 조항 3. 조항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1에 대해 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

[0189] 조항 4. 조항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

[0190] 조항 5. 조항 1에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2에 대해 95% 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 백신.

[0191] 조항 6. 조항 1 내지 조항 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 플라스미드인, 백신.

[0192] 조항 7. 조항 6에 있어서, 상기 플라스미드는 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는, 백신.

[0193] 조항 8. 조항 1 내지 조항 7 중 어느 한 항에 있어서, 애주번트를 더 포함하는, 백신.

[0194] 조항 9. 조항 8에 있어서, 상기 애주번트는 IL-12, IL-15, IL-28 또는 RANTES인, 백신.

[0195] 조항 10. 포유류에서 텔로머라제 역전사효소(TERT)에 대해 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 면역 반응 유도가 필요한 포유류에게 1항 내지 9항 중 어느 항의 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 상기 핵산 분자는 상기 포유류에서 발현되며, 다음의 면역 반응 중 하나 이상이 유도되는, 면역 반응을 유도하는 방법:

(a) TERT에 특이적인 체액성 면역 반응,

(b) 백신을 투여하지 않은 포유류에 비해 증가된 수준의 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 및 인터페론- γ (IFN- γ)를 포함하는 염증 반응, 및

(c) TERT에 특이적인 세포의 면역 반응.

[0199] 조항 11. 조항 10에 있어서, 상기 TERT는 개 TERT(dTERT)인, 방법.

[0200] 조항 12. 조항 10 내지 조항 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류는 암을 갖는, 방법.

[0201] 조항 13. 포유류에서 암을 치료하는 방법으로서, 암 치료가 필요한 포유류에게 조항 1 내지 조항 9 중 어느 한 항의 백신 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 상기 핵산 분자는 상기 포유류에서 발현되며 상기 암이 치료되는, 포유류에서 암을 치료하는 방법.

[0202] 조항 14. 조항 10 내지 조항 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백신은 전기천공법을 통해 투여되는, 방법.

[0203] 조항 15. 조항 10 내지 조항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류는 개인, 방법.

[0204] 조항 16. 조항 13 내지 조항 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전립선암, 간암, 자궁경부암, 재발성 호흡기 유두종증(RRP), 항문암, 두경부암, 혈액암, 백혈병, 림프종, 골수종, 폐 암종, 비소세포 폐 암종, 식도 편평 세포 암종, 방광암, 결장직장암, 위암, 간암종, 뇌암, 고모세포종, 췌장암, 활액 암종, 고환암 및 위암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

[0205] 조항 17. 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

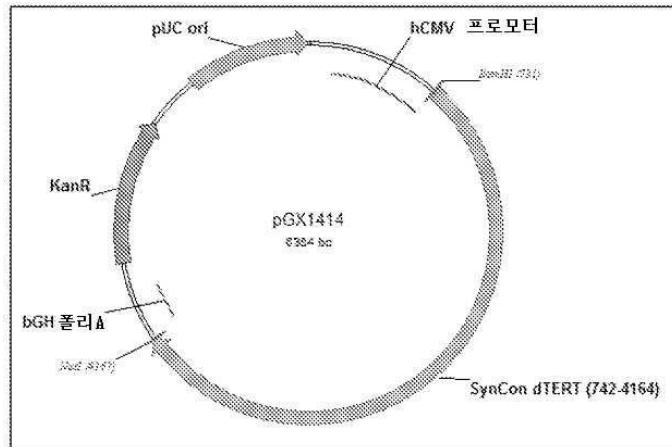
[0206] 조항 18. 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 분자.

[0207] 조항 19. 조항 17 또는 조항 18에 있어서, 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

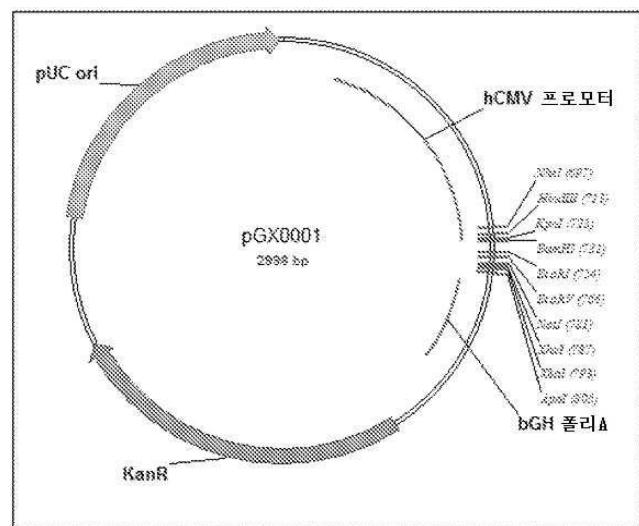
[0208] 조항 20. 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 5의 아미노산 서열, 서열번호 2에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

