



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0122829
(43) 공개일자 2016년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/02 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)

(71) 출원인
어드박시스, 임크.
미국 08540 뉴저지 이스트 프린스톤 컬리지 로드
305
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 웨스팅하우스
아

(52) CPC특허분류
A61K 39/02 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)

미국 19104 웨스팅하우스 필라델피아 슈트 200 케
스트너트 스트리트 3160

(21) 출원번호 10-2016-7025517
(22) 출원일자(국제) 2015년02월25일

(72) 발명자

샤하비 바파
미국 웨스팅하우스 19481 벨리 포지 셔그 할로우 로
드 200
왈레챠 아누
미국 웨스팅하우스 19067 앤들리 와일드플라워 서클
201
(뒷면에 계속)

심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년09월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/017559
(87) 국제공개번호 WO 2015/130810
국제공개일자 2015년09월03일
(30) 우선권주장
14/189,008 2014년02월25일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 HER2/N E U 과발현 종양의 치료를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 HER2/neu 항원-발현 종양에 대항하는 치료 및 예방접종하기 위한 조성물 및 방법 및 개체에서 HER2/neu 항원-발현 종양에 대항하는 면역 반응을 유도하는 조성물 및 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/57 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

마시아그 파울로 씨.

미국 일리노이 60047 롱 그로브 오크우드 서클
5642

페터슨 이본느

미국 펜실바니아 19102 필라델피아 로커스트 스트
리트 1425 유닛 11씨

메이슨 니콜라

미국 펜실바니아 19107 필라델피아 사우스 델리 스
트리트 225

시비 매튜

미국 펜실바니아 19108 세케인 퀸스 레인 887

(30) 우선권주장

14/268,436 2014년05월02일 미국(US)

62/076,411 2014년11월06일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

개체에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 치료하는 방법에 있어서, 방법은 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서, 상기 재조합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 상기 핵산 분자는 상기 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 균주의 염색체 내에서 돌연변이된 내인성 유전자를 보완하는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약 3.3×10^9 개 리스테리아의 리스테리아 용량을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대상체는 인간 또는 개과 동물 개체인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 인간 대상체는 아동, 청소년 또는 성인인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드를 상기 대상체에 투여하는 것은 상기 종양 내에 탈출 돌연변이를 예방하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 HER2/neu 키메라 항원은 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 애피토프를 포함하는 인간 키메라 HER2/neu인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 키메라 HER2/neu는 키메라 개과 HER2/neu인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 리스테리아 게놈 내로 통합되는 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주 내의 플라스미드 내에 있으며 상기 플라스미드는 항생제 선별의 부재시 상기 재조합 리스테리아 백신 균주 내에서 안정하게 유지되는 것인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 재조합 리스테리아는 actA 병독성 유전자에서의 돌연변이를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 추가 폴리펩티드는 a) 비-용혈 LLO 단백질 또는 N-말단 단편, b) PEST 서열, 또는 c) ActA 단편으로 이루어진 균으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 제2 오픈 리딩 프레임에 의해 인코딩되는 상기 대사 효소는 알라닌 라세미화 효소 또는

D-아미노산 트랜스페라아제 효소인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 독립적인 아주번트를 추가 포함하는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 아주번트는 과립구/대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 문자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 지질 A, 또는 비메틸화 CpG-함유 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 종양은 HER2/neu 양성 종양이고 상기 암은 HER2/neu-발현 암인, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 암은 골육종, 난소암, 위암, 중추신경계(CNS) 암 또는 유잉 육종(ES)인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 골육종 암은 개과 골육종인, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 골육종은 소아과 골육종인, 방법.

청구항 19

대상체에서 HER2/neu-발현 종양 또는 암에 대항하여 증강된 면역 반응을 유발하는 방법으로서, 방법은 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아 균주를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 상기 핵산 분자는 상기 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 균주의 염색체 내에서 돌연변이된 내인성 유전자를 보완하는 것인, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약 3.3×10^9 개 리스테리아의 리스테리아 용량을 포함하는, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 대상체는 인간 또는 개과 동물 개체인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 인간 대상체는 아동, 청소년 또는 성인인, 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드를 Her2/neu-발현 종양을 갖는 상기 대상체에 투여하는 것은 상기 종양 내에 탈출 돌연변이를 예방하는 것인, 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 HER2/neu 키메라 항원은 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 포함하는 인간 키메라 HER2/neu인, 방법.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 키메라 HER2/neu는 키메라 개과 HER2/neu인, 방법.

청구항 26

제19항에 있어서, 상기 핵산 분자는 리스테리아 게놈 내로 통합되는 것인, 방법.

청구항 27

제19항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주 내의 플라스미드 내에 있는 것인, 방법.

청구항 28

제19항에 있어서, 상기 플라스미드는 항생제 선별의 부재시 상기 재조합 리스테리아 백신 균주 내에서 안정하게 유지되는 것인, 방법.

청구항 29

제19항에 있어서, 상기 재조합 리스테리아는 actA 병독성 유전자에서의 돌연변이를 포함하는, 방법.

청구항 30

제19항에 있어서, 상기 추가 폴리펩티드는 a) 비-용혈 LLO 단백질 또는 N-말단 단편, b) PEST 서열, 또는 c) ActA 단편으로 이루어진 균으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 31

제19항에 있어서, 상기 제2 오픈 리딩 프레임에 의해 인코딩되는 상기 대사 효소는 알라닌 라세미화 효소 또는 D-아미노산 트랜스페라아제 효소인, 방법.

청구항 32

제19항에 있어서, 독립적인 아주번트를 추가 포함하는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 아주번트는 과립구/대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 분자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 지질 A, 또는 비메틸화 CpG-함유 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 34

제19항에 있어서, 상기 종양은 HER2/neu 양성 종양이고 상기 암은 HER2/neu-발현 암인, 방법.

청구항 35

제19항에 있어서, 상기 암은 골육종, 난소암, 위암, 중추신경계(CNS) 암 또는 유잉 육종(ES)인, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 골육종 암은 개과 골육종인, 방법.

청구항 37

제19항에 있어서, 상기 골육종은 소아과 골육종인, 방법.

청구항 38

제19항에 있어서, 상기 HER2/neu-발현 종양 또는 암에 대항하는 상기 면역 반응은 상기 HER2/neu 단백질의 서브 우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 및 개 개체에서 HER2/neu 항원-발현 종양에 대항하는 면역 반응 유도용 및 치료용 조성물 및 방법 및 상기 면역 종양에 대한 백신접종을 제공한다. 다른 구현예에서, 인간 개체는 아동 또는 청소년이다.

배경 기술

[0002] 리스테리아 모노사이토케네스는 주로 항원 제시 세포에 감염되어 이들 세포의 세포질에서의 생활에 적응하는 세포 내 병원균이다. 대식세포와 같은 숙주 세포는 *L. 모노사이토케네스*를 활발하게 식균하며 대부분의 박테리아는 포식리소좀 내에서 분해된다. 일부 박테리아는 용혈 리스테리오리신 O(LL0)의 활동을 통해 식포 막에 구멍을 내서 숙주 시토졸로 탈출한다. 시토졸에 있으면, *L. 모노사이토케네스*는 숙주 엑틴을 종합할 수 있어 숙주 면역 시스템을 더 피하면서 세포에서 세포로 직접 통과할 수 있는 *L. 모노사이토케네스*에 대한 무시할 수 있는 항체 반응을 야기한다.

[0003] HER2/neu(본원에서 "Her-2"로도 언급됨)는, 티로신 키나아제의 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 패밀리의 멤버이며 세포외 도메인, 막투과 도메인 및 세포 신호화에 관련된 것으로 알려진 세포내 도메인으로 구성된 185 kDa 당단 백질이다. 인간에서, Her2 항원은 모든 유방암의 25 내지 40%에서 과발현되며 또한 뼈(골육종-OSA), 난소, 폐, 췌장, 뇌 및 위장관의 많은 암에서 과발현된다. Her-2의 과발현은 조절되지 않은 세포 성장 및 신호화와 연관되며, 둘 다 종양 발달에 기여한다. Her-2를 과발현하는 암을 갖는 환자는 Her-2를 향하는 검출가능한 체액성 CD8⁺ T 세포, 및 CD4⁺ T 세포 반응에도 내성을 나타낸다.

[0004] 대형 사육견은 조직학적 이종성, 공격적인 국소 질병 및 초기 전이를 포함하는 소아과적 OSA의 많은 양상을 설명하는 OSA를 자발적으로 개발한다. 개에서, OSA는 임의의 뼈에 발생할 수 있으나 모든 영향 받은 뼈의 75% 내지 85%는 다리이며, 이는 "부속지 골육종"으로 지칭된다. 나머지 OSA는 턱, 하악골, 척추, 두개골, 늑골, 비강, 부비강 및 골반을 포함하는 중축 골격에 영향을 미친다. 진단에서, 95%의 개는 절단 수술 및 화학치료에도 불구하고 미세전이 질병을 가지며, 점진적인 전이 질병 때문에 안락사된 대부분의 개의 중간 생존시간은 10개월이다. 폐 전이 질병은 두 종 모두에서 질병이환 및 사망의 주요 원인이다.

[0005] 소아과에서 청소년 집단까지의 원발성 악성 골 종양은 상대적으로 드물며 20세 미만에서의 모든 암 중 6%를 차지하고 15세 내지 29세의 연령 범위 내의 청소년 및 청년(AYA)에서의 모든 암 중 3%를 차지한다. 골육종은 매년 미국에서 약 400명의 어린이 및 십대 청소년에게 영향을 주며, 이는 수십년간 작은 치료학적 개선이 이루어진 적지만 높은 요구를 나타내는 것이다. 골육종(OS)은 드문 악성 종양이지만, 소아과 연령 그룹에서 암-관련 사망의 주된 원인으로 자리잡고 있다. 수술과 함께 현대적인 다중작용제의 약물-집중 화학치료는 매우 국소화된 비-전이 질병에서 60% 내지 70%의 5년 무합병증 생존률을 달성한다. 그러나, 아직 해결되지 않은 주요한 문제는 전이 악화 또는 재발에 대한 낮은 예측 및 축 질환을 갖는 환자에 대한 낮은 예측이다. 게다가, 미국에서의 골육종에 대해 승인된 제품이 없으며, 이는 이 질병을 다루는 신규 치료제에 대한 높은 요구를 나타내는 것이다.

[0006] 본 발명은 잘-정의된 약독화 메커니즘을 가지며 항생제 선별 마커가 전혀 없고 개의 골육종을 치료하는 데 효과적이라고 발견된 *Lmdd4* 백신 벡터를 사용하여 생성된 재조합 리스테리아-HER2/neu 백신 균주를 제공하여 이 요구를 충족한다.

발명의 내용

발명의 요약

[0008] 일 양태에서, 본원에서 제공되는 본 발명은 융합 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, HER2/neu-발현 종양을 갖는 대상체에 융합 단백질을 투여하는 것은 종양에 의한 돌연변이 회피를 피한다. 다른 구현예에서, 돌연변이 회피를 피하는 것은 에피토프 확산에 기인한다. 또 다른 구현예에서, 돌연변이 회피를 피하는 것은 항원의 키메라 성질에 기인한다.

[0009] 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 본 발명은 혁산 분자를 포함하는 재조합 리스테리아 백신 균주에 관한 것이며, 다른 구현예에서, 혁산 분자는 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하고, 폴리펩티드는 HER2/neu 키메라 항원을 포함하며, 혁산 분자는 추가로 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 대사 효소는 재조합 리스테리아 균주의 염색체에서 돌연변이된 내인성 유전자를 보완한다.

[0010] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 본 발명은 대상체에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 치료하는 방법에 관한 것으로, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 혁산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아를 투여하는 단

계를 포함하며, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 상기 핵산 분자는 상기 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주의 염색체에서 돌연변이된 내인성 유전자를 보완한다. 다른 구현예에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 성인 또는 아동일 수 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 동물이다. 다른 구현예에서, 키메라 HER2는 개과 키메라 HER2이다. 다른 구현예에서, 키메라 HER2는 인간 키메라 HER2이다. 다른 구현예에서, 상기 융합 폴리펩티드를 상기 대상체에 투여하는 것은 상기 종양 내의 탈출 돌연변이를 예방한다. 다른 구현예에서, 상기 인간 HER2/neu 키메라 항원은 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 포함한다.

[0011] 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 본 발명은 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0012] 일 구현예에서, HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 치료하는 방법은 상기 대상체의 전체 생존률 증가를 야기한다. 다른 구현예에서, HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 치료하는 방법은 대상체에서 전이 질병의 지연을 야기한다. 다른 구현예에서, 치료는 증가된 HER2/neu 특이 T 세포 반응을 야기한다.

[0013] 일 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암에 대한 증강된 면역 반응을 유발하는 방법을 제공하는 것으로, 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 상기 핵산 분자는 상기 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주의 염색체에서 결여된 내인성 유전자를 보완한다. 다른 구현예에서, 상기 증강된 면역 반응을 유발하는 방법은 상기 대상체의 증가된 전체 생존률을 야기한다. 다른 구현예에서, 증강된 면역 반응을 유발하는 상기 방법은 대상체에서의 전이 질병의 지연을 야기한다. 다른 구현예에서, 상기 증강된 면역 반응을 유발하는 상기 방법은 증가된 HER2/neu 특이 T 세포 반응을 야기한다.