도면

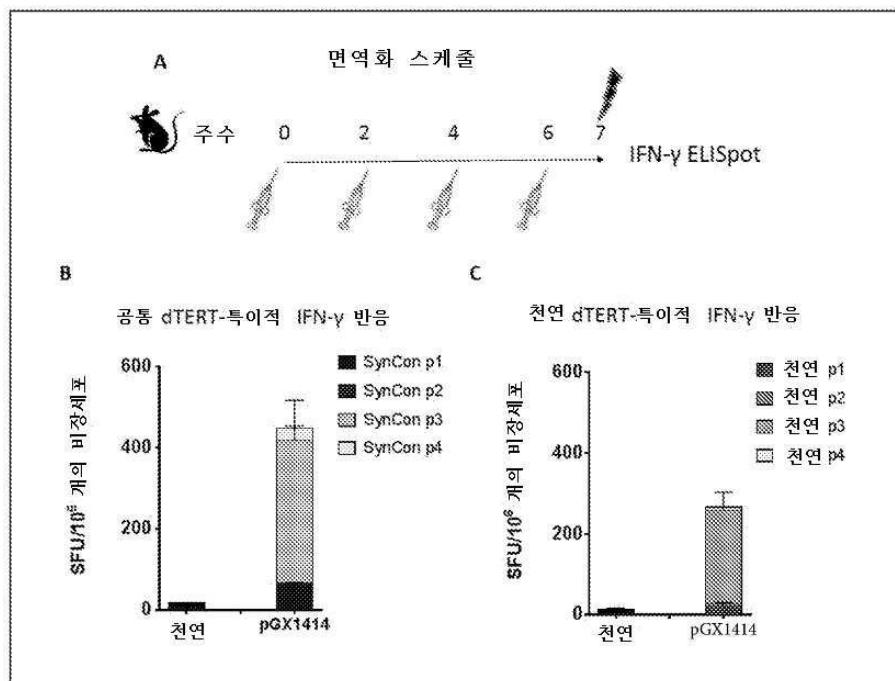
도면1



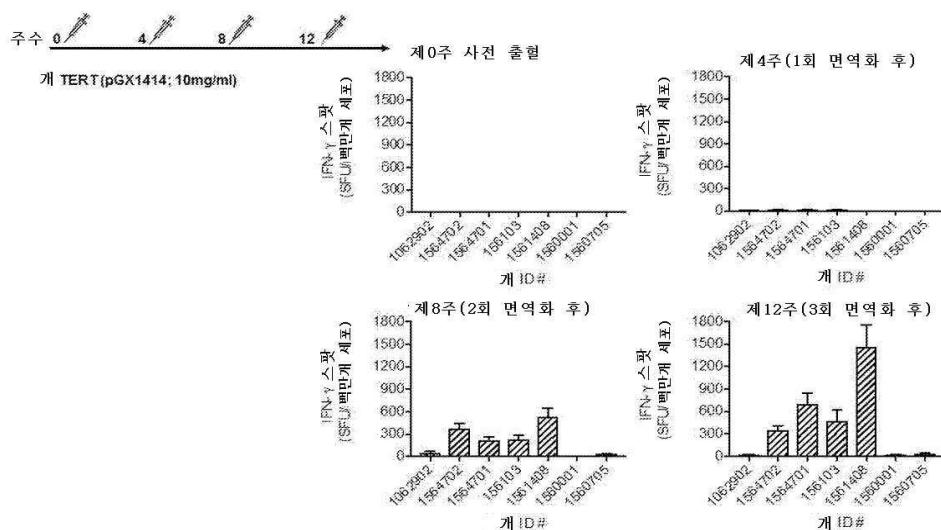
도면2



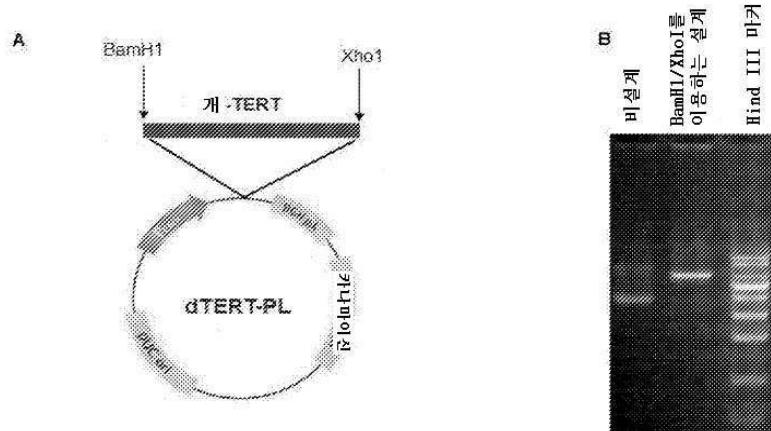
도면3



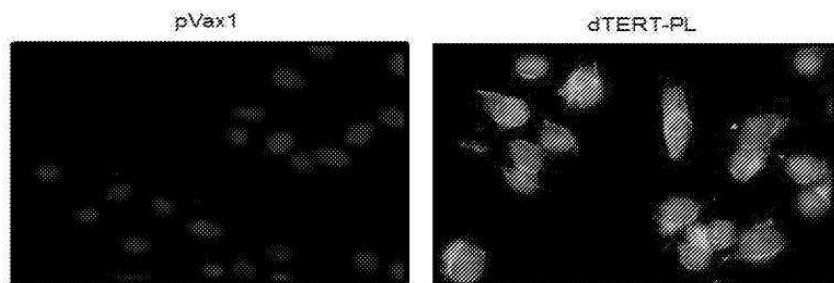
도면4



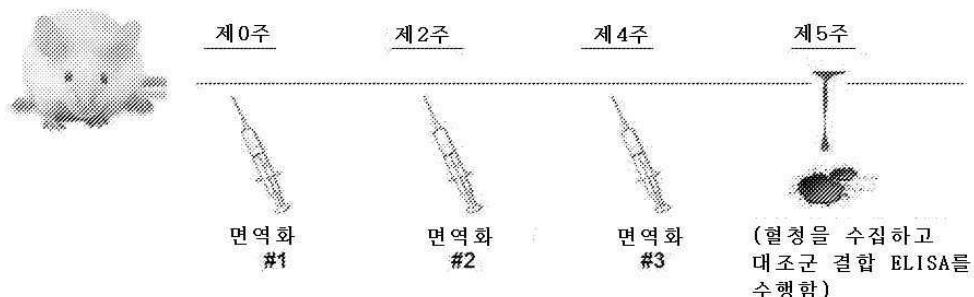
도면5



도면6



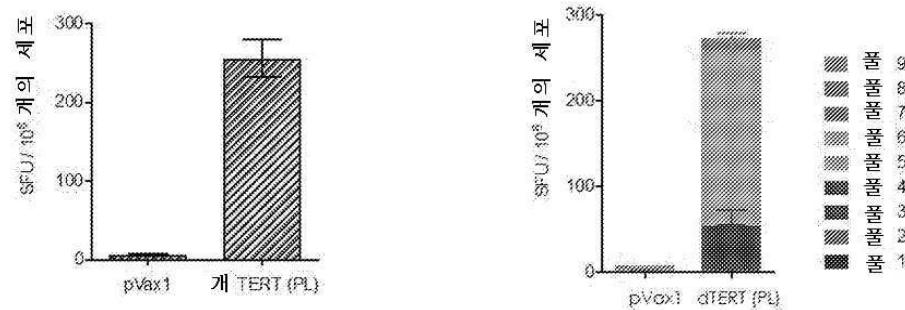
도면7

그룹 ($n = 4$)

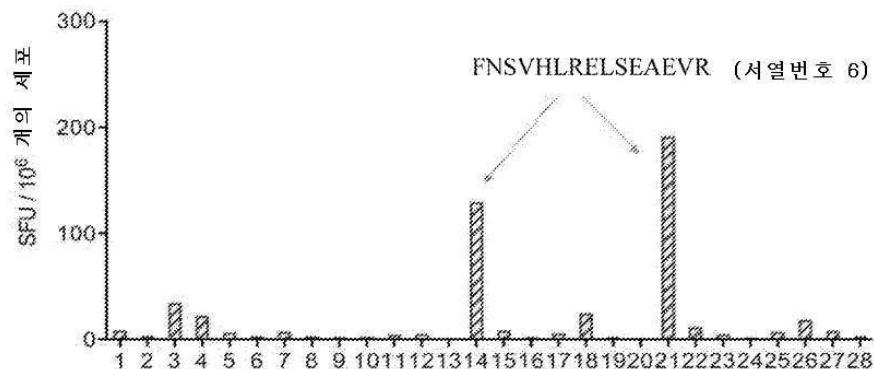
- 1) pVax1
- 2) dTERT-PL

(전기천 공법을 이용)

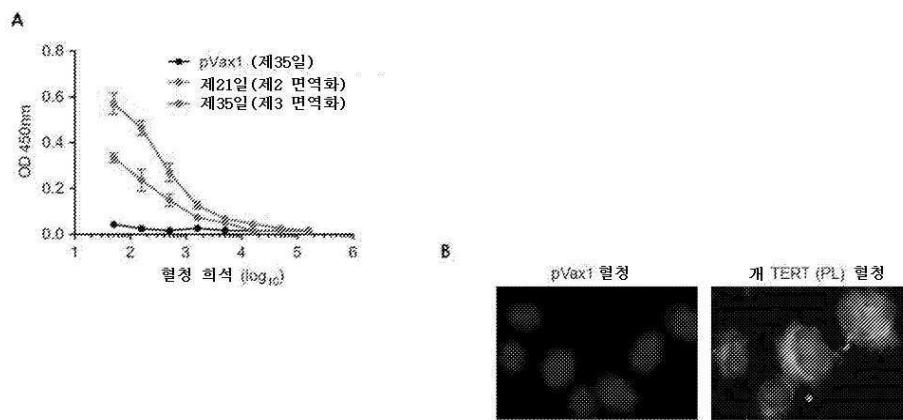
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INOVIO PHARMACEUTICALS, INC.

<120> CANCER VACCINES AND METHODS OF TREATMENT USING THE SAME

<130> WO/2017/136758
 <140> PCT/US2017/016557
 <141> 2017-02-03
 <150> US 62/291,601
 <151> 2016-02-05
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 3423
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dTERT pGX1414 insert

<400> 1

atggactgga cctggattct gttcctggtg gctgctgcta ctcgggtgca ttcccaaga	60
gccccaaagat gtcgcgtgt gagagctctg ctgcgggaa gatacaggga ggtgctgcca	120
ctggccacct tcctgcggag actggccct caggggagc gcctggtgcg acgaggcgac	180
ccagcagctt ttccggcact ggtggcacag tgcctggtgt gcgtgccatg ggtgccaga	240
ccccctccag cagcaccaag cttaggcag gtctcctgcc tgaaggagct ggtggcacga	300
gtggtccagc ggctgtgcga aagggagct cgaaacgtgc tggcctcgg gtttgctctg	360
ctggacggag cacgaggagg accacctgtc gccttcacca catccgtgca gtcttacctg	420
ccaaatacag tgactgagac cctgagaggc agcggagcat gggactgtc gctgagaagg	480
gtcggggacg atgtgctgac ccacctgctg gctagatgca cactgtatct gctggcga	540
ccatcatgca cataccagggt gtgcggacca ccactgtatg acctgtgcgc tcccgcaagc	600
ctgcccctgc ctgccccagg actgccagga ctgcctggac tgccaggact gggacatggc	660
gctgggactt ccgcagatct ggcacactacc cgacaggcac agaactctgg agctcgccga	720
cggagaggaa gtccaggcag ctccgtccca ctggcaaaaa ggcctaggcg ctctgtggct	780
ccagacgctg aaaggggagc acacccgcgt ttccctcgag cacatcagcc tccagttctca	840
gagccacactg cagtgactcc agcttagggct gcagccgagg ctgcaagctg ggaaggagga	900
ccaccaggaa ctgcaccatc caccctgca tggcacccat acccaggacc tcagggagt	960
ccacacgatc ccgcctcatcc tgagaccaag catttcgtt attgctccgg gggacgcgaa	1020
cgactgcgac catctttct gctgagtgcc ctgcctccat ctctgaccgg ggctaggaaa	1080
ctgggggaga caatcttct ggaaagtgcc ccacagaagc caggagcgc tcgacgaatg	1140

agaaggctgc ctgctcgcta ctggagaatg aggccactgt tccaggaact gctggggAAC	1200
cacgcacggt gcccttatag agccctgctg aggaccatt gtccactgag gcgcattggca	1260
gccaaggagg caagcgaaa tcagggccac cgcgagatcg gcatttgcct tctgaaacga	1320
ccagtggctg caccagagga acagaccgac ccccgccgac tggtgacgt gctgcgcag	1380
cattctagtc ctggcaggt gtacgcattc ctgcgagcat gcctgtgccc actggtgcca	1440
acaggactgt ggggtcccg acacaaccag cgagattcc tgccgaaacgt gaagaagtcc	1500
atctcactgg gcaagcatgc caaactgagc ctgcaggagc tgacatggaa gatgaaatgt	1560
caggattgtg catggctgag gggaaagccca ggagcatgct gcgtgcgcagc agctgaacac	1620
aggcgccgag aggaattct gccccgttc ctggtgtggc tggatggaca tatctacgt	1680
gtcgagctgc tgagaagctt ctttatgtg accgaaacta ctttcagaa gaactacgt	1740
ttctttatc gcaaaagcgt gtggcacag ctgcagtcctc tcggcattag acagcacttc	1800
aatagtgtcc atctgaggga gctgtcagag gccgaagtgc ggagacacag agaagccagg	1860
cctgctctgc tgacatcccg cctgcgattc ctgcagctc cctctggctt ggcaccaatt	1920
gtcaacatgg actacgtat gggggcccg actttccacc gagataagaa agtgcagcat	1980
ctgaccagcc aggtcaaaac actgtttcc gtgctgaatt atgagcgagc taggcgcggc	2040
tctctgtgg gagcaagtgt gctggaaatg gacgatatcc accgagcatg gcgaaccttc	2100
gtcctgcggg tgagagctca ggaccctgca ccacagctgt actttgtgaa ggtcgctgt	2160
acaggagcag cagacgcact gccacaggat agactggtcg aagtgtatgc caacgtcatt	2220
cgcggccagg aaaatactta ctgcgtgcgg cactatgctg tggccgcacg aaccgcacga	2280
ggacacgtca gaaagtccctt caaacggcac gtgagcacct tcaccgcacct gcagccctat	2340
atgcgccagt ttgtggagcg gctgcaggaa acatcaagcc tgagagatgc cgtggcatt	2400
gagcagtctt ctgtctgaa cgaagctggg tccggactgt tccacctgtt tctgagactg	2460
gtccacaatc atgtgatcg gattggcgaa aaaagtaca tccagtgca gggcattct	2520
caggggagca tcctgtccac cctgcgtgtc tcactgtgt atggcgcacat ggagagaagg	2580
ctgttcccag gcatccagca ggacggggtc ctgcgtgcac tggccgcga tttctgt	2640
gtgacacacctc acctgactca ggcccaggct tttctgagga cactggccgc cggcggtcc	2700
gagtgacggat gcagagccaa cctgcagaag actgctgtca attccctgtt ggaagatgg	2760
gcccggat ctgcgtgcacc tctgcagatcg ccagtcatt gcctgttcc atgggtgtggc	2820
ctgctgtgg acaccaggac actggaaatgt agctgtgtt actcaagacta tgcacgaaca	2880
tcaattcggg ccagcctgac ttttcccg ggagccaaac ccggcagaaa catgcgcga	2940
aaactgttcg ccgtgctgag gctgaagtgc tggatgttgc ttctgttgc acgtgtac	3000

agcattcaca cagtctacat gaacgtgtac aaaatcttcc tgctgcaggc ctatcgttt 3060

catgcttgcg tcctgcagct gcccttcaac cagcctgtgc gcaagaatcc tagttcttt 3120
 ctgagagtga tctctgatac tgccagttgc tgttactcac tgctgaaagc aaggaatgcc 3180
 ggcatgtctc tggcgctaa ggggcatac ggactgttcc caagcgaggc agctcgatgg 3240
 ctgtgcctgc acgctttct gctgaaactg gcaagacatt ccggactta taggtgtctg 3300
 ctgggagccc tgagagcagc caaggctcac ctgtctagac agctgcccag gggcaccctg 3360
 gccgcactgg aagcagcagc agacccaagc ctgaccgcag attcaaaac tatcctggac 3420
 tga 3423

<210> 2

<211> 1140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> dTERT pGX1414 insert