[0014] 일 구현예에서, 본 발명은 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 앓고 있는 대상체에서 생존을 연장하는 방법을 제공하는 것으로, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 상기 핵산 분자는 상기 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가로 포함하고, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주의 염색체에서 결여된 내인성 유전자를 보완한다. 다른 구현예에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 성인 또는 아동일 수 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 동물이다. 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 대상체에서의 재발 또는 전이 후에 상기 재조합 약독화 리스테리아를 투여하는 것을 추가 포함한다.

[0015] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 본 발명은 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 앓고 있는 대상체에서 전이 질병을 지연시키는 방법에 관한 것으로, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 상기 핵산 분자는 상기 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주의 염색체에서 결여된 내인성 유전자를 보완한다. 다른 구현예에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 성인 또는 아동일 수 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 동물이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명으로 여겨지는 주제는 특히 명세서의 끝부분에 언급되고 명백하게 청구된다. 그러나, 본 발명은 목적, 특징 및 이의 이점과 함께 조직화 및 작동 방법에 관해서는 첨부된 도면을 판독할 때, 하기 상세한 설명을 참조하여 이해하는 것이 이해하기가 가장 좋을 수 있다:

도 1. ADXS31-164의 구성물. (A) *LmddA* 균주에서 염색체 *dal-dat* 결실의 보완을 위한 구성적 리스테리아 p60 프로모터의 조절 하에서 바실러스 서브틸리스 *dal* 유전자를 갖는 pAdv164의 플라스미드 맵. 이는 또한 3개 단편인 Her2/neu: EC1 (aa 40-170), EC2 (aa 359-518) 및 ICI (aa 679-808)의 직접 융합에 의해 구성되는, 키메라 인간 HER2/neu 유전자로의 말단이 절단된 LLO₍₁₋₄₄₁₎의 융합을 포함한다. 우측의 벡터 도식은 말단이 절단된 LLO

에 융합된 인간 HER2/neu의 2개 세포외 도메인 및 1개 세포내 도메인으로 구성된 키메라 HER2/neu 융합 단백질을 발현하는 pAdv164를 상세히 설명한다. 플라스미드는 dal 유전자의 영양요구성 보완에 의해 재조합 dal/dat/actA 리스테리아 균주(*LmddA*) 내에 유지된다(실시예 참조). (B) tLLO-ChHer2의 발현 및 분비는 *Lm*-LLO-C항-LLO 항체로 블롯팅된 TCA 침전 세포 배양 상청액의 웨스턴 블롯 분석에 의해 hHer2(Lm-LLO-138) 및 *LmddA*-LLO-ChHer2(ADX31-164)에서 검출되었다. 104 KD까지의 차별되는 밴드는 tLLO-ChHer2에 상응한다. 내인성 LLO는 58 KD 밴드로서 검출된다. 리스테리아 대조는 ChHer2 발현이 없었다.

도 2. ADXS31-164의 면역원성 특성 (A) 면역화 마우스로부터의 비장세포에서 HER2/neu 리스테리아-기반 백신에 의해 유발된 세포독성 T 세포 반응은 자극제로서 NT-2 세포 및 표적으로서 3T3/neu 세포를 사용하여 테스트되었다. *Lm*-대조는 모든 방면에서 동일하지만 비관련 항원(HPV16-E7)을 발현하는 *LmddA* 백그라운드에 근거하였다. (B) 면역화 FVB/N 마우스로부터의 비장세포에 의해 세포 배양 배지 내로 분비된 IFN- γ 는 미토신 C 처리된 NT-2 세포로의 실험관내 자극 24시간 후에, ELISA에 의해 측정되었다. (C) 단백질의 상이한 영역으로부터의 실험관내 인큐베이션에 반응하여 키메라 백신으로 면역화된 HLA-A2 트랜스제닉 마우스로부터의 비장세포에 의한 IFN- γ 분비. 재조합 ChHer2 단백질이 양성 대조로서 사용되었으며, 비관련 웨პ티드 또는 웨პ티드가 없는 그룹이 도면 설명에 열거된 바와 같이 음성 대조를 구성하였다. IFN- γ 분비는 공동-접종 72시간 후에 수확된 세포 배양 상청액을 사용한 ELISA 분석으로 검출되었다. 각 데이터 포인트는 삼중 데이터 +/- 표준 오류의 평균이었다. * P < 0.001.

도 3. 리스테리아-ChHER2/neu 백신에 대한 종양 예방 연구는 HER2/neu 트랜스제닉 재조합 리스테리아-ChHer2 또는 대조 리스테리아 백신으로 6회 주입되었다. 면역화는 6주령에 시작하였고 21주까지 매 3주마다 지속하였다. 종양의 외관은 매주 측정되었으며 종양이 없는 마우스의 백분율로서 표현되었다. *p < 0.05, 그룹 당 N = 9종.

도 4. 비장에서 Treg의 %에서의 ADXS31-164로의 면역화 효과. FVB/N 마우스는 1×10^6 NT-2 세포로 s.c. 접종되었고 1주 간격으로 각 백신으로 3회 면역화되었다. 비장은 2차 면역화 후 7일째에 수확하였다. 면역 세포의 분리 후, Treg의 검출을 위해 이들을 항 CD3, CD4, CD25 및 FoxP3 항체로 염색하였다. 상이한 치료 그룹에 걸쳐 전체 CD3⁺ 또는 CD3⁺CD4⁺ T 세포의 백분율로서 표시되는, CD25⁺/FoxP3⁺ T 세포의 빈도를 보이는 대표적인 실험으로부터의 Treg를 점플롯으로 표시하였다.

도 5. NT-2 종양에서 종양 침투성 Treg의 %에서 ADXS31-164로의 면역화의 효과. FVB/N 마우스는 1×10^6 NT-2 세포로 s.c. 접종되었고 1주 간격으로 각 백신으로 3회 면역화되었다. 종양은 2차 면역화 후 7일째에 수확되었다. 면역 세포의 분리 후, 이들은 항 CD3, CD4, CD25 및 FoxP3 항체에 의한 Treg검출을 위해 염색되었다. (A). 대표적 실험으로부터의 Treg의 점-플롯. (B). 상이한 치료 그룹에 걸쳐 총 CD3⁺ 또는 CD3⁺CD4⁺ T 세포의 백분율(좌측 패널) 및 종양내 CD8/Tregs 비율(우측 패널)로서 표현되는, CD25⁺/FoxP3⁺ T 세포의 빈도. 데이터는 2회의 독립 실험으로부터 수득된 평균 \pm SEM으로 보여진다.

도 6. ADXS31-164의 예방접종은 뇌에서의 유방암 세포주의 성장을 지연시킬 수 있다. Balb/c 마우스는 ADXS31-164 또는 대조 리스테리아 백신으로 3회 면역화되었다. EMT6-Luc 세포(5,000)는 마취된 마우스에게 두개골내 주입되었다. (A) 마우스의 생체외 이미지화는 Xenogen X-100 CCD 카메라를 사용하여 표시된 일자에 실시되었다. (B) 꽉 채운 밀도는 표면적의 cm² 당 초 당 광자 수를 그래프로 나타냈다; 이는 평균 방사 휘도로 표시된다. (C) EMT6-Luc 세포, 4T1-Luc 및 NT-2 세포주에 의한 HER2/neu의 발현은 항-HER2/neu 항체를 사용하여, 웨스턴 블롯으로 검출되었다. 뮤린 대식세포 유사 세포주인 J774.A2 세포는 음성 대조로서 사용되었다.

도 7. ADXS31-164로 예방접종된 첫 18명의 환자 표시.

도 8. ADXS31-164 투여는 초기 또는 후기 심장 손상을 야기하지 않음을 보인다. A) 심장이 정상으로 보이는 심장의 초음파 심장진단도. B) 순차적인 심장 트로포닌 I 수준은 수준이 정상임을 보이는 연구의 과정에 거쳐 평가하였다(또한 도 26d를 참조하라).

도 9. A) 체온 및 B) 심장 수축 혈압은 ADXS31-164와 연관된 변화를 보인다. 체온 및 심장 수축 혈압은 기선 및 ADXS31-164 투여 후 2시간마다 기록되었다. 각 예방접종에서 각 개에 대한 파라미터가 표시된다. 수평 바는 각 시점에서 각 용량 그룹에서 모든 개에 대한 평균값을 나타낸다. ★p < 0.05, ★★p < 0.005

도 10. 원발성 질병에서 ADXS31-164 및 일시적인 방사선 치료 조합의 치료 스케줄을 보인다.

도 11. 근위부 상완골의 골절 후 개에서의 전이 질병의 증거가 없음을 보이며 또한 골절 회복을 나타내는 뼈 굳은살(boney callus)의 존재를 보이는 방사선 사진.

도 12. 부속지 골육종을 갖는 개의 치료학적으로 유효한 항-종양 면역성을 끌어내는 L. 모노사이토게네스 재조합 발현 ADXS31-164의 안정성 및 효능을 평가하기 위한 파일럿 1상 임상 실험의 시작표.

도 13. ADXS-31-164 투여 후 치료-관련 부작용 및 생존 곡선. A) 치료-관련 부작용. B) 시험 등록 시간에 전이 질병이 없는 모든 개. 대조군의 개는 다리 절단 후 카보플라틴 단독 또는 아드리아마이신이 더해진 카보플라틴을 받았다. 2마리 개는 관련없는 원인으로 사망하였으므로(1마리 개는 흡인성 폐렴으로 사망하고 다른 1마리는 신아세포종으로 사망함)백신 암으로부터 제거되었다. 예방접종 그룹 적색 선; 대조군 검은색 선.

도 14. (A) 인간 및 (B) 개 환자에서 원발성 및 전이 골육종(OSA)의 방사선 사진 이미지. 두 종 모두에서, 원발성 병변은 골간단(bone metaphysis)에서의 표지된 증식 및 용해의 영역에 의해 특성화된다(A에서 화살표).

도 15. HER2+ 골육종(OSA)을 갖는 개에서의 ADXS31-164의 안정성 및 효능을 평가하기 위한 3+3 임상 실험 1상의 도식. 자연적 HER2+ 부속지 OSA를 갖는 개인 소유의 개는 치료기준 절단을 받은 후 카보플라틴 화학요법을 받았다. 마지막 카보플라틴 투여 후 3주째에, 개는 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 또는 3×10^9 CFU의 ADXS31-164로 정맥내 예방접종되었다(3주 간격으로 3회 예방접종). 개는 전이 질병을 예방하는 백신의 효능을 확인하기 위해 사망까지 2달마다 재검하였다.

도 16. 개의 원발성 골육종에서의 HER2/neu 발현. (A) 악성 골아세포 및 골 퇴적의 네스트를 보이는 개로부터 원발 OSA의 H&E 염색. (B) 악성 골아세포 내 HER2/neu 발현을 보이는 개의 원발성 OSA의 면역조직화학적 평가. (C) HER2/neu의 가변적인 발현을 보이는 5마리의 개인 소유의 개로부터의 원발성 OSA 시료의 웨스턴 블로트. 양성 대조는: MCF-7 인간 유방 암종 세포주 및 CAMAC2 개 유방 암종 세포주이다.

도 17. 기선 및 ADXS31-164 투여 후 24시간에서의 혈액학적 수치. 각 예방접종에서 각 용량 그룹 내의 모든 개에서의 이전 및 이후 수치가 평균화되었다. ★p < 0.05, ★★p < 0.005. ADXS31-164 투여 후 24시간에 발생하는 백혈구 및 호중구 계수(A-B) 및 혈소판 및 림프구(C-D)에서 일시적인 감소가 동반되는 백혈구 및 호중구 계수에서의 일시적이지만 통계학적으로 유의한 증가를 보인다.

도 18. 백혈구(WBC), 호중구 및 단핵구 계수에서의 ADXS31-164 유도 증가는 생존과 연관성이 있다. WBC, 호중구 및 단핵구 계수는 기선 및 예방접종 후 24시간에 측정되었다. 백분율 증가는 각 예방접종 후 계산되었으며 각 개에 대하여 평균화되었다. (A) 결과는 생존에 따라 표시된다(사망 또는 생존). (B) 결과는 투여 받은 ADXS31-164 용량에 따라 표시된다. 수평 바는 그룹의 평균값을 나타낸다.

도 19. IFN-γ ELISpot에 의한 ADXS31-164에 의해 유도되는 Her-2 특이 T 세포 반응의 평가 결과를 보인다.

도 20. 반복 "부스터" 백신이 Her-2 특이 면역성을 자극함을 보인다. (A) 환자 289-003에 대한 결과를 보인다. (B) 환자 289-004에 대한 결과를 보인다. EC1, EC2 및 IC1은 Her2/neu 폴리펩티드의 웨스턴 블로트 단편을 나타낸다.

도 21. 카플란 메이어는 (A) 전이 시간(TTM) 및 (B) OSA 특이 생존에 대해 평가한다.