<400> 2

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

1 5 10 15

His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ala Leu Leu Arg

20 25 30

Gly Arg Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Leu Arg Arg Leu

35 40 45

Gly Pro Gln Gly Arg Arg Leu Val Arg Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe

50 55 60

Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg

65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu

85 90 95

Leu Val Ala Arg Val Val Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Arg Asn

100 105 110

Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Pro

115 120 125

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

130	135	140
Thr Glu Thr Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg		
145	150	155
Val Gly Asp Asp Val Leu Thr His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Tyr		
165	170	175
Leu Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu		
180	185	190
Tyr Asp Leu Cys Ala Pro Ala Ser Leu Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu		
195	200	205
Pro Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Leu Gly His Gly Ala Gly Thr Ser		
210	215	220
Ala Asp Leu Arg Pro Thr Arg Gln Ala Gln Asn Ser Gly Ala Arg Arg		
225	230	235
Arg Arg Gly Ser Pro Gly Ser Ser Val Pro Leu Ala Lys Arg Pro Arg		
245	250	255
Arg Ser Val Ala Pro Glu Pro Glu Arg Gly Ala His Arg Ser Phe Pro		
260	265	270
Arg Ala His Gln Pro Pro Val Ser Glu Pro Pro Ala Val Thr Pro Ala		
275	280	285
Arg Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ser Trp Glu Gly Gly Pro Pro Gly Thr		
290	295	300
Arg Pro Ser Thr Pro Ala Trp His Pro Tyr Pro Gly Pro Gln Gly Val		
305	310	315
Pro His Asp Pro Ala His Pro Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Cys Ser		
325	330	335
Gly Gly Arg Glu Arg Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ala Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Lys Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly		
355	360	365
Ser Ala Pro Gln Lys Pro Gly Ala Ala Arg Arg Met Arg Arg Leu Pro		
370	375	380

Ala Arg Tyr Trp Arg Met Arg Pro Leu Phe Gln Glu Leu Leu Gly Asn
 385 390 395 400
 His Ala Arg Cys Pro Tyr Arg Ala Leu Leu Arg Thr His Cys Pro Leu
 405 410 415
 Arg Ala Met Ala Ala Lys Glu Ala Ser Gly Asn Gln Ala His Arg Gly
 420 425 430
 Val Gly Ile Cys Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Ala Pro Glu Glu Gln
 435 440 445
 Thr Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro
 450 455 460
 Trp Gln Val Tyr Ala Phe Leu Arg Ala Cys Leu Cys Arg Leu Val Pro
 465 470 475 480
 Thr Gly Leu Trp Gly Ser Arg His Asn Gln Arg Arg Phe Leu Arg Asn
 485 490 495
 Val Lys Lys Phe Ile Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln
 500 505 510
 Glu Leu Thr Trp Lys Met Lys Val Gln Asp Cys Ala Trp Leu Arg Gly
 515 520 525
 Ser Pro Gly Ala Cys Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Arg Arg Glu
 530 535 540
 Glu Ile Leu Ala Arg Phe Leu Val Trp Leu Met Gly His Ile Tyr Val
 545 550 555 560
 Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln
 565 570 575
 Lys Asn Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Gln Leu Gln
 580 585 590
 Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Phe Asn Ser Val His Leu Arg Glu Leu
 595 600 605
 Ser Glu Ala Glu Val Arg Arg His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu
 610 615 620
 Thr Ser Arg Leu Arg Phe Leu Pro Ala Pro Ser Gly Leu Ala Pro Ile

625	630	635	640
Val Asn Met Asp Tyr Val Met Gly Ala Arg Thr Phe His Arg Asp Lys			
645	650	655	
Lys Val Gln His Leu Thr Ser Gln Val Lys Thr Leu Phe Ser Val Leu			
660	665	670	
Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu			
675	680	685	
Gly Met Asp Asp Ile His Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val			
690	695	700	
Arg Ala Gln Asp Pro Ala Pro Gln Leu Tyr Phe Val Lys Val Ala Val			
705	710	715	720
Thr Gly Ala Ala Asp Ala Leu Pro Gln Asp Arg Leu Val Glu Val Ile			
725	730	735	
Ala Asn Val Ile Arg Pro Gln Glu Asn Thr Tyr Cys Val Arg His Tyr			
740	745	750	
Ala Val Val Arg Arg Thr Ala Arg Gly His Val Arg Lys Ser Phe Lys			
755	760	765	
Arg His Val Ser Thr Phe Thr Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe			
770	775	780	
Val Glu Arg Leu Gln Glu Thr Ser Ser Leu Arg Asp Ala Val Val Ile			
785	790	795	800
Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala Gly Ser Gly Leu Phe His Leu			
805	810	815	
Phe Leu Arg Leu Val His Asn His Val Ile Arg Ile Gly Gly Lys Ser			
820	825	830	
Tyr Ile Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu			
835	840	845	
Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Arg Arg Leu Phe Pro Gly			
850	855	860	
Ile Gln Gln Asp Gly Val Leu Leu Arg Leu Val Ala Asp Phe Leu Leu			
865	870	875	880

Val Thr Pro His Leu Thr Gln Ala Gln Ala Phe Leu Arg Thr Leu Val

885 890 895

Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Arg Ala Asn Leu Gln Lys Thr Ala

900 905 910

Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Gly Ala Leu Gly Ser Ala Ala Pro Leu

915 920 925

Gln Leu Pro Ala His Cys Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp

930 935 940

Thr Arg Thr Leu Glu Val Ser Cys Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr

945 950 955 960

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

965 970 975

Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Ala Val Leu Arg Leu Lys Cys Cys Ala

980 985 990

Leu Phe Leu Tyr Leu Gln Val Asn Ser Ile His Thr Val Tyr Met Asn

995 1000 1005

Val Tyr Lys Ile Phe Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys

1010 1015 1020

Val Leu Gln Leu Pro Phe Asn Gln Pro Val Arg Lys Asn Pro Ser

1025 1030 1035

Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser Cys Cys Tyr Ser

1040 1045 1050

Leu Leu Lys Ala Arg Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly

1055 1060 1065

Ala Ser Gly Leu Phe Pro Ser Glu Ala Ala Arg Trp Leu Cys Leu

1070 1075 1080

His Ala Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Gly Thr Tyr Arg

1085 1090 1095

Cys Leu Leu Gly Ala Leu Arg Ala Ala Lys Ala His Leu Ser Arg

1100 1105 1110

Gln Leu Pro Arg Gly Thr Leu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asp

1115	1120	1125	
Pro Ser	Leu Thr Ala Asp Phe	Lys Thr Ile Leu Asp	
1130	1135	1140	
<210> 3			
<211> 6384			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> pGX1414 dTERT			
<400> 3			
gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60		
atagtaatca attacgggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120		
acttacggta aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac cccggccat tgacgtcaat	180		
aatgacgtat gttccatag taacgccaat agggacttac cattgacgtc aatgggtgga	240		
gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300		
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt	360		
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat	420		
gcgggtttgg cagtagatca atggcgtgg atagcggtt gactcacggg gatttccaag	480		
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc	540		
aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatggc ggttaggcgtg tacggtgga	600		
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga	660		
aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaact taagtttggt	720		
accgagctcg gatccgcccac catggactgg acctggattc tggccctggc ggctgctgct	780		
actcgggtgc attcccaag agccccaaaga tggcgccgtg tgagagctt gctgcgggaa	840		
agatacaggg aggtgctgcc actggccacc ttccctgcggaa gactggccccc tcaggggagg	900		
cgcctggcgtgc gacgaggcga cccagcagct ttccggcac tggcggcaca gtgcctggcgt	960		
tgcgtgccat gggatgccag accccctcca gcagcaccaa gctttaggca ggtctccgtc	1020		
ctgaaggagc tggcggcacg agtggtccag cggctgtgcg aaaggggagc tcgaaacgtg	1080		
ctggccttcg gtttgctct gctggacgga gcacgaggag gaccacctgt cgccttcacc	1140		
acatccgtgc ggttttaccc gccaaataca gtgactgaga ccctgagagg cagcggagca	1200		
tggggactgc tgctgagaag ggtcgccggac gatgtgctga cccacctgt ggcttagatgc	1260		
gcactgtatc tgctggcgtgc accatcatgc gcataccagg tgtgcggacc accactgtat	1320		

gacctgtcg ctccgcaga cctgcccgt cctgccccag gactgccagg actgcctgga	1380
ctgcccaggac tgggacatgg cgctggact tccgcagatc tgcgacctac ccgacaggca	1440
cagaactctg gagctcgccg acggagagga agtccaggca gctccgtccc actggcaaaa	1500
aggccttaggc gctctgtggc tccagagct gaaagggag cacaccgcag tttccctcga	1560
gcacatcagc ctccagtc agagccacct gcagtgactc cagctagggc tgcagccgag	1620
gctgcaagct gggaggagg accaccagga actcgaccat ccaccctgc atggcacca	1680
tacccaggac ctcaaggagt gccacacgt cccgctcatc ctgagaccaa gcattcctg	1740
tattgctcg gggacgcga acgactgcga ccatcttgc tgctgagtgc cctgcctca	1800
tctctgaccg gggctaggaa actggtgag acaatcttc tggaaagtgc cccacagaag	1860
ccaggagcag ctcgacgaat gagaaggctg cctgctcgct actggagaat gaggccactg	1920
ttccaggaac tgctgggaa ccacgcacgg tgccctata gagccctgct gaggaccat	1980
tgtccactga gggccatggc agccaaggag gcaagcgaa atcaggccca ccggggagtc	2040
ggcatttgcc ctctggaaacg accagtggct gcaccagagg aacagaccga ccccccgcga	2100
ctgggtgcagc tgctgcgcca gcattcttagt cttggcagg tgtacgcatt cctgcgagca	2160
tgcctgtgcc gactgggtgcc aacaggactg tgggggtccc gacacaacca gggagattc	2220
ctgcggaaacg tgaagaagtt catctactg ggcaaggcatg ccaaactgag cctgcaggag	2280
ctgacatgga agatgaaagt gcaggattgt gcatggctga gggaaagccc aggagcatgc	2340
tgcgtgccag cagctgaaca caggcgccga gaggaaatc tggcccggtt cctgggtgtgg	2400
ctgatggac atatctacgt ggtcgagctg ctgagaagct tctttatgt gaccgaaact	2460
acctttcaga agaactacct gttttttat cgcaaaagcg tgtggtcaca gctgcagtcc	2520
atcgccatta gacagcaactt caatagtgtc catctgaggg agctgtcaga ggccgaagtg	2580
cggagacaca gagaagccag gcctgctctg ctgacatccc gcctgcgatt cctgcagct	2640
ccctctggcc tggcaccaat tgtcaacatg gactacgtga tggggcccg cacttccac	2700
cgagataaga aagtgcagca tctgaccaggc caggtcaaaa cactgtttc cgtgctgaat	2760
tatgagcggag ctaggcgccc ctctctgctg ggagcaagtg tgctggaaatggacgatatc	2820
caccgagcat gggaaacctt cgtcctgccc gtgagagctc aggaccctgc accacagctg	2880
tactttgtga aggtcgctgt gacaggagca gcagacgcac tgccacagga tagactggtc	2940
gaagtgtatcg ccaacgtcat tcgccccag gaaaatactt actgcgtcgc gcactatgt	3000
gtggtccgac gaaccgcacg aggacacgtc agaaaagtct tcaaacggca cgtgagcacc	3060
ttcaccgacc tgcagcccta tatgcccacg ttgtggagc ggctgcagga aacatcaagc	3120
ctgagagatg ccgtggcat tgagcagtcc tctagtctga acgaagctgg gtccggactg	3180

ttccacctgt ttctgagact ggtccacaat catgtgatca ggattggcgg gaaaagttac	3240
atccagtgtc agggcattcc tcaggggagc atcctgtcca ccctgctgtc ctcactgtgc	3300
tatggcaca tggagagaag gctgtccca ggcattccagc aggacgggtt cctgctgcga	3360
ctggggccg attcctgct ggtgacacct cacctgactc aggccaggc tttctgagg	3420
acactggtc gggcggtcc agagtacgga tgcagagcca acctgcagaa gactgctgtc	3480
aattccctg tggaaagatgg ggcctggga tctgctgcac ctctgcagct gccagctcat	3540
tgcctgttc catgggtgtgg cctgctgctg gacaccagga cactgaaatg gagctgtgat	3600
tactcaagct atgcacgaac atcaattcgg gccagctga cttttccca gggagccaag	3660
ccggcagaa acatgcgccc aaaactgttc gccgtgctga ggctgaagtg ctgtgcttg	3720
tttctgtacc tgcaaggtaa cagcattcac acagtctaca tgaacgtgta caaaatcttc	3780
ctgctgcagg cctatcggtt tcatgctgc gtcctgcagc tgcccttcaa ccagcctgtg	3840
cgcaagaatc ctatgttctt tctgagagtg atctctgata ctgccagttg ctgttactca	3900
ctgctgaaag caaggaatgc cggcatgtct ctggggccta agggggcatc aggactgttc	3960
ccaaggcagg cagtcgatg gctgtgcctg cacgttttc tgctgaaact ggcaagacat	4020
tccgggactt ataggtgtct gctgggagcc ctgagagcag ccaaggctca cctgtctaga	4080
cagctgccca gggcaccct ggccgcactg gaagcagcag cagacccaag cctgaccgca	4140
gattcaaaa ctatcctgga ctgagcggcc gctcgagtct agagggcccg tttaaaccgg	4200
ctgatcagcc tgcactgtgc cttctagtt ccagccatct gttgttgcc cctccccgt	4260
gccttccttgc accctgaaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgagggaaat	4320
tgcacgcacat tgcactgat ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtgg ggcaggacag	4380
caagggggag gattggaaag acaatagcag gcatgctgg gatgcgggtgg gctctatggc	4440
ttctactggg cggtttatg gacagcaagc gaaccgaaat tgccagctgg ggcggccctct	4500
ggtaaggttt ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgcgc aaggatctga	4560
tggcgccagg gatcaagctc tgcactgat gacaggatgag gatcggttcg catgattgaa	4620
caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac	4680
tggccacaac agacaatcg ctgcgtctgat gcccgggtt tccggctgtc agcgcagggg	4740
cgcccggttc ttttgcata gaccgacctg tccgggtcccc tgaatgaact gcaagacgag	4800
gcagcgcggc tatcggtgtt ggcacgcacg ggcgttccctt ggcagctgt gctcgacgtt	4860
gtcactgaag cggaaaggga ctggctgcta ttggcgaag tgccggggca ggatctcctg	4920