도 22. ADXS31-164 이 전이 질병의 발달을 예방함을 보인다. (A 및 B) 우측 두개 폐엽에서 이미 존재하는 전이 소절의 크기의 증가를 보이나 나머지 폐엽에서의 추가 전이 질병 발달이 없음을 보이는 카보플라틴 요법 후 3주간(A) 및 3차 ADXS31-164 백신 후 3주간(B) 얻어진 흉부 방사선 사진. (C 및 D) ICG 투여 후 근적외선 하에서 형광인 흉강경검사에서 확인된 폐 결절 (C). 근적외선 하에서 형광을 보이는 전이절제술(metastatectomy)을 받았을 때 제거된 극도로 정상적으로 보이는 폐 조직(삽도) (D). (E 및 F) 캡슐화된 폐 결절(E) 및 극도로 정상적으로 보이는 폐 조직에서의 염증의 중심 영역(F)의 유의한 출혈 및 괴사를 보이는, (E) 폐 결절 및 (F) 형광 정상 폐 조직의 H&E 염색된 조직병리학. (G 및 H) 신생 조직 내의 최소 CD3+ T 세포를 갖는 폐 결절 주위의 CD3+ T 세포를 보이는 (G) 저배율 및 (H) 고배율에서의 폐 결절의 면역조직화학. (I 및 J) CD3+ T 세포의 중심 축적을 보이는 (G) 저배율 및 (H) 고배율에서의 정상적으로 보이는 폐 조직의 면역조직화학. (K) 림프구에 의해 둘러싸인 분열상을 갖는 큰 비정상 세포를 보이는 중심 폐렴의 고배율 H&E 염색. (L) 단핵 세포에 의해 둘러싸인 분열상을 갖는 큰 세포를 보이는 폐렴 영역의 비멘틴 염색.

도 23. ADXS31 - 164는 자연적 HER2+ 골육종을 갖는 개에서의 전이 질병을 지연/예방하고 전체 생존을 연장한다. 과거 대조군과 비교한 예방접종된 개의 카플란-메이어 생존 곡선을 보인다. HER2+ 부속지 OSA를 갖는 개로 이루어진 대조군은 절단하여 치료된 후, 화학요법을 받았으나 ADXS31-164를 받지는 않았다. P < 0.0001. 예방접

종 그룹 적색 선; 대조군 검은색 선.

도 24. ADXS31 - 164가 HER2/neu에 대한 내성을 약화시킴을 보인다. PBMC는 기선, 3차 예방접종 후 3^{주째}(9주) 및 2달 후(17주)에 수집되어 HER2/neu의 고도로 보존된 IC1 도메인에 대한 반응에 대해서 IFN-γ ELISpot으로 분석되었다. 결과는 개들이 초기 반응자, 후기 반응자 및 명백한 비-반응자로 나누어짐을 나타낸다. NA는 이들 개에 대한 17주 시료에서 아직 평가되지 않았음을 나타낸다.

도 25a 내지 25d. ADXS31-164가 심장 기능에 부정적 영향을 주지 않음을 보인다. 심장 파라미터 LVID (확장기) (도 25A), LVID (수축기)(도 25b) 및 분획 단축(도 25c)는 기선, 예방접종 시점 및 그 후 2달마다 각 개에 대해서 평가되었다. 심장 트로포닌 I 수준이 동일 시점에서 평가되었다(도 25d).

도 26. ADXS31-164가 HER2/neu의 고도로 보존된 세포내 도메인에 대한 내성을 약화시킴을 보인다.

그림의 간단명료함을 위해 도면에 보여지는 요소는 필수적으로 일정 비례로 그려지지 않았음이 명백할 것이다. 예를 들어, 일부 요소의 면적은 명료함을 위해 다른 요소에 비해 과장될 수 있다. 또한, 명백하게 간주되는 경우, 참고 번호는 상응하거나 유사한 요소를 나타내기 위해 도면 중에서 반복될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

발명의 상세한 설명

[0018]

하기 상세한 설명에서, 많은 특정 세부사항들은 본 발명의 완벽한 이해를 제공하기 위해 진술된다. 그러나, 본 발명이 이를 특정 세부사항 없이 실시될 수 있음이 본 분야의 당업자에게 이해될 것이다. 다른 예에서, 널리 공지된 방법, 공정, 및 구성요소는 본 발명을 모호하게 하지 않기 위해 상세히 설명되지 않았다.

[0019]

일 구현예에서, 본원에서, 돌연변이 회피를 피하면서, Her2-neu 항원-발현 종양을 예방하고, 치료하고, 이에 대항하여 예방접종하고 Her2-neu 항원의 서브-우성 애피토프에 대항하는 면역 반응을 유도하는 조성물 및 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 돌연변이 회피를 피하는 것은 애피토프 확산에 기인한다. 또 다른 구현예에서, 돌연변이 회피를 피하는 것은 항원의 키메라 성질에 기인한다.

[0020]

다른 구현예에서, 본원에서 융합 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하고, 융합 단백질을 HER2/neu-발현 종양을 갖는 대상체에 투여하는 것은 상기 종양 내의 탈출 돌연변이를 예방한다. 다른 구현예에서, 본원에서 면역원성 조성물을 포함하는 재조합 리스테리아 백신 균주를 제공한다.

[0021]

일 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 성인 또는 아동이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 아동이다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 대상체이다. 다른 구현예에서, 개과 동물은 개이다.

[0022]

일 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암에 대한 증강된 면역 반응을 유발하는 방법을 제공하며, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함한다.

[0023]

일 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 예방하는 방법을 제공하며, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함한다.

[0024]

다른 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함한다.

[0025]

일 구현예에서, 본원에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 갖는 대상체의 생존을 연장시키는 방법을 제공하며, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 동물이다.

[0026]

일 구현예에서, 본원에서 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 갖는 대상체에서 전이 질병을 지연시키는 방법을 제공하며, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함한다. 일 구현예

에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 동물이다.

[0027] 일 구현예에서, 본원에서 대상체에서의 HER2/neu-발현 종양 성장 또는 암을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 약독화 리스테리아를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 융합 폴리펩티드는 추가 폴리펩티드에 융합된 HER2/neu 키메라 항원을 포함하며, 상기 핵산 분자는 상기 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하고, 상기 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하며, 상기 대사 효소는 상기 재조합 리스테리아 백신 균주의 염색체에서 돌연변이된 내인성 유전자를 보완한다. 다른 구현예에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 성인 또는 아동일 수 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 개과 동물이다. 다른 구현예에서, 키메라 HER2는 개과 키메라 HER2이다. 다른 구현예에서, 키메라 HER2는 인간 키메라 HER2이다. 다른 구현예에서, 상기 융합 폴리펩티드를 상기 대상체에 투여하는 것은 상기 종양 내의 탈출 돌연변이를 예방한다. 다른 구현예에서, 상기 인간 HER2/neu 키메라 항원은 적어도 5개, 9개, 13개, 14개, 또는 17의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 포함한다.

[0028] 일 구현예에서, 본원에서 핵산 분자를 포함하는 재조합 리스테리아 백신 균주를 제공하며, 여기에서 핵산 분자는 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하고, 폴리펩티드는 HER2/neu 키메라 항원을 포함하며, 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하고, 대사 효소는 재조합 리스테리아 균주의 염색체에서 결여된 내인성 유전자를 보완한다. 다른 구현예에서, 재조합 리스테리아 백신 균주는 대사 효소를 인코딩하는 제3 오픈 리딩 프레임을 포함하는 핵산 분자를 추가 포함하며, 여기에서 대사 효소는 재조합 리스테리아 균주의 염색체에서 결여된 내인성 유전자를 보완한다.

[0029] 일 구현예에서, 핵산 분자는 리스테리아 계놈 내로 통합된다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 재조합 리스테리아 백신 균주 내의 플라스미드 내에 있다. 또 다른 구현예에서, 플라스미드는 항생제 선별의 부재 시 재조합 리스테리아 백신 균주에서 안정하게 유지된다. 다른 구현예에서, 플라스미드는 재조합 리스테리아에 항생제 내성을 부여하지 않는다. 다른 구현예에서, 재조합 리스테리아 균주는 약독화된다. 다른 구현예에서, 재조합 리스테리아는 약독화 영양요구성 균주이다. 다른 구현예에서, 외부 항원의 발현이 본 발명에서와 같은 박테리아에 영향을 미치는 높은 대사 부담이 또한 약독화의 중요한 메카니즘이다.

[0030] 일 구현예에서 약독화 균주는 *LmddA*이다. 다른 구현예에서, 이 균주는 리스테리아-기반 백신의 내재된 특성인 강한 아주번트 효과를 행사한다. 이 아주번트 효과의 한 징후는 키메라 HER2/neu이외의 항원을 발현하는 리스테리아 또는 ADXS-31-164 (키메라 HER2/neu 발현) 백신 중 하나에 의해 발생되는 종양내 Treg의 수에서 5배 감소된다(본원의 도 5를 참조하라). 다른 구현예에서, 상이한 항원(HPV16 E7)을 발현하는 *LmddA* 백터는 또한 아마도 선천적인 면역 반응의 결과로서, 종양에서의 Treg의 빈도에서의 유의한 감소와 연관된다.

[0031] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 약독화 영양요구성 리스테리아 백신 균주는 ADXS-31-164 균주이다. ADXS-31-164는 병독성 유전자 *actA*의 결실에 기인하여 약독화되고 *dal* 유전자 보완에 의해 생체내 및 실험관내 HER2/neu 발현을 위한 플라스미드를 유지하는 리스테리아 백신 백터에 근거한다. 일 구현예에서, ADXS31-164는 리스테리오리신 0 (LLO)의 처음 441개 아미노산에 융합된 키메라 HER2/neu 단백질을 발현하고 분비하며, 다른 구현예에서, 리스테리오리신 0은 말단이 절단되고 비-용혈성인 LLO이다. 다른 구현예에서, ADXS31-164는 트랜스제닉 동물에서 HER2/neu를 향한 내성을 약화시키는 능력을 갖는 강한 항원 특이 항-종양 반응을 행사한다(실시예, 도 24를 참조하라). 다른 구현예에서, the ADXS31-164 균주는 매우 약독화되고 종래 리스테리아 백신 세대보다 더 나은 안정성 프로필을 가지는데, 이는 면역화된 마우스의 비장으로부터 더 신속하게 청소되기 때문이다. 다른 구현예에서, ADXS31-164는 이 백신의 항생제 저항성이고 더 병독성인 베전인 *Lm*-LLO-ChHer2보다 트랜스제닉 동물에서 종양 발생의 더 긴 지연을 야기한다(도 3을 참조하라). 다른 구현예에서, ADXS31-164 균주는 Her2/neu 자가-항원에 대한 내성을 약화시키고 HER2/neu 트랜스제닉 동물에서의 종양 형성을 예방할 수 있는 높은 면역원성을 가지고 있다. 다른 구현예에서, ADXS31-164는 종양내 T 조절 세포(Treg)에서의 유의한 감소를 일으킨다. 다른 구현예에서, *LmddA* 백신으로 처리된 종양에서의 Treg의 낮은 빈도는 증가된 종양내 CD8/Treg 비율이며, 이는 더 유망한 종양 미세환경이 *LmddA* 백신으로의 면역화 후 수득될 수 있음을 제안한다. 다른 구현예에서, 이 키메라 항원의 사용은 탈출 돌연변이를 야기하지 않으며, 이는 종양이 이 신규한 항원으로의 처리에 대한 치료학적으로 효과적인 반응으로부터 떨어져 돌연변이되지 않았음을 나타내는 것이다(실시예 6 참조). 다른 구현예에서, ADXS31-164로의 면역화는 뇌에서의 전이 유방암 세포주의 성장을 자연시킨다(실시예 7 참조). 다른 구현예에서, 골육종을 앓고 있으며 절단, 화학요법, ADXS31-164으로의 예방접종을 제공받은 개과 대상체는, ADXS31-164로 예방접종되지 않은 대조 대상체와 비교 시 연장된 생존률을 갖는다. (실시예 9 및 10 참조). 다른 구현예에서, 골육종을 앓고 있으며 절단, 화학요법, ADXS31-164으로의 예방접종을 제공받은 개과 대상체는, ADXS31-164로 예방접종되지 않은 대조 대상체와 비교 시 연장된 생존률을 갖는다. (실시예 9 및 10 참조).

164로 예방접종되지 않은 대조 대상체와 비교 시 감소된 전이를 보인다. (실시예 10 참조). 다른 구현예에서, 골육종을 앓고 있으며 절단, 화학요법, ADXS31-164으로의 예방접종을 제공받은 개과 대상체는, ADXS31-164로 예방접종되지 않은 대조 대상체와 비교 시 유도된 증가된 특이 T 세포 반응을 보인다. (실시예 10 참조).

[0032] 일 구현예에서, *Lm*-LL0-ChHer2 균주는 *Lm*-LL0-138이고, 플라스미드로부터 발현된 항생제 저항 유전자 및 *prfA* 유전자를 포함한다.

[0033] 일 구현예에서, 재조합 약독화, 무-항생제 리스트리아-발현 키메라 항원은 본원에서 예시된 바와 같이 암 또는 고형 종양을 예방하고 치료하는 데 유용하다. 다른 구현예에서, 종양은 HER2/neu 양성 종양이다. 다른 구현예에서, 암은 HER2/neu-발현 암이다. 다른 구현예에서, 암은 유방암, 중추신경계(CNS) 암, 두경부암, 골육종 (OSA), 개과 골육종, 유잉 육종(ES), 또는 본 분야에서 공지된 임의의 HER2/neu-발현 암이다. 다른 구현예에서, 개과 골육종은 부속지 골육종이다. 다른 구현예에서, 종양은 골육종 종양, 유방 종양, 두경부 종양, 또는 본 분야에서 공지된 임의의 다른 항원-발현 종양이다. 다른 구현예에서, 본원에서 기재된 암 또는 고형 종양은 재발 또는 전이 질병의 결과이다.

[0034] 다른 구현예에서, 키메라 HER2/neu를 발현하는 재조합 리스트리아는 고형 종양을 과발현하는 HER2/neu의 치료를 위한 치료 백신으로서 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 HER2/neu 키메라 항원은 HER2/neu-발현 종양을 치료하고 이의 탈출 돌연변이를 예방하는 데 유용하다. 다른 구현예에서, 용어 "탈출 돌연변이"는 치료에 대한 치료학적으로 유효한 반응으로부터 벗어나 돌연변이된 종양을 의미한다.

[0035] 일 구현예에서, 본원은 핵산 분자 본원에서 제공된 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하는 핵산 분자를 제공하며, 여기에서 핵산은 재조합 리스트리아 백신 균주 내에 존재한다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 핵산 분자는 재조합 리스트리아에 도착하기 위해 리스트리아를 형질전환시키는데 사용된다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 핵산은 병독성 유전자가 결여되어 있다. 다른 구현예에서, 리스트리아 계놈 내로 통합된 핵산 분자는 비-기능성 병독성 유전자를 수송한다. 다른 구현예에서, 병독성 유전자는 재조합 리스트리아의 계놈 내에서 돌연변이된다. 또 다른 구현예에서, 핵산 분자는 리스트리아 계놈 내에 존재하는 내인성 유전자를 불활성화시키기 위해 이용된다. 또 다른 구현예에서, 병독성 유전자는 *actA* 유전자이다. 다른 구현예에서, 병독성 유전자는 *prfA* 유전자이다. 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 병독성 유전자는 재조합 리스트리아 내에서 병독성과 연관된 것으로 본 분야에서 공지된 임의의 유전자일 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 본원에서 제공된 a 대사 유전자, 병독성 유전자 등을 리스트리아 균주의 염색체 내에서 결여되어 있다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 대사 유전자, 병독성 유전자 등을 리스트리아 균주의 염색체 내 및 임의의 에피솜 유전 요소 내에서 결여되어 있다. 용어 "에피솜," "에피솜의" 등은 본원에서 제공된 리스트리아의 염색체 내로 통합되지 않은 플라스미드 또는 이의 사용을 의미함이 숙련자에게 자명할 것이다. 다른 구현예에서, 용어는 본원에서 제공된 리스트리아의 염색체 내로 통합되지 않은 플라스미드 벡터를 의미한다. 다른 구현예에서, 대사 유전자, 병독성 유전자 등을 병독성 균주의 계놈 내에서 결여되어 있다. 일 구현예에서, 병독성 유전자는 염색체 내에서 돌연변이된다. 다른 구현예에서, 병독성 유전자는 염색체로부터 삭제된다.

[0037] 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 핵산 및 플라스미드는 본원에서 제공된 재조합 리스트리아에 항생제 저항을 부여하지 않는다.

[0038] 일 구현예에서, 본원에서 제공된 핵산 분자는 플라스미드를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 핵산 분자는 플라스미드이다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 플라스미드는 통합 벡터이다. 다른 구현예에서, 플라스미드는 비-통합 벡터이다. 다른 구현예에서, 플라스미드는 비-통합 벡터를 포함한다. 다른 구현예에서, 통합 벡터는 부위-특이 통합 벡터이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 핵산 분자는 본 분야에서 공지된 임의 유형의 뉴클레오티드로 구성된다.

[0039] 용어 "대사 효소"가 숙주 박테리아에 의해 요구되는 영양소의 합성에 관련된 효소를 포함할 수 있음이 숙련자에게 이해될 것이다. 다른 구현예에서, 용어는 숙주 박테리아에 의해 요구되는 영양소의 합성에 요구되는 효소를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 숙주 박테리아에 의해 사용되는 영양소의 합성에 관련된 효소를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 숙주 박테리아의 지속되는 성장을 위해 요구되는 영양소의 합성에 관련된 효소를 의미한다. 다른 구현예에서, 효소는 영양소의 합성을 위해 요구된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0040] 용어 "안정하게 유지되는"은 검출가능한 손실 없이, 10세대 동안 선별의 부재시(예를 들어, 항생제 선별)에 핵산 분자 또는 플라스미드 숙주 세포 또는 박테리아에서의 핵산 분자 또는 플라스미드의 유지를 포함할 수 있음

이 숙련자에게 이해될 것이다. 다른 구현예에서, 기간은 15세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 20세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 25세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 30세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 40세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 50세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 60세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 80세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 100세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 150세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 200세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 300세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 500세대이다. 다른 구현예에서, 기간은 세대를 초과한다. 다른 구현예에서, 핵산 분자 또는 플라스미드는 실험관내(예를 들어, 배양에서) 안정하게 유지된다. 다른 구현예에서, 핵산 분자 또는 플라스미드는 생체내에서 안정하게 유지된다. 다른 구현예에서, 핵산 분자 또는 플라스미드는 실험관내 및 생체내 둘 다에서 안정하게 유지된다.

[0041] 일 구현예에서, 본 발명은 항원을 발현하는 재조합 리스테리아 균주를 제공한다. 본 발명은 또한 HER2 키메라 단백질 또는 이의 단편에 융합된 리스테리오리신 (LLO) 단백질 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드, 이를 포함하는 백신 및 면역원성 조성물, 및 이를 포함하는, 항-HER2 면역 반응을 유도하는 방법 및 HER2-발현 종양에 대항하여 치료하고 예방접종하는 방법을 제공한다.

[0042] 다른 구현예에서, 본 발명의 재조합 리스테리아 균주는 동물 숙주를 통해 통과된다(passaged). 다른 구현예에서, 패시징(passaging)은 백신 백터로서 균주의 효율을 최대화한다. 다른 구현예에서, 패시징은 리스테리아 균주의 면역원성을 안정화시킨다. 다른 구현예에서, 패시징은 리스테리아 균주의 병독성을 안정화시킨다. 다른 구현예에서, 패시징은 리스테리아 균주의 면역원성을 증가시킨다. 다른 구현예에서, 패시징은 리스테리아 균주의 병독성을 증가시킨다. 다른 구현예에서, 패시징은 리스테리아 균주의 불안정한 서브-균주를 제거한다. 다른 구현예에서, 패시징은 리스테리아 균주의 불안정한 서브-균주의 유병률을 감소시킨다. 다른 구현예에서, 리스테리아 균주는 항원-함유 재조합 웨პ티드를 인코딩하는 유전자의 계놈 삽입을 함유한다. 다른 구현예에서, 리스테리아 균주 항원-함유 재조합 웨პ티드를 인코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 수송한다. 다른 구현예에서, 패시징은 본 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 수행된다.

[0043] 일 구현예에서, 본원에서 제공된 재조합 폴리펩티드는 본원에서 제공된 융합 단백질을 포함한다. 다른 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 융합 단백질이다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 융합 단백질은 키메라 HER2 항원 및 하기로 구성된 균으로부터 선택된 추가 폴리펩티드를 포함한다: a) 비-용혈 LLO 단백질 또는 N-말단 단편, b) PEST 서열, 또는 c) ActA 단편, 및 추가로 여기에서 상기 추가 폴리펩티드는 Her2/neu 키메라 항원에 융합된다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 기능성이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드의 단편은 면역원성이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 면역원성이다.

[0044] 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 융합 단백질은 본원에서 제공된 HER2/neu 키메라 항원에 융합된 비-용혈 LLO 단백질 또는 N-말단 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질은 리스테리아 생물로부터의 ActA 서열을 포함한다. ActA 단백질 및 이의 단편은 LLO에 대해 유사한 방식으로 항원 제시 및 면역성을 입증한다.

[0045] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질은 리스테리아 생물로부터의 말단이 절단된 ActA-서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 말단이 절단된 ActA는, 이의 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 일련 번호 제7,655,238호에 기재된 바와 같이 야생형 ActA 단백질의 처음 390개 아미노산으로 구성된다. 다른 구현예에서, 말단이 절단된 ActA는 ActA-N100 또는 이의 개질된 버전(ActA-N100*으로서 언급됨)이며, 여기에서 미국 특허 공개 일련 번호 제2014/0186387호에 기재된 바와 같이 PEST 모티프가 삭제되고 비보존성 QDNKR 치환을 함유한다. ActA 단백질 및 이의 단편은 LLO에 대해 유사한 방식으로 항원 제시 및 면역성을 입증한다.

[0046] 본 발명의 방법 및 조성물의 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 융합 단백질은 Her2/neu 항원 및 추가 폴리펩티드를 포함한다. 일 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 비-용혈 LLO 단백질 또는 이의 단편(본원의 실시예)이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 PEST 서열이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 ActA 단백질 또는 이의 단편이다. ActA 단백질 및 이의 단편은 LLO에 대해 유사한 방식으로 항원 제시 및 면역성을 입증한다.

[0047] 본 발명의 방법 및 조성물의 추가 폴리펩티드는 다른 구현예에서, 리스테리오리신(LLO) 웨პ티드이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 ActA 웨პ티드이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 PEST 서열 웨პ티드이다. 다른 구현예에서, 추가 폴리펩티드는 항원 웨პ티드의 면역원성을 증강시킬 수 있는 임의의 다른 웨პ티드이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0048] Her2/neu 키메라 항원을 포함하는 융합 단백질은 임의의 적합한 방법, 예컨대 예를 들어, 적절한 서열의 클로닝 또는 제한 또는 하기 논의된 방법에 의한 직접 화학 합성에 의해 제조될 수 있다. 그렇지 않으면, 서브서열이

클로닝될 수 있으며 적절한 서브 서열이 적절한 제한 효소를 사용하여 절단될 수 있다. 그런 다음, 단편은 원하는 DNA 서열을 제조하도록 연결될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에서 제공된 항원을 인코딩하는 DNA는 DNA 증폭 방법, 예를 들어 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 제조될 수 있다. 우선, 새로운 말단 중 어느 한 면에서 자생 DNA의 세그먼트가 별도로 증폭된다. 증폭된 서열의 5' 말단은 웨티드 링커를 인코딩하고, 다른 증폭된 서열의 3' 말단 또한 웨티드 링커를 인코딩한다. 제1 단편의 5' 말단이 제2 단편의 3' 말단에 상보적이므로, 2 개의 단편(예를 들어, LMP 아가로스 상에서의 부분적 정제 후)은 3차 PCR 반응에서 중복 주형으로서 사용될 수 있다. 증폭된 서열은 코돈, 오프닝 부위의 카르복실 측면에서의 세그먼트(현재 아미노 서열을 형성함), 링커, 및 오프닝 부위의 아미노 측면에서의 서열(현재 카르복실 서열을 형성함)을 포함할 것이다. 다른 구현예에서, 항원은 플라스미드 내로 연결된다. 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