tcatctcacc ttgtcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gggcggtcg	4980
catacgctt atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaacatcg catcgagcga	5040
gcacgtactc ggatggaagc cggcttgatc gatcaggatg atctggacga agagcatcag	5100
gggctcgcc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcga gcatgcccga cggcgaggat	5160
ctcgctgtatc cccatggcga tgcctgttgc ccgaatatca tggtgaaaaa tggccgttt	5220
tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcgacc gctatcagga catagcgatc	5280
gctacccgtg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgtt cctcgatgt	5340
tacggtatcg ccgctcccgatc ttcgcagcgc atgccttct atgccttct tgacgagttc	5400
ttctgaatttta ttaacgctta caatttcctg atgcgttatt ttctcccttac gcatctgtgc	5460
ggtatttac accgcatcag gtggcactt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttgc	5520
tttatttttca taatacattt caaatatgtt tccgttcatg agacaataac cctgataat	5580
gcttcaataaa tagcacgtgc taaaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat	5640
ccttttgcgtt aatctcatgtt cccaaatccc ttaacgttgcgat ttttcgttcc actgagcgtc	5700
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttgc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg	5760
ctgcttgaa acaaaaaaac caccgttacc agcggtgggt tgtttgcgg atcaagagct	5820
accaactttttccgaagg taactgggtt cagcagagcg cagataccaa atactgttct	5880
tcttagttagtgc ccgttagttt gccaccactt caagaactct gtgcaccgc ctacatacc	5940
cgctctgttta atccgttacc cagtggttgc tgccgttgc gataagtgt gtcttaccgg	6000
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcggctgaa cgggggggttc	6060
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgc ctacaccga ctgagatacc tacagcgtga	6120
gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cgtaagcgg	6180
cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccagggg gaaacgcct ggtatctta	6240
tagccctgtc gggtttcgccc acctctgact tgagcgtcga tttttgtat gctcgatcagg	6300
ggggcggagc ctatggaaaa acgcccggaa cggccctttt ttacgggttcc tggcccttttgc	6360
ctggccctttt gtcacatgt tctt	6384
<210> 4	
<211> 3444	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> dTERT pGX1415 insert	
<400> 4	
ggatccgcca ccatggactg gacttggatt ctgttccgg tcgctgccgc cactcgatc	60

cattcacctc gggctcctcg ctgttagggct gtgcgggctc tgctgagagg ccggtagcagg	120
gaggtgctgc cactggccac cttcctgagg agactggcc ctccggcag actgctggtg	180
cggcgccgcg accctgcagc cttcggcc ctggtggcac agtgcctggt gtgcgtgcca	240
tggggcgcgc gcccaccccc tgcagcacca tgcttaggc aggtgagctg tctgaaggag	300
ctggtgccgc gcggtggca gaggctgtgc gagagaggcg ccaggaacgt gctggccttc	360
ggcttgcgc tgctggatgg agcccgccgc ggcccacccg tggccttcac cacaagcgtg	420
aggtcctacc tgccataac cgtgacagag acactgagag gctccggagc atggggcctg	480
ctgctgagga gagtggcga cgatgtgctg acacacctgc tggcaaggtg cgcaactgtat	540
ctgctgggtgg caccatcctg cgcataccag gtgtgcggcc ctccactgt a tgacactgtgc	600
gcccctgcct ctctgcccct gcctgcccgc ggctgcctg gcctgcccagg cctggcaggc	660
ctgggagcag gagcaggagc cagcgccat ctgcgcctaa ccaggcaggc acagaactcc	720
ggagcacggc gcaggagagg ctctccaggc agcggcgtgc ccctggccaa gaggcctcg	780
cgctccgtgg catctgagcc agagagaggc gcccacccgt cttccctcg cgcccgacag	840
cctccgtga gcgaggcccc agccgtgaca ccagcagtgg cagcatcccc agcagcctct	900
tggaggggcg gcccacccgg cacccggcct accacaccag catggcaccc ataccctgga	960
ccacagggag tgccacacga ccctgcccac ccagagacaa agaggttcct gtattgtagc	1020
ggcggcaggg agagactgctg gcctagctt ctgcgtcgc ccctgcctcc aacactgtct	1080
ggcggcagga agctggtgga gacaatctt ctggcagcg ccctcagaa gcctggagca	1140
gcaaggagaa tgcggcgct gcctgccaga tactggcga tgaggcact gttccaggag	1200
ctgctggaa accacgcaag gtgccttat agagccctgc tgccgacaca ctgtccactg	1260
agagccatgg ccgccaagga gggctctggc aatcaggccc acagaggcgt gggaatctgc	1320
cctctggagc gggcagtggc agcccctcag gaggcagacag atagcaccag gctggtgca	1380
ctgctgaggc agcacagctc cccatggcag gtgtacgcct tcctgagggc atgcctgtgc	1440
tggctggcgc caacggcct gtggggctcc agacacaacc agaggagatt cctgcggaa	1500
gtgaagaagt ttatcagctt gggcaagcac gccaagctgt ccctgcagga gctgacatgg	1560
aagatgaagg tgagagactg tacctggctg cacggcaacc caggcgcctg ctgcgtgcca	1620
gcagcagagc accggcgcag ggaggagatc ctggcaaggt tcctggtgct ggtggatggc	1680
cacatctacg tggtaagact gctgagatcc ttctttatg tgaccgagac tacgttccag	1740
aagaactacc tttttta tcggaagagc gtgtggccc agctgcagtc tatcgccatc	1800

cgccagctgt tcaattctgt gcacctgagg gagctgagcg aggagaggt gagacggcac	1860
agagaggccc gcccagccct gctgacatct agactgcgtt tcctgccagc acctagccgc	1920
ctggccccca tcgtgaacat ggactacatc atggcgccc gcaccttcca caggataag	1980
aagggtgcgc acctgacatc ccagctgaag accctgttt ctgtgcgtaa ttatgagagg	2040
gcacgcaggc ctccctgct gggagccct atgctggca tggacgatat ccaccgcgc	2100
tggaggacat tcgtgctgct catcaggca cagaaccagg ccccttagct gtacttttg	2160
aagggtggcag tgaccggagc agcagacgca ctgccccagg atcgccctggt ggaagtgtac	2220
gccaatgtga tcagacacta ggagagcaca tactgcgtgc ggcactatgc agtggcag	2280
agaaccgcca gggccacgt ggcacaggcc ttcaagaggc acgtgtccac atttgcgcac	2340
ctgcagccat atatgagaca gtttggag cggctgcagg agacaagcct gctgaggat	2400
gccgtggta tcgacgcgtc tagctccctg aacgaggccg gctctagcct gttcacctg	2460
tttctgcgcc tggtgaccaa tcacgtggtg aggatcggcg gcaagtcata catccagtgt	2520
caggcgtgc cccaggcgtc tattctgagc accctgtgt gcagccgtgt ctatggcgcac	2580
atggagagac ggctgttccc tggcatcgag caggacggcg tgctgcgtag actggtgcc	2640
gattcctgc tggtgacacc acacctgacc caggcccagg ctttctgcg gacactggtg	2700
aagggagtgc ctgagtagcgg atgcaggcga aacctgcaga agaccggcgt gaatttcca	2760
gtggaggatg gcccctggg cagcggccgc cctctgcagc tgccagccca ctgcctgttt	2820
ccatgggtgt gcctgctgct ggacacacgg accctggagg tgccctgtga ttactcctct	2880
tatgcccaca catctatcag ggcaagccgt acctttccc agggagcaaa gccaggaagg	2940
aacatgcgcga ggaagctgct ggccgtgctg aggctgaagt gctgtccct gttcctgtac	3000
ctgcagggtga acggcatcca cacagtgtac atgaacgtgt acaagatctt cctgctgcag	3060
gcctatcggt ttacgcctg cgtgctgcag ctgccttca accagcctgt gagaaagaat	3120
cctagcttct ttctgagagt gatgcggcacc accgccttgcgtt acgttacag cctgcgtaa	3180
gcccgcatacg caggcctgctc cctggggcga aaggggacaa gcccgtgtt cccatccgag	3240
gcagcaaggt ggctgtgcct gcacgcctt ctgctgaagc tgcccccacca cagcggcaca	3300
tatagatgtc tgctggcgc cctgcaggca gcaaaggcac acctgtccag acagctgccc	3360
cggggcaccc tggcagccct ggaggcagcc gcagaccctt cactgacagc cgacttcaag	3420
acaatcctgg actgataact cgag	3444