- [0049] 본 발명의 결과는 본 발명의 조성물의 투여가 종양 세포를 인식하고 죽이는 항원-특이 T 세포(예를 들어, 세포 독성 T 세포)의 형성을 유도하기 위한 유용성을 가짐을 입증한다(본원의 실시예).
- [0050] 일 구현예에서, 본 발명은 HER2 키메라 단백질에 융합되거나 이의 단편에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드를 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 HER2 키메라 단백질에 융합되거나 이의 단편에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 단편으로 구성된 재조합 폴리펩티드를 제공한다.
- [0051] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 HER2 키메라 단백질은 인간 HER2 키메라 단백질이다. 다른 구현 예에서, Her2 키메라 단백질은 마우스 HER2 키메라 단백질이다. 다른 구현예에서, Her2 키메라 단백질은 랫 HER2 키메라 단백질이다. 다른 구현예에서, Her2 키메라 단백질은 영장류 HER2 키메라 단백질이다. 다른 구현예에서, Her2 키메라 단백질은 개과 HER2 키메라 단백질이다. 다른 구현예에서, Her-2 단백질은 인간 또는 본 분야에서 공지된 임의의 다른 동물종의 HER2 키메라 단백질 또는 이의 조합이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.
- [0052] 다른 구현예에서, Her-2 단백질은 "HER2/neu," "Erbb2," "v-erb-b2," "c-erb-b2," "neu," 또는 "cNeu."로서 언급되는 단백질이다. 다른 구현예에서, HER2/neu는 또한 "Her-2," "Her-2 단백질," "HER2 단백질," 또는 "HER 2"로서 언급될 수 있다.
- [0053] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 HER2/neu 키메라 단백질은 종양 유전자의 MHC-클래스 I 에피토프의 클로스터를 보이는 HER2/neu 항원의 2개의 세포외 단편 및 1개의 세포내 단편을 보유하며, 다른 구현예에서, 키메라 단백질은, Her2/neu 항원의 3개의 H2Dq 및 적어도 17개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 보유한다(단편 EC1, EC2, 및 IC1)(도 1a 참조). 다른 구현예에서, 키메라 단백질은 적어도 13개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 보유한다(단편 EC2 and IC1). 다른 구현예에서, 키메라 단백질은 적어도 14개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 보유한다(단편 EC1 and IC1). 다른 구현예에서, 키메라 단백질은 적어도 9개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 보유한다(단편 EC1 and IC2). 다른 구현예에서, Her2/neu 키메라 단백질은 비-용혈 리스테리오리신 0(LLO)에 융합된다. 다른 구현예에서, Her2/neu 키메라 단백질은 말단이 절단된 리스테리오리신 0 (tLLO)에 융합된다. 다른 구현예에서, Her2/neu 키메라 단백질은 리스테리아-모노사이토게네스 리스테리오리신 0 (LLO) 단백질의 처음 441개 아미노산에 융합되며 리스테리아 모노사이토게네스 약독화 영양요구성 균주 *LmddA*에 의해 발현되고 분비된다. 다른 구현예에서, 키메라 HER2/neu 항원/LLO 융합 단백질을 발현하는 본원에서 제공되는 약독화 영양요구성 균주로부터의 융합 단백질 tLLO-ChHer2의 발현 및 분비는 8시간의 실험관내 성장 후 TCA 침전 세포 배양 상청액 내의 *Lmr*-LLO-ChHer2에서와 비슷하다(도 1b 참조).
- [0054] 일 구현예에서, CTL 활성은 처리되지 않은 동물 또는 비관련 리스테리아 백신이 주입된 마우스에서 검출되지 않는다(도 2a 참조). 반면에 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 약독화 영양요구성 균주(ADX31-164)는 야생형 FVB/N 마우스로부터의 비장세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 자극할 수 있다(도 2b).
- [0055] 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물의 대사 효소는 아미노산 대사 효소이고, 다른 구현예에서, 대사 효소는 알라닌 라세미화 효소이다. 다른 구현예에서, 대사 효소는 D-아미노산 트랜스페라아제 효소이다. 다른 구현예에서, 대사 효소는 재조합 리스테리아 균주에서 세포벽 합성에 사용되는 아미노산의 합성을 촉매하며, 다른 구현예에서, 대사 효소는 알라닌 라세미화 효소이다.
- [0056] 다른 구현예에서, 대사 효소를 인코딩하는 유전자는 리스테리아 p60 프로모터의 조절 하에서 발현된다. 다른 구현예에서, in1A(인터날린을 인코딩함) 프로모터가 사용된다. 다른 구현예에서, hly 프로모터가 사용된다. 다른 구현예에서, ActA 프로모터가 사용된다. 다른 구현예에서, 인테그라아제 유전자는 임의의 다른 그램 양성 프로모터의 조절 하에서 발현된다. 다른 구현예에서, 대사 효소를 인코딩하는 유전자는 리스테리아에서 기능하는 임

의의 다른 프로모터의 조절 하에서 발현된다. 다른 프로모터 또는 다이스트론성 발현 카세트가 유전자의 발현을 구동하기 위해 사용될 수 있음을 숙련자가 인정할 것이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0057] 다른 구현예에서, HER2/neu 키메라 단백질은 서열번호: 1에서 제시된 하기 핵산 서열에 의해 인코딩된다

[0058] ttttggcacagtctacaagggcatctggatccctgatgggagaatgtgaaaattccagtggccatcaaagtgttgaggaaaacacatccccaaagccaa caaagaaaatcttagacgaagcatacgtatggctgtggctcccatatgtctccgcctctggcatgcctgacatccacgggtcagctggtgac acagctatgcctatggctgccttagactaa(서열번호: 1).

[0059] 다른 구현예에서, Her2/neu 키메라 단백질은 서열번호: 2의 서열을 포함한다:

[0060] E T H L D M L R H L Y Q G C Q V V Q G N L E L T Y L P T N A S L S F
L Q D I Q E V Q G Y V L I A H N Q V R Q V P L Q R L R I V R G T Q L
F E D N Y A L A V L D N G D P L N N T T P V T G A S P G G L R E L Q
L R S L T E I L K G G V L I Q R N P Q L C Y Q D T I L W K N I Q E F A
G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A P L Q P E Q L Q V F
E T L E E I T G Y L Y I S A W P D S L P D L S V F Q N L Q V I R G R I
L H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S L R E L G S G L A L I H H
N T H L C F V H T V P W D Q L F R N P H Q A L L H T A N R P E D E C
V G E G L A C H Q L C A R G Q Q K I R K Y T M R R L L Q E T E L V E
P L T P S G A M P N Q A Q M R I L K E T E L R K V K V L G S G A F G
T V Y K G I W I P D G E N V K I P V A I K V L R E N T S P K A N K E I L
D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L G I C L T S T V Q L V T Q L V T Q L V T Q L M P Y G
C L L D(서열번호: 2).

[0061] 하기 표 1은 인간 및 개과 동물 Her-2 EC 및 IC 단편 각각의 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율(%)을 보인다.

Table 1.

인간 개과 동물	SLSFLQD1QEVQGYVLIAHNQVRQVPLQLR1IVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTPV 60 SLSFLQD1QEVQGYVLIAHNQVRQVPLQLR1IVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLLEGGIPA 60	
인간 개과 동물	TGASPGQLRELQLRSLTEILKGGVLIQQRNPQLCYQDQTILWKD1FHKNNQQLALTLLIDTNRS 120 PGAAFGQLRELQLRSLTEILKGGVLIQQRSPOLCHQDQTILWKD1FHKNNQQLALTLLIDTNRS 120	
인간 개과 동물	RACHPCSPMCK 131 서열번호: 69 RACPPCSPACK 131 서열번호: 70	89% 동일성 EC1
인간 개과 동물	TAPLQPEQVLFETLEEITGYLYISAMPDSLPDSVQFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLOGL 60 TAPLQPEQVLFETLEEITGYLYISAMPDSLPDSVQFQNLQVIRGRVLHDGAYSLTLOGL 60	
인간 개과 동물	GISWLGLRSLRELGS 75 서열번호: 71 GISWLGLRSLRELGS 75 서열번호: 72	93% 동일성 EC2
인간 개과 동물	NQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGWIWPDGENVKIPVAIKVLRNTSPKANKEI 60 NQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGWIWPDGENVKIPVAIKVLRNTSPKANKEI 60	
인간 개과 동물	LDEAYVMAGVCSPIVSRLLGICLTSVQQLVQQLMPYGCCLLDHVRRENRRGRLGSQDLLNWCH 120 LDEAYVMAGVCSPIVSRLLGICLTSVQQLVQQLMPYGCCLLDHVRRENRRGRLGSQDLLNWCH 120	
인간 개과 동물	QIAKGMISYLED 131 서열번호: 73 QIAKGMISYLED 131 서열번호: 74	98% 동일성 IC1

[0063] [0064] 다른 구현예에서, 인간 HER2/ EC1 단편을 인코딩하는 아미노산 서열은 하기에 제시된다(서열번호: 69): SLSFLQD1QEVQGYVLIAHNQVRQVPLQLR1IVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVGTASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDQTILWKD1FHKNNQQLALTLLIDTNRSRACHPCSPMCK (서열번호: 69).

[0065] 다른 구현예에서, 개과 her2/neu EC1 단편을 인코딩하는 아미노산 서열은 하기에 제시된다 (서열번호: 70): SLSFLQD1QEVQGYVLIHSQVRQIPLQRLR1IVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLEGGIPAPGAAPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRSPQLCHQDQTILWKD1FHKNNQQLALTLLIDTNRSRACPPCSPACK (서열번호: 70).

[0066] 다른 구현예에서, 인간 her2/neu EC2 단편을 인코딩하는 아미노산 서열은 하기에 제시된다 (서열번호: 71): TAPLQPEQVLFETLEEITGYLYISAWPDSLPDSVQFQNLQVIRGRILHNGAYSLTQQLGISMWLGLRSLRELGS (서열번호: 71).

[0067] 다른 구현예에서, 개과 her2/neu EC2 단편을 인코딩하는 아미노산 서열은 하기에 제시된다 (서열번호: 72): TAPLQPEQVLFETLEEITGYLYISAWPDSLPNLNSVQNLR1VGRVLHDGAYSLTQQLGISMWLGLRSLRELGS (서열번호: 72).

TGTCAGAATTTCACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTTGGGCCATCCAGCCCCATGGACAGTACCTCTACCGTTC
CACTGCTGGAA(서열번호: 48).

[0080] 일 구현예에서, 인간-HER2/neu 유전자의 핵산 서열은 서열번호: 49를 포함한다:

CCCCAGCAGGGCTCTTCTGTCCAGACCCCTGCCCCGGCGCTGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACAGGAGTGGCGTGGGACCTG
ACACTAGGGCTGGAGGCCCTCTGAAGAGGAGGCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCGAAGGGCTGGCTCGATGTATTGATGGTACCTGGGAATGGGG
GCAGCCAAGGGCTGCAAAGCCTCCCCACACATGACCCAGCCCTACAGCGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTTGAGACTGATGGCTAC
GTTGCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCAGATGTCGGCCAGGCCCCCTCGCCCCGAGAGGGCCCTTGCGCTGCCGA
CCTGCTGGTGCCTCTGGAAAGGGCAAGACTCTCTCCCCAGGGAAGAATGGGGCTGTCAGAACAGCTTTGCTTGGGGTGCCTGGAGAACCCCGAG
TACTTGACACCCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCCCTCCTGCCTCAGCCCAGCCTCGACAACCTTACTGGGACAGGACCCACAGAG
CGGGGGCTCACCCAGCACCTCAAAGGGACACCTACGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGCTGGACGTGCCAGTGTGAACCAGAACGGCCAAGTCGCAG
AAGCCCTGA(서열번호: 49).

[0082] 다른 구현예에서, 키메라 내로 시행되는 인간 HER2/neu EC1 단편을 인코딩하는 핵산 서열은 인간 EC1 영역의 120-510 bp로부터 걸쳐 이어지며 서열번호: 50을 포함한다:

GAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTTACCAAGGGTGCAGGGAACTGGAAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGCTCTT
CTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTACAACCAAGTGAGGCAGGTCCACTGCAGAGGCTCGGATTGTGCAGGGACCCAGCTC
TTTGAGGACAACATGCCCTGGCGTGCTAGACAATGGAGACCCCGTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGCCTCCCCAGGAGGCTGCCGGAGCTGCAG
CTTCGAAGCCTCACAGAGATCTGAAAGGAGGGTCTGATCCAGCGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTGTGGAAG(서열번호: 50).

[0084] 일 구현예에서, 완전한 EC1 인간 HER2/neu 단편은 (인간 HER2/neu 유전자의 58-979 bp)로부터 걸쳐 이어지며 서
열번호: 54를 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

GCCCGAGCACCAAGTGTGACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCCACTTGACATGCCAGCTCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTTACCAAGGGCTGC
CAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTCACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGT
ACAACCAAGTGAGGCAGGTCCACTGCAGAGGCTCGGGATTGTGCAGGGACCCAGCTTTGAGGACAACATGCCCTGGCGTGCTAGACAATGGAGAC
CCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCCAGGAGCTGCAGCTCGAAGCCTCACAGAGATCTGAAAGGAGGGTCTGATC
CAGCGGAACCCCGACTCTGCTACAGGACACGATTGTGGAAGGACATCTTACAAGAACACAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTC
CGGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGAGAGAGTCTGAGGATTGTGAGGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGC
TGTGCCCGCTGCAAGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGCTGCCAGCTGGCTGCCAGGGCCCAAGCAGCTTGACTGCCCTGGCTGCC
TTCAACCACAGTGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACCTACAACAGACACGTTGAGTCCATGCCAACCCGAGGGCGGTATACATT
GGCGCCAGCTGTGACTGCCCTGCTTACAACACTACGGACGTGGGATCTGCACCCCTGCTGCCAGCTGTGCGCCAGAG(서열번호: 54).

[0086] 다른 구현예에서, 키메라 내로 시행되는 인간 HER2/neu EC2 단편을 인코딩하는 핵산 서열은 인간 HER2/neu EC2
단편의 1077-1554 bp로부터 걸쳐 이어지며 50 bp 연장을 포함하고, 서열번호: 51을 포함한다:

AATATCCAGGAGTTGCTGGCTGAAGAACATTTGGGAGGCCCTGGCATTTCTGCCGGAGAGCTTGATGGGGACCCAGCCTCAACACTGCCCGCTCCAG
CCAGAGCAGCTCAAGTGTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGACGCCCTGCCGACCTCAGCGTCTCCAGAAC
CTGCAAGTAATCCGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCTACTCGCTGACCCCTGCAAGGGCTGGCATCAGCTGGCTGGGCTGCCACTGAGGGAAC
GGCAGTGGACTGCCCTCATCCACATAACACCCACCTCTGCTCGTGCACACGGTGCCTGGACCAGCTTTGCAAGCCAGCTGCCAACAGCTGCTCC
ACTGCCAACCGGCCAGAGGACAGTGTGAGGGCTGGCCTGCCACAGCTGTGCGCCAGGG(서열번호: 51).

[0088] 일 구현예에서, 완전한 EC2 인간 HER2/neu 단편은 인간 HER2/neu 유전자의 907-1504 bp로부터 걸쳐 이어지며 서
열번호: 55)를 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

TACCTTCTACGGACGTGGATCCTGCACCCCTGCTGCCCTGACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAG
CCCTGTGCCAGTGTGCTATGGCTGGGATGGAGACTTGCAGAGAGGTGAGGGCAGTTACAGTGCACATCCAGGAGTTGCTGGCTGCAAGAACAT
TTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGAGCTTGATGGGGACCCAGGCCCAACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCAAGTGTTGAGACTCTGGAA
GAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCGGACAGCCTGCCAGCTCAGCGTCTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGACGAATTCTGCACA
GGCGCCTACTCGCTGCCCTGCAAGGGCTGGCATCAGCTGGCTGGGCTGCCACTGAGGAACTGGGAGTGGACTGCCCTCATCCACCATAACACC
CACCTCTGCTCGTGCACACGGTGCCTGGACCAGCTTCCGAAACCCGACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAG(서열번호: 55).

[0090] 다른 구현예에서, 키메라 내로 시행되는 인간 HER2/neu IC1 단편을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 52를 포
함한다:

- [0091] CAGCAGAAGATCCGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAGCGATGCCAACCAGGCCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGGTGAAGGTGCTGGATCTGGCGTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATCCAGTGGCCATCAAAGTGTGAGGGAAAACACATCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTAGACGAAGCATACGTGATGGCTGGTGTGGCTCCCCATATGTCTCCCGCCTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTACACAGCTATGCCCTATGGCTGCCTTAGACT(서열번호:52).
- [0092] 다른 구현예에서, 완전한 인간 HER2/neu IC1 단편을 인코딩하는 핵산 서열은 인간 HER2/neu 유전자의 2034-3243 으로부터 걸쳐 이어지며 서열번호: 56)을 포함한다:
- [0093] TGAGGAGTATCTGGTACCCCAGCAGGGCTTCTGTCCAGACCCCTGCCCGGGCGCTGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATACCAGGAGTGGCGGTGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCGAAGGGGCT(서열번호:56).
- [0094] 본원에서 제공되는 방법 및 조성물에서 사용되는 LLO는, 일 구현예에서, 리스트리아 LLO이다. 일 구현예에서, LLO가 유래되는 리스트리아는 리스트리아 모노사이토게네스(LM)이다. 다른 구현예에서, 리스트리아는 리스트리아 이바노비이다. 다른 구현예에서, 리스트리아는 리스트리아 웰쉬메리이다. 다른 구현예에서, 리스트리아는 리스트리아 세엘리게리이다. 다른 구현예에서, LLO 단백질은 비-리스테리아 LLO 단백질이다. 다른 구현예에서, LLO 단백질은 합성 LLO 단백질이다. 다른 구현예에서 이는 재조합 LLO 단백질이다.
- [0095] 일 구현예에서, LLO 단백질은 서열번호: 3을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다:
- [0096] cttcaaagccgttaattacggaggttccgcaaaagatgaagttcaatcatcgacggcaacctggagacttacgcataatttgaaaaaaggcgctacttttaatcgagaaacaccaggagtccattgttatacaacaaacttctaaagacaatgaattagctttttaaaaaacaactcagaatataattgaaacatttcaaaaagcttatacagatggaaaaatttaacatcgactctggaggatacgttgctcaattcaacatttttggatgaagtaattatgat(서열번호: 3).
- [0097] 다른 구현예에서, LLO 단백질은 서열 서열번호: 4를 포함한다:
- [0098]
- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M | K | K | I | M | L | V | F | I | T | L | I | L | V | S | L | P | I | A | Q | Q | T | E | A | K | D | A | S | A | F | N | K | E | N |
| S | I | S | S | M | A | P | P | A | S | P | P | A | S | P | K | T | P | I | E | K | K | H | A | D | E | I | D | K | Y | I | Q | G | L |
| D | Y | N | K | N | N | V | L | V | Y | H | G | D | A | V | T | N | V | P | P | R | K | G | Y | K | D | G | N | E | Y | I | V | V | E |
| K | K | K | K | S | I | N | Q | N | N | A | D | I | Q | V | V | N | A | I | S | S | L | T | Y | P | G | A | L | V | K | A | N | S | E |
| L | V | E | N | Q | P | D | V | L | P | V | K | R | D | S | L | T | L | S | I | D | L | P | G | M | T | N | Q | D | N | K | I | V | V |
| K | N | A | T | K | S | N | V | N | N | A | V | N | T | L | V | E | R | W | N | E | K | Y | A | Q | A | Y | P | N | V | S | A | K | I |
| D | Y | D | D | E | M | A | Y | S | E | S | Q | L | I | A | K | F | G | T | A | F | K | A | V | N | N | S | L | N | V | N | F | G | A |
| I | S | E | G | K | M | Q | E | E | V | I | S | F | K | Q | I | Y | Y | N | V | N | V | N | E | P | T | R | P | S | R | F | F | G | K |
| A | V | T | K | E | Q | L | Q | A | L | G | V | N | A | E | N | P | P | A | Y | I | S | S | V | A | Y | G | R | Q | V | Y | L | K | L |
| S | T | N | S | H | S | T | K | V | K | A | A | F | D | A | A | V | S | G | K | S | V | S | G | D | V | E | L | T | N | I | I | K | N |
| S | S | F | K | A | V | I | Y | G | G | S | A | K | D | E | V | Q | I | I | D | G | N | L | G | D | L | R | D | I | L | K | K | G | A |
| T | F | N | R | E | T | P | G | V | P | I | A | Y | T | T | N | F | L | K | D | N | E | L | A | V | I | K | N | N | S | E | Y | I | E |
| T | T | S | K | A | Y | T | D | G | K | I | N | I | D | H | S | G | G | Y | V | A | Q | F | N | I | S | W | D | E | V | N | Y | D | |
- (서열번호: 4)
- [0099] 이 서열에 상응하는 프로단백질의 처음 25개 아미노산은 서열 신호 서열이며 박테리아에 의해 분비될 때 LLO로부터 절단된다. 그러므로, 이 구현예에서, 전장 활성 LLO 단백질은 504 잔기 길이이다. 다른 구현예에서, LLO 단백질은 GenBank 수탁 번호 DQ054588, DQ054589, AY878649, U25452, 또는 U25452에 제시된 서열을 갖는다. 다른 구현예에서, LLO 단백질은 LLO 단백질의 변이체이다. 다른 구현예에서, LLO 단백질은 LLO 단백질의 상동체이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.
- [0100] 다른 구현예에서, "말단이 절단된 LLO" 또는 "tLLO"는 PEST 도메인을 포함하는 LLO의 단편을 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 아미노 말단에서 활성 도메인을 함유하지 않고 시스틴 484를 포함하지 않는 LLO 단편을 의미한다. 다른 구현예에서, LLO 단편은 PEST 서열로 이루어진다. 다른 구현예에서, LLO 단편은 PEST 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, LLO 단편은 529개 아미노산 전장 LLO 단백질의 약 처음 400 내지 441개 아미노산으로 이루어진다. 다른 구현예에서, LLO 단편은 LLO 단백질의 비-용혈 형태이다.
- [0101] 본 발명의 방법 및 조성물의 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 재조합 폴리펩티드는 키메라 HER2/neu 항원 및 추가 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이고, 다른 구현예에서, 융합 단백질은 그 중에서도, LLO 단편을 포함하고, 일 구현예에서 LLO 단편은 LM 비-용혈 LLO 단백질이거나, 다른

구현예에서, 말단이 절단된 LL0이다(본원의 실시예).

- [0102] 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-25로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-50으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-75로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-100으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-125로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-150으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1175로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-200으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-225로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-250으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-275로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-300으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-325로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-350으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-375로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-400으로 이루어진다. 일 구현예에서, LL0 단편은 약 잔기 1-425로 이루어진다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.
- [0103] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질로부터 또는 다른 생물, 예를 들어, 원핵 생물로부터의 PEST 서열을 포함한다.
- [0104] PEST 아미노산 (AA) 서열은, 다른 구현예에서, 서열번호: 5 내지 9로부터 선택된 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 리스테리아 모노사이토케네스 (*Lm*) ActA 단백질로부터의 PEST 서열이다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 KTEEQPSEVTGPR(서열번호: 5), KASVDTSEGDLSSMQSADESTPQPLK(서열번호: 6), KNEEVNASDFPPPTDEELR(서열번호: 7), 또는 RGGIPTSEEFSSLNSGDFTDDENSEETEEIDR(서열번호: 8)을 포함한다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 스트렙토코쿠스 속의 스트렙토리신 O 단백질로부터 유래한다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 스트렙토코쿠스 피오케네스 스트렙토리신 O, 예를 들어, AA 35-51에서 KQNTASTETTTNEQPK(서열번호: 9)로부터 유래한다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 스트렙토코쿠스 에퀴시밀리스 스트렙토리신 O, 예를 들어, AA 38-54에서 KQNTANTETTTNEQPK(서열번호: 10)로부터 유래한다. 다른 구현예에서, PEST-유사 서열은 원핵 생물로부터 유래된 다른 PEST AA 서열이다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 본 분야에서 공지된 임의의 다른 PEST 서열이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.
- [0105] *Lm*의 PEST 서열에 대한 항원의 융합은 항원의 세포 매개 면역성 및 항-종양 면역성을 증강시켰다. 그러므로, 다른 원핵 생물로부터 유래된 다른 PEST 서열에 대한 항원의 융합은 또한 항원의 면역원성을 증가시킬 것이다. 다른 원핵 생물의 PEST 서열은 *Lm*에 대해 예를 들어 Rechsteiner 및 Rogers 등의 문헌(1996, Trends Biochem. Sci. 21:267-271)에 의해 기재된 바와 같은 방법에 따라 확인될 수 있다. 그렇지 않으면, 다른 원핵 생물로부터의 PEST AA 서열 또한 이 방법에 근거하여 확인될 수 있다. PEST AA 서열이 발생할 것으로 예상되는 다른 원핵 생물은 다른 리스티리아 종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 구현예에서, PEST 서열은 항원성 단백질 내에 끼워진다. 그러므로, 다른 구현예에서, "융합"은 항원 및 항원의 일 말단에 연결되거나 항원 내부에 끼워진 PEST 아미노산 서열 둘 다를 포함하는 항원성 단백질을 의미한다.
- [0106] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 포함하는 백신을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드로 이루어진 백신을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드로 이루어진 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 조성물은 면역원성 조성물이다.
- [0107] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에서 뉴클레오티드 분자를 포함하는 백신을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에서 뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0108] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0109] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 뉴클로오티드 분자에 의해 인코딩되는 재조합 폴리펩티드를 제공한다.
- [0110] 다른 구현예에서, 본원에서 발명의 뉴클레오티드 분자 또는 본 재조합 폴리펩티드를 포함하는 백신을 제공한다.
- [0111] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 뉴클레오티드 분자 또는 재조합 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0112] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 뉴클레오티드 분자 또는 재조합 폴리펩티드를 포함하는 백터를 제공한다.
- [0113] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 뉴클레오티드 분자를 포함하는 리스테리아의 재조합 형태를 제공한다.