<210> 5

<211> 1140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> dTERT pGX1415 insert

<400> 5

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

1 5 10 15

His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ala Leu Leu Arg

20 25 30

Gly Arg Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Leu Arg Arg Leu

35 40 45

Gly Pro Pro Gly Arg Leu Leu Val Arg Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe

50 55 60

Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Gly Ala Arg

65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ala Pro Cys Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu

85 90 95

Leu Val Ala Arg Val Val Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Arg Asn

100 105 110

Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Thr Glu Thr Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg

145 150 155 160

Val Gly Asp Asp Val Leu Thr His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Tyr

165 170 175

Leu Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu

180 185 190

Tyr Asp Leu Cys Ala Pro Ala Ser Leu Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu

195 200 205

Pro Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ser

210 215 220

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

225	230	235	240
Arg Arg Gly Ser Pro Gly Ser Gly Val Pro Leu Ala Lys Arg Pro Arg			
245	250	255	
Arg Ser Val Ala Ser Glu Pro Glu Arg Gly Ala His Arg Ser Phe Pro			
260	265	270	
Arg Ala Gln Gln Pro Pro Val Ser Glu Ala Pro Ala Val Thr Pro Ala			
275	280	285	
Val Ala Ala Ser Pro Ala Ala Ser Trp Glu Gly Gly Pro Pro Gly Thr			
290	295	300	
Arg Pro Thr Thr Pro Ala Trp His Pro Tyr Pro Gly Pro Gln Gly Val			
305	310	315	320
Pro His Asp Pro Ala His Pro Glu Thr Lys Arg Phe Leu Tyr Cys Ser			
325	330	335	
Gly Gly Arg Glu Arg Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ala Leu Pro			
340	345	350	
Pro Thr Leu Ser Gly Ala Arg Lys Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly			
355	360	365	
Ser Ala Pro Gln Lys Pro Gly Ala Ala Arg Arg Met Arg Arg Leu Pro			
370	375	380	
Ala Arg Tyr Trp Arg Met Arg Pro Leu Phe Gln Glu Leu Leu Gly Asn			
385	390	395	400
His Ala Arg Cys Pro Tyr Arg Ala Leu Leu Arg Thr His Cys Pro Leu			
405	410	415	
Arg Ala Met Ala Ala Lys Glu Gly Ser Gly Asn Gln Ala His Arg Gly			
420	425	430	
Val Gly Ile Cys Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Ala Pro Gln Glu Gln			
435	440	445	
Thr Asp Ser Thr Arg Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro			
450	455	460	
Trp Gln Val Tyr Ala Phe Leu Arg Ala Cys Leu Cys Trp Leu Val Pro			
465	470	475	480

Thr Gly Leu Trp Gly Ser Arg His Asn Gln Arg Arg Arg Phe Leu Arg Asn

485 490 495

Val Lys Lys Phe Ile Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln

500 505 510

Glu Leu Thr Trp Lys Met Lys Val Arg Asp Cys Thr Trp Leu His Gly

515 520 525

Asn Pro Gly Ala Cys Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Arg Arg Glu

530 535 540

Glu Ile Leu Ala Arg Phe Leu Val Leu Val Asp Gly His Ile Tyr Val

545 550 555 560

Val Lys Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln

565 570 575

Lys Asn Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Gln Leu Gln

580 585 590

Ser Ile Gly Ile Arg Gln Leu Phe Asn Ser Val His Leu Arg Glu Leu

595 600 605

Ser Glu Ala Glu Val Arg Arg His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu

610 615 620

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Leu Pro Ala Pro Ser Gly Leu Ala Pro Ile

625 630 635 640

Val Asn Met Asp Tyr Ile Met Gly Ala Arg Thr Phe His Arg Asp Lys

645 650 655

Lys Val Gln His Leu Thr Ser Gln Leu Lys Thr Leu Phe Ser Val Leu

660 665 670

Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ala Ser Met Leu

675 680 685

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

690 695 700

Arg Ala Gln Asn Pro Ala Pro Gln Leu Tyr Phe Val Lys Val Ala Val

705 710 715 720

Thr Gly Ala Ala Asp Ala Leu Pro Gln Asp Arg Leu Val Glu Val Ile

725	730	735
Ala Asn Val Ile Arg Pro Gln Glu Ser Thr Tyr Cys Val Arg His Tyr		
740	745	750
Ala Val Val Gln Arg Thr Ala Arg Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys		
755	760	765
Arg His Val Ser Thr Phe Ala Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe		
770	775	780
Val Glu Arg Leu Gln Glu Thr Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Val Ile		
785	790	795
Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala Gly Ser Ser Leu Phe His Leu		
805	810	815
Phe Leu Arg Leu Val His Asn His Val Val Arg Ile Gly Gly Lys Ser		
820	825	830
Tyr Ile Gln Cys Gln Gly Val Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu		
835	840	845
Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Arg Arg Leu Phe Pro Gly		
850	855	860
Ile Glu Gln Asp Gly Val Leu Leu Arg Leu Val Ala Asp Phe Leu Leu		
865	870	875
Val Thr Pro His Leu Thr Gln Ala Gln Ala Phe Leu Arg Thr Leu Val		
885	890	895
Lys Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Arg Ala Asn Leu Gln Lys Thr Ala		
900	905	910
Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Gly Ala Leu Gly Ser Ala Ala Pro Leu		
915	920	925
Gln Leu Pro Ala His Cys Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp		
930	935	940
Thr Arg Thr Leu Glu Val Ser Cys Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala His Thr		
945	950	955
Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Ser Gln Gly Ala Lys Pro Gly Arg		
965	970	975