- [0114] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 리스테리아의 재조합 형태를 포함하는 백신을 제공한다.
- [0115] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 리스테리아의 재조합 형태를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0116] 다른 구현예에서, 본원에서 본 발명의 리스테리아의 재조합 형태의 배양을 제공한다.
- [0117] 일 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 백신 또는 조성물은 본원에서 기재된 바와 같은 임의의 형태 또는 구현예에서 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명에서 사용하기 위한 백신 또는 조성물은 본원에서 기재된 바와 같은 임의의 형태 또는 구현예에서 본 발명의 재조합 리스테리아 모노사이토케네스로 이루어진다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 백신 또는 조성물은 필수적으로 본원에서 기재된 바와 같은 임의의 형태 또는 구현예에서 본 발명의 재조합 리스테리아 모노사이토케네스로 이루어진다.
- [0118] 일 구현예에서, 용어 "포함하는"은 본 분야에서 공지될 수 있는 다른 백신, 조성물 또는 치료를 포함할 뿐만 아니라 백신 또는 조성물에서 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 포함하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, 용어 "필수적으로 이루어진"은 기능성 성분이 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 의미하나, 백신의 치료학적 효과와 직접적으로 관련되지 않으며 예를 들어, 재조합 리스테리아 모노사이토케네스의 효과를 용이하게 할 수 있는 성분을 의미할 수 있는(예를 들어, 안정화, 방부 등) 백신 또는 조성물의 다른 성분이 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 용어 "이루어진"은 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 함유하는 백신을 의미한다.
- [0119] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기재된 바와 같은 임의의 형태 또는 구현예에서 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기재된 바와 같은 임의의 형태 또는 구현예에서 본 발명의 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 투여하는 단계로 이루어진다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기재된 바와 같은 임의의 형태 또는 구현예에서 본 발명의 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 투여하는 단계가 필수적으로 이루어진다. 일 구현예에서, 용어 "포함하는"은 본 분야에서 공지될 수 있는 다른 방법 또는 치료를 포함할 뿐만 아니라 방법에서 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 투여하는 단계를 포함하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, 용어 "필수적으로 이루어진"은 기능성 성분이 재조합 리스테리아 모노사이토케네스의 투여인 방법을 의미하나, 백신의 치료학적 효과와 직접적으로 관련되지 않으며 예를 들어, 재조합 리스테리아 모노사이토케네스의 효과를 용이하게 하는 단계를 의미할 수 있는 방법의 다른 단계가 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 용어 "이루어진"은 추가 단계 없이 재조합 리스테리아 모노사이토케네스를 투여하는 방법을 의미한다.
- [0120] 다른 구현예에서, 본 발명의 리스테리아의 방법 및 조성물은 리스테리아 모노사이토케네스이다. 다른 구현예에서, 리스테리아는 리스테리아 이바노비이다. 다른 구현예에서, 리스테리아는 리스테리아 웰쉬메리이다. 다른 구현예에서, 리스테리아는 리스테리아 세엘리게리이다. 각 유형의 리스테리아는 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.
- [0121] 일 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 리스테리아 균주는 ADXS31-164 균주이다. 다른 구현예에서, ADXS31-164는 야생형 FVB/N 마우스로부터의 비장세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 자극한다. 또한, 본원에서 존재하는 데이터는 ADXS31-164가 표적 항원의 상이한 도메인에 위치한 인간 에피토프에 대한 항-HER2/neu 특이 면역 반응을 유발할 수 있음을 보인다.
- [0122] 다른 구현예에서, 본 발명은 HER2 키메라 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드 분자를 포함하는 리스테리아의 재조합 형태를 제공한다.
- [0123] 일 구현예에서, 본 발명은 HER2 키메라 단백질에 융합되거나 이의 단편에 융합되는 LLO 단백질의 N-말단 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드를 대상체에 투여하여 대상체에, 항-HER2 면역 반응을 유도하는 것을 포함하는, 대상체에서 항-HER2 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0124] 일 구현예에서, 융합 단백질의 2개 분자(LLO, ActA 단편 또는 PEST 서열 및 항원)는 직접적으로 연결된다. 다른 구현예에서, 2개 분자는 하나 이상의 아미노산으로 이루어진, 짧은 스페이서 펩티드에 의해 연결된다. 일 구현예에서, 스페이서는 단백질에 연결하거나 이를 사이의 일부 최소 거리를 또는 다른 공간적 관계를 보전하는 것 이외에 다른 특정 생물학적 활성을 갖지 않는다. 다른 구현예에서, 스페이서의 구성요소 아미노산은 폴딩, 네트 변화, 또는 소수성과 같은 분자의 일부 특성에 영향을 주기 위해 선택된다. 다른 구현예에서, 단백질의 2개 분자(LLO 단편 및 항원)는 별도로 합성되거나 융합되지 않는다. 다른 구현예에서, 단백질의 2개 분자는 동일 핵산으로부터 별도로 합성된다. 또 다른 구현예에서, 2개 분자는 별개의 핵산으로부터 개별적으로 합성된다. 각 가

능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0125] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 또한 신호 펩티드 또는 서열을 인코딩한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 융합 단백질은 LLO로부터의 LLO 신호 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 이종 항원은 리스테리아 신호 서열과 같은 신호 서열, 예를 들어, 용혈소 신호 서열 또는 actA 신호 서열의 사용을 통해 발현될 수 있다. 그렇지 않으면, 예를 들어, 외부 유전자가 융합 단백질의 생성 없이 *L. 모노사이토게네스* 프로모터로부터 다운스트림 발현될 수 있다. 다른 구현예에서, 신호 펩티드는 박테리아성이다(리스테리아 또는 비-리스테리아). 일 구현예에서, 신호 펩티드는 박테리아 고유의 것이다. 다른 구현예에서, 신호 펩티드는 박테리아에 이질적인 것이다. 다른 구현예에서, 신호 펩티드는 secA1 신호 펩티드와 같은 리스테리아 모노사이토게네스로부터의 신호 펩티드이다. 다른 구현예에서, 신호 펩티드는 락토코쿠스 락티스로부터의 Usp45 신호 펩티드, 또는 바실러스 안트라시스로부터의 보호 항원 신호 펩티드이다. 다른 구현예에서, 신호 펩티드는 리스테리아 모노사이토게네스로부터의 p60 신호 펩티드와 같은 secA2 신호 펩티드이다. 게다가, 재조합 핵산 분자는 p60, 또는 이의 단편을 인코딩하는 제3 폴리펩티드를 임의로 포함한다. 다른 구현예에서, 신호 펩티드는 Tat 신호 펩티드, 예컨대 *B. 서브틸리스*Tat 신호 펩티드이다(예를 들어, PhoD). 일 구현예에서, 신호 펩티드는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 동일한 전사 리딩 프레임 내에 있다.

[0126] 다른 구현예에서, 본원에서 N-말단 단편 단백질 HER2 키메라 단백질에 융합되거나 이의 단편에 융합되는 LLO 단백질의 N-말단 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 뉴클레오티드를 대상체에게 투여하여 대상체에서 항-HER2 면역 반응을 유도하는 것을 포함하는, 대상체에서 항-HER2 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0127] 일 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2/neu-발현 종양에 대한 증강된 면역 반응을 유발하는 방법을 제공하며, 다른 구현예에서 방법은 본원에서 제공된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, Her2-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 Her2 단백질의 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, Her2-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 Her2단백질의 여러 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, Her2-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 Her2단백질의 적어도 1-5개 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, Her2-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 적어도 1 내지 10개 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, Her2-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 적어도 1 내지 17개 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, Her2-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 적어도 17개 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다.

[0128] 종양형성 단백질 HER2/neu 내의 점 돌연변이 또는 아미노산 삭제는, 이들 종양이 작은 단편 리스테리아-기반 백신 또는 트라스투주맙(Her2/neu 항원의 세포외 도메인에서 위치하는 에피토프에 대한 모노클로날 항체)에 의해 표적화되었을 때 저항 종양 세포의 치료를 매개하는 것으로 보고되어 있다. 본원에서 종양 유전자의 MHC-클래스 I 에피토프의 클러스터를 보이는 HER2/neu 항원의 2개의 세포외 단편 및 1개의 세포내 단편을 보유하는 키메라 HER2/neu 기반 조성물을 기재한다. Her2/neu 항원의 3개 H2Dq 및 적어도 17개의 맵핑된 인간 MHC-클래스 I 에피토프를 보유하는 이 키메라 단백질은 리스테리아-모노사이토게네스 리스테리오리신 0 단백질의 처음 441개 아미노산에 융합되며 리스테리아 모노사이토게네스 약독화 균주 *Lmdd4*에 의해 발현된다.

[0129] 이전 보고는 HER2/neu 트랜스제닉 마우스가 별도로 Her2/neu 항원(각각 Her2/neu 종양 유전자의 단 하나의 H2Dq 에피토프를 보유함)의 작은 단편들을 발현하고 분비하는 리스테리아-기반 백신으로 면역화되었을 때, HER2/neu 과-발현 종양은 에피토프 각 백신에 의해 표적화되는 Her2/neu 항원의 이들 에피토프에서의 돌연변이에 기인하여 탈출할 수 있었음을 보였다(Singh R, Paterson Y. Immunoediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy. *Cancer Res* 2007; 67: 1887-92). 본원에서 Her2/neu 단백질의 3개 이상의 에피토프가 키메라 백신에 통합될 때, 탈출 돌연변이에 의해 이들 종양의 선별 및 탈출을 제거할 수 있음이 입증되었다. 신규한 HER2/neu 키메라 리스테리아 백신으로의 면역화는 Her2/neu 항원에서의 점 돌연변이 또는 아미노산 삭제와 연관될 수 있는 임의의 탈출 돌연변이를 야기하지 않았다(본원의 실시예 4 참조).

[0130] 일 구현예에서, 본원에서 HER2 키메라 단백질 또는 키메라 단백질을 발현하는 재조합 폴리펩티드를 발현하기 위해 리스테리아 백신 균주를 조작하는 방법을 제공하며, 방법은 핵산 분자로 리스테리아 균주를 형질전환시키는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 오픈 리딩 프레임을 포함하며, 여기에서 폴리펩티드는 HER2/neu 키메라 항원을 포함한다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 대사 효소를 인코딩하는 제2 오픈 리딩 프레임을 추가 포함하며, 여기에서 상기 대사 효소는 재조합 리스테리아 균주의 염색체에서 결여

된 내인성 유전자를 보완하여, HER2 키메라 단백질을 발현하도록 리스테리아 백신 균주를 조작한다.

[0131] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물은 아주번트를 추가 포함하며, 다른 구현예에서, 아주번트는 과립구/대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질, GM-CSF 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 분자, 사포닌 QS21, 모노포스포릴 지질 A, 비메틸화 CpG-함유 올리고뉴클레오티드 또는 본 분야에서 공지된 임의의 아주번트를 포함한다.

[0132] 일 구현예에서, 약독화 리스테리아 균주, 예컨대 LM 델타-actA 돌연변이체(Brundage 등의, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:11890-11894), *L. 모노사이토게네스* 델타-*plcA* (Camilli 등의, 1991, J. Exp. Med., 173:751-754), 또는 델타-*ActA*, 델타 *INL-b* (Brockstedt 외, 2004, PNAS, 101:13832-13837) 이 본 발명에서 사용된다. 다른 구현예에서, 약독화 리스테리아 균주는 하나 이상의 약독화 돌연변이를 도입하여 구성되며, 이는 본원에서 기재된 바와 같이 갖춰졌을 때 평균의 숙련자에게 이해될 것이다. 이러한 균주의 예는 방향족 아미노산에 대해 영양요구성인 리스테리아 균주(Alexander 외, 1993, Infection and Immunity 10 61:2245-2248) 및 리포테이코산의 형성에 대한 돌연변이체(Abachin 외, 2002, Mol. Microbiol. 43:1-14) 및 병독성 유전자의 결여에 의해 약독화된 균주(본원의 실시예 참조)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0133] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 핵산 분자는 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 제1 오픈 리딩 프레임은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 제2 오픈 리딩 프레임을 포함한다. 다른 구현예에서, 각 오픈 리딩 프레임은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0134] 본 기재 및 본원에서 제공되는 방법에 따라 갖췄을 때, 숙련자는 상이한 전사 프로모터, 종결자, 담체 벡터 또는 특이 유전자 서열(예를 들어, 상업적으로 입수가능한 클로닝 벡터 내의 것들)이 본 발명의 방법 및 조성물에서 성공적으로 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 본 발명에서 고려되는 바와 같이, 이를 기능성은 예를 들어, pUC 시리즈로서 공지된 상업적으로 입수가능한 벡터로 제공된다. 다른 구현예에서, 비-필수 DNA 서열(예를 들어, 항생제 저항 유전자)은 제거된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다. 다른 구현예에서, 상업적으로 입수가능한 플라스미드가 본 발명에서 사용된다. 이러한 플라스미드는 다양한 원천, 예를 들어, Invitrogen (La Jolla, CA), Stratagene (La Jolla, CA), Clontech (Palo Alto, CA)으로부터 입수가능하거나 본 분야에서 널리 공지된 방법을 사용하여 구성될 수 있다.

[0135] 다른 구현예는 복제의 원핵 기원 및 원핵 생물에서 발현을 용이하게 하기 위한 프로모터/발현 요소를 갖는 원핵 발현 벡터인 pCR2.1 (Invitrogen, La Jolla, CA)와 같은 플라스미드이다. 다른 구현예에서, 외인성 뉴클레오티드 서열은 플라스미드의 크기를 줄이고 여기에 위치될 수 있는 카세트의 크기를 증가시키기 위해 제거된다.

[0136] 이러한 방법은 본 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, Sambrook 외, 문헌(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 및 Ausubei 외, 문헌(1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, New York)에 기재된다.