Asn Met Arg Arg Lys Leu Leu Ala Val Leu Arg Leu Lys Cys Cys Ala
 980 985 990
 Leu Phe Leu Tyr Leu Gln Val Asn Gly Ile His Thr Val Tyr Met Asn
 995 1000 1005
 Val Tyr Lys Ile Phe Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys
 1010 1015 1020
 Val Leu Gln Leu Pro Phe Asn Gln Pro Val Arg Lys Asn Pro Ser
 1025 1030 1035
 Phe Phe Leu Arg Val Ile Ala Asp Thr Ala Ser Cys Cys Tyr Ser
 1040 1045 1050
 Leu Leu Lys Ala Arg Asn Ala Gly Leu Ser Leu Gly Ala Lys Gly
 1055 1060 1065
 Ala Ser Gly Leu Phe Pro Ser Glu Ala Ala Arg Trp Leu Cys Leu
 1070 1075 1080
 His Ala Phe Leu Leu Lys Leu Ala His His Ser Gly Thr Tyr Arg
 1085 1090 1095
 Cys Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Ala Lys Ala His Leu Ser Arg
 1100 1105 1110
 Gln Leu Pro Arg Gly Thr Leu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asp
 1115 1120 1125
 Pro Ser Leu Thr Ala Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
 1130 1135 1140
 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(15)
 <223> Native dTERT epitope
 <400> 6
 Phe Asn Ser Val His Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 1140

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1140)

<223> Native dTERT

<400> 7

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

1 5 10 15

His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ala Leu Leu Arg

20 25 30

Gly Arg Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Leu Arg Arg Leu

35 40 45

Gly Pro Pro Gly Arg Leu Leu Val Arg Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe

50 55 60

Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Gly Ala Arg

65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ala Pro Cys Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu

85 90 95

Leu Val Ala Arg Val Val Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Arg Asn

100 105 110

Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Thr Glu Thr Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg

145 150 155 160

Val Gly Asp Asp Val Leu Thr His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Tyr

165 170 175

Leu Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu

180 185 190

Tyr Asp Leu Cys Ala Pro Ala Ser Leu Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu

195 200 205

Pro Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Arg Arg Gly Ser Pro Gly Ser Gly Val Pro Leu Ala Lys Arg Pro Arg

245 250 255

Arg Ser Val Ala Ser Glu Pro Glu Arg Gly Ala His Arg Ser Phe Pro

260 265 270

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

275 280 285

Val Ala Ala Ser Pro Ala Ala Ser Trp Glu Gly Gly Pro Pro Gly Thr

290 295 300

Arg Pro Thr Thr Pro Ala Trp His Pro Tyr Pro Gly Pro Gln Gly Val

305 310 315 320

Pro His Asp Pro Ala His Pro Glu Thr Lys Arg Phe Leu Tyr Cys Ser

325 330 335

Gly Gly Arg Glu Arg Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ala Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Ala Arg Tyr Trp Arg Met Arg Pro Leu Phe Gln Glu Leu Leu Gly Asn

385 390 395 400

His Ala Arg Cys Pro Tyr Arg Ala Leu Leu Arg Thr His Cys Pro Leu

405 410 415

Arg Ala Met Ala Ala Lys Glu Gly Ser Gly Asn Gln Ala His Arg Gly

420 425 430

Val Gly Ile Cys Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Ala Pro Gln Glu Gln

435	440	445
Thr Asp Ser Thr Arg Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro		
450	455	460
Trp Gln Val Tyr Ala Phe Leu Arg Ala Cys Leu Cys Trp Leu Val Pro		
465	470	475
480		
Thr Gly Leu Trp Gly Ser Arg His Asn Gln Arg Arg Phe Leu Arg Asn		
485	490	495
Val Lys Lys Phe Ile Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln		
500	505	510
Glu Leu Thr Trp Lys Met Lys Val Arg Asp Cys Thr Trp Leu His Gly		
515	520	525
Asn Pro Gly Ala Cys Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Arg Arg Glu		
530	535	540
Glu Ile Leu Ala Arg Phe Leu Val Leu Val Asp Gly His Ile Tyr Val		
545	550	555
560		
Val Lys Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln		
565	570	575
Lys Asn Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Gln Leu Gln		
580	585	590
Ser Ile Gly Ile Arg Gln Leu Phe Asn Ser Val His Leu Arg Glu Leu		
595	600	605
Ser Glu Ala Glu Val Arg Arg His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu		
610	615	620
Thr Ser Arg Leu Arg Phe Leu Pro Ala Pro Ser Gly Leu Ala Pro Ile		
625	630	635
640		
Val Asn Met Asp Tyr Ile Met Gly Ala Arg Thr Phe His Arg Asp Lys		
645	650	655
Lys Val Gln His Leu Thr Ser Gln Leu Lys Thr Leu Phe Ser Val Leu		
660	665	670
Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ala Ser Met Leu		
675	680	685

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

690 695 700

Arg Ala Gln Asn Pro Ala Pro Gln Leu Tyr Phe Val Lys Val Ala Val

705 710 715 720

Thr Gly Ala Ala Asp Ala Leu Pro Gln Asp Arg Leu Val Glu Val Ile

725 730 735

Ala Asn Val Ile Arg Pro Gln Glu Ser Thr Tyr Cys Val Arg His Tyr

740 745 750

Ala Val Val Gln Arg Thr Ala Arg Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys

755 760 765

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

770 775 780

Val Glu Arg Leu Gln Glu Thr Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Val Ile

785 790 795 800

Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala Gly Ser Ser Leu Phe His Leu

805 810 815

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

820 825 830

Tyr Ile Gln Cys Gln Gly Val Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu

835 840 845

Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Arg Arg Leu Phe Pro Gly

850 855 860

Ile Glu Gln Asp Gly Val Leu Leu Arg Leu Val Ala Asp Phe Leu Leu

865 870 875 880

Val Thr Pro His Leu Thr Gln Ala Gln Ala Phe Leu Arg Thr Leu Val

885 890 895

Lys Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Arg Ala Asn Leu Gln Lys Thr Ala

900 905 910

Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Gly Ala Leu Gly Ser Ala Ala Pro Leu

915 920 925

Gln Leu Pro Ala His Cys Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Asp

930	935	940
Thr Arg Thr Leu Glu Val Ser Cys Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala His Thr		
945	950	955
Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Ser Gln Gly Ala Lys Pro Gly Arg		

965	970	975
Asn Met Arg Arg Lys Leu Leu Ala Val Leu Arg Leu Lys Cys Cys Ala		
980	985	990
Leu Phe Leu Tyr Leu Gln Val Asn Gly Ile His Thr Val Tyr Met Asn		
995	1000	1005
Val Tyr Lys Ile Phe Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys		
1010	1015	1020
Val Leu Gln Leu Pro Phe Asn Gln Pro Val Arg Lys Asn Pro Ser		

1025	1030	1035
Phe Phe Leu Arg Val Ile Ala Asp Thr Ala Ser Cys Cys Tyr Ser		
1040	1045	1050
Leu Leu Lys Ala Arg Asn Ala Gly Leu Ser Leu Gly Ala Lys Gly		
1055	1060	1065
Ala Ser Gly Leu Phe Pro Ser Glu Ala Ala Arg Trp Leu Cys Leu		
1070	1075	1080
His Ala Phe Leu Leu Lys Leu Ala His His Ser Gly Thr Tyr Arg		

1085	1090	1095
Cys Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Ala Lys Ala His Leu Ser Arg		
1100	1105	1110
Gln Leu Pro Arg Gly Thr Leu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asp		
1115	1120	1125
Pro Ser Leu Thr Ala Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp		
1130	1135	1140