[0137] 항생제 저항 유전자는 분자 생물학 및 백신 제조에서 일반적으로 사용되는 종래의 선별 및 클로닝 공정에서 사용된다. 본원에서 고려되는 항생제 저항 유전자는 암피실린, 페니실린, 메티실린, 에리트로마이신, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜(CAT), 네오마이신, 히그로마이신, 젠타마이신 및 본 분야에서 널리 공지된 기타의 것에 대해 저항을 부여하는 유전자 산물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 각 유전자는 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0138] 박테리아를 형질전환시키는 방법은 본 분야에 널리 공지되어 있으며, 칼슘-염화물 컴파턴트 세포-기반 방법, 전기천공 방법, 박테리오파아지-매개 형질도입, 화학적 형질전환 및 물리적 형질전환 기술을 포함한다(de Boer 외, 1989, Cell 56:641-649; Miller 외, 1995, FASEB J., 9:190-199; Sambrook 외, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Ausubel 외, 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Gerhardt 외, eds., 1994, method for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). 다른 구현예에서, 발명의 리스테리아 백신 균주는 전기천공에 의해 형질전환된다. 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0139] 다른 구현예에서, 접합은 박테리아 내로 유전 물질 및/또는 플라스미드를 도입하는데 사용된다. 접합을 위한 방

법은 본 분야에 널리 공지되었으며, 예를 들어, Nikodinovic J 외, 문헌(A second generation SNP-derived *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle expression vector that is generally transferable by conjugation. Plasmid. 2006 Nov;56(3):223-7) 및 Auchtung JM 등의 문헌(Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug 30;102(35):12554-9)에서 기재된다. 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0140] 일한 구현예에서, "형질전환"은 용어 "트랜스펙션"과 동일하게 사용되며 플라스미드 또는 다른 이종 DNA 분자를 사용하기 위해 박테리아 세포를 조작하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "형질전환"은 플라스미드 또는 다른 이종 DNA 분자의 유전자를 발현하기 위해 박테리아 세포를 조작하는 것을 의미한다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0141] 본 발명에서 유용한 플라스미드 및 다른 발현 벡터는 본원의 다른 곳에 기재되며, 프로모터/조절 서열, 그람 음성 및 그람 양성 박테리아의 복제 기원, 융합 단백질을 인코딩하는 분리된 핵산 및 아미노산 대사 유전자를 인코딩하는 분리된 핵산과 같은 이러한 특징을 포함한다. 또한, 융합 단백질 및 아미노산 대사 유전자를 인코딩하는 분리된 핵산은 이러한 분리된 핵산의 발현을 구동하는데 적합한 프로모터를 가질 것이다. 박테리아 시스템에서 발현을 구동하는데 유용한 프로모터는 본 분야에서 널리 공지되며, 박테리오파아지 람다, pBR322의 베타-락타마아제 유전자의 bla 프로모터, 및 pBR325의 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라아제 유전자의 CAT 프로모터를 포함한다. 원핵 프로모터의 추가 예는 5개 박테리오파아지 람다(PL 및 PR)의 주요 우측 및 좌측 프로모터인 *E. coli*의 trp, recA, lacZ, lac, 및 gal 프로모터, B. 서브틸리스의 알파-아밀라아제(Ulmanen 외, 1985. J. Bacteriol. 162:176-182) 및 S28-특이 프로모터(Gilman 외, 1984 Gene 32:11-20), 바실러스의 박테리오파아지의 프로모터(Gryczan, 1982, In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., New York), 및 스트렙토마이세스 프로모터(Ward 외, 1986, Mol. Gen. Genet. 203: 468-478)를 포함한다. 본 발명에서 고려되는 추가 원핵 프로모터는 예를 들어, Glick의 문헌(1987, J. Ind. Microbiol. 1:277-282); Cenatiempo의 문헌, (1986, Biochimie, 68:505-516); 및 Gottesman의 문헌(1984, Ann. Rev. Genet. 18:415-442)에서 리뷰된다. 본 발명에서 고려되는 프로모터/조절 요소의 추가 예는 리스테리아 prfA 프로모터, 리스테리아 hly 프로모터, 리스테리아 p60 프로모터 및 리스테리아 actA 프로모터 (GenBank 수탁번호. NC_003210) 또는 이의 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0142] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 플라스미드는 융합 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함한다. 다른 구현예에서, 서브서열은 클로닝되고 적절한 서브서열은 적절한 제한 효소를 사용하여 절단된다 그런 다음, 다른 구현예에서, 단편은 원하는 DNA 서열에 융합된다. 다른 구현예에서, 항원을 인코딩하는 DNA는 DNA 증폭 방법, 예를 들어 폴리미라이아제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 제조된다. 우선, 새로운 말단 중 어느 한 면에서 자생 DNA의 세그먼트가 별도로 증폭된다. 증폭된 서열의 5' 말단은 웨이드 링커를 인코딩하고, 다른 증폭된 서열의 3' 말단 또한 웨이드 링커를 인코딩한다. 제1 단편의 5' 말단이 제2 단편의 3' 말단에 상보적이므로, 2개의 단편(예를 들어, LMP 아가로스 상에서의 부분적 정제 후)은 3차 PCR 반응에서 중복 주형으로서 사용될 수 있다. 증폭된 서열은 코돈, 오프닝 부위의 카르복실 측면에서의 세그먼트(현재 아미노 서열을 형성함), 링커, 및 오프닝 부위의 아미노 측면에서의 서열(현재 카르복실 서열을 형성함)을 포함할 것이다. 항원은 플라스미드 내로 연결된다. 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0143] 다른 구현예에서, 본 발명은 임상 적용을 위해 파아지 기반 염색체 통합 시스템을 추가로 포함한다. d-알라닌라세미화 효소를 포함하나, 이에 제한되지 않는 필수 효소에 대해 영양요구성인 숙주 균주가 사용될 것이며, 예를 들어 Lmdal(-)dat(-)이다. 다른 구현예에서, "파아지 치유 단계"를 피하기 위해, PSA에 근거한 파아지 통합 시스템이 사용된다(Lauer 외, 2002 J Bacteriol. 184: 4177-4186). 다른 구현예에서, 통합된 유전자를 유지하기 위해 항생제에 의한 지속적인 선별을 필요로 한다. 그러므로, 다른 구현예에서, 현재 발명은 항생제로의 선별을 필요로 하지 않는 파아지 기반 염색체 통합 시스템의 구축을 가능하게 한다. 대신에, 영양요구성 숙주 균주가 고려될 것이다.

[0144] 본 발명의 재조합 단백질은 다른 구현예에서, 재조합 DNA 방법론을 사용하여 합성된다. 일 구현예에서, 이는 융합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 생성하고, 특정 프로모터/조절 요소의 조절 하에서, 본 발명의 플라스미드와 같은 발현 카세트 내에 DNA를 위치시키고 단백질을 발현시키는 것을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질 (예를 들어, 비-용혈 LLO/항원)을 인코딩하는 DNA는 다른 구현예에서, Narang 외의 문헌의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99); Brown 외의 문헌의 포스포디에스테르 방법(1979, Meth. Enzymol. 68: 109-151); Beaucage 외의 디에틸포스포아미디트 방법(1981, Tetra. Lett., 22: 15 1859-1862); 및 미국 특허 번호 제4,458,066호의 고형 지지체 방법과 같은 방법에 의한 직접 화학 합성을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해

제조된다.

[0145] 다른 구현예에서, 화학 합성은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생산하는데 사용된다. 다양한 구현예에서, 이 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 상보적 서열과의 혼성화에 의해, 또는 주형으로서 단일 가닥을 사용하는 DNA 폴리머라아제로의 고분자화에 의해 이중 가닥 DNA로 전환된다. 약 100개 염기의 서열에 국한되며, 더 긴 서열은 짧은 서열의 연결에 의해 수득될 수 있음을 본 분야의 숙련자가 인지할 것이다. 다른 구현예에서, 서브서열은 클로닝되고 적절한 서브서열은 적절한 제한 효소를 사용하여 절단된다. 그런 다음, 단편은 원하는 DNA 서열을 생산하기 위해 연결된다.

[0146] 다른 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질 또는 재조합 단백질을 인코딩하는 DNA는 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)과 같은 DNA 증폭 방법을 사용하여 클로닝된다. 그러므로, 비-용혈 LLO에 대한 유전자는 클로닝을 용이하게 하기 위해 적합한 제한 부위를 포함하는 센스 프라이머 및 다른 제한 부위, 예를 들어, 비-동일 제한 부위를 포함하는 안티센스 프라이머를 사용하여 PCR 증폭되었다. 항원을 인코딩하는 분리된 핵산에 대해 동일하게 반복된다. 비-용혈 LLO 및 항원 서열의 연결 및 플라스미드 또는 백터로의 삽입은 항원의 말단에 연결된 비-용혈 LLO를 인코딩하는 백터를 생산한다. 2개 분자는 직접적으로 또는 제한 부위에 의해 유도되는 짧은 스페이서에 의해 연결된다.

[0147] 다른 구현예에서, 분자는 하나 이상의 아미노산으로 이루어진 펩티드 스페이서에 의해 분리되며, 일반적으로 스페이서는 단백질에 연결되는 것 이외에 다른 특정 생물학적 활성을 갖지 않으며 이들 사이에 일부 최소 거리 또는 다른 공간적 관계를 보존할 것이다. 다른 구현예에서, 스페이서의 구성적 AA는 폴딩, 네트 변화 또는 소수성과 같은 분자의 일부 특성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 다른 구현예에서, 융합 또는 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 숙주 세포, including *E. coli*, 다른 박테리아 숙주, 예컨대 리스테리아, 효모 및, 다양한 더 높은 진핵 세포, 예컨대 COS, CHO 및 HeLa 세포주 및 골수종 세포주를 포함하는 다양한 숙주 세포로 형질 전환된다. 재조합 융합 단백질 유전자는 각 숙주에서 적절한 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 것이다. 프로모터/조절 서열은 본원의 다른 곳에서 상세히 기재된다. 다른 구현예에서, 플라스미드는 추가 프로모터 조절 요소뿐만 아니라 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 신호도 추가 포함한다. 진핵 세포에서, 조절 서열은 프로모터 및 예를 들어, 면역글로불린 유전자, SV40, 사이토메갈로바이러스 등으로부터 유래된 증강제, 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 것이다. 다른 구현예에서, 서열은 스플라이스 공여자 및 수여자 서열을 포함한다.

[0148] 일 구현예에서, 용어 "작동적으로 연결된"은 기재된 바와 같은 성분들이 이들의 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계인 병렬을 의미한다. 코딩 서열에 대해 "작동적으로 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 양립될 수 있는 조건 하에서 달성되는 방식으로 연결된다.

[0149] 다른 구현예에서, 플라스미드를 포함하는 영양요구성 박테리아를 선택하기 위해, 형질전환된 영양요구성 박테리아는 아미노산 대사 유전자의 발현에 대해 선택할 배지에서 성장된다. 다른 구현예에서, D-글루탐산 합성에 대해 영양요구성인 박테리아는 D-글루탐산 합성에 대해 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질전환되며, 영양요구성 박테리아는 D-글루탐산의 부재 하에서 성장할 것이나, 플라스미드로 형질전환되지 않거나 D-글루탐산 합성에 대한 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 발현하지 않는 영양요구성 박테리아는 성장하지 않을 것이다. 다른 구현예에서, D-알라닌 합성에 대해 영양요구성인 박테리아는, 플라스미드가 D-알라닌 합성을 위한 아미노산 대사 효소를 인코딩하는 분리된 핵산을 포함할 경우 본 발명의 플라스미드로 형질전환되고 발현했을 때, D-알라닌의 부재시에 성장할 것이다. 필수 성장 인자, 보충제, 아미노산, 비타민, 항생제 등을 포함하거나 결여된 적절한 배지를 만드는 이러한 방법은 본 분야에서 널리 공지되어 있으며, 상업적으로 입수가능하다(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0150] 다른 구현예에서, 본 발명의 플라스미드를 포함하는 영양요구성 박테리아가 적절한 배지 상에서 선택되면, 박테리아는 선택압의 존재하에 번식된다. 이러한 번식은 영양요구성 인자가 없는 배지 내에서 박테리아를 성장시키는 것을 포함한다. 영양요구성 박테리아에서 아미노산 대사 효소를 발현하는 플라스미드의 존재는 플라스미드가 박테리아와 함께 복제하여 플라스미드를 보유하는 박테리아에 대한 지속적인 선별을 가능하게 한다. 본원의 기재 및 본원의 방법에 따라 갖춰졌을 때, 숙련자는 플라스미드를 포함하는 영양요구성 박테리아가 성장하는 배지의 부피를 조절하여 리스테리아 백터의 생산을 용이하게 대량화할 것이다.

[0151] 숙련자는 다른 구현예에서, 다른 영양요구성 균주 및 보완 시스템은 본 발명의 사용에 맞게 조정됨을 인정할 것이다.

[0152] 일 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2-발현 종양의 성장을 방해하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다

른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0153] 다른 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2-발현 종양의 성장을 방해하거나 지연하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0154] 다른 구현예에서, 본원에서 개체에서 HER2-발현 종양의 성장에 대한 증강된 면역 반응을 유발하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에서, Her2/neu-발현 종양에 대항하는 면역 반응은 Her2/neu 단백질의 적어도 하나의 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다.

[0155] 일 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2-발현 종양의 치료시 탈출 돌연변이를 예방하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0156] 다른 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2-발현 종양의 발생을 예방하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0157] 일 구현예에서, 종양내 T 조절 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0158] 일 구현예에서, 본원에서 종양내 T 조절 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0159] 일 구현예에서, 본원에서 골수종 유래 억제자 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0160] 다른 구현예에서, 본원에서 골수종 유래 억제자 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0161] 일 구현예에서, 본원에서 대상체에서 HER2/neu-발현 종양의 형성을 예방하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에서 대상체에서 Her2/neu-발현 종양으로부터 기원하는 전이 질병의 형성을 예방하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 본원은 대상체에서 HER2/neu-발현 종양을 치료하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원은 대상체에서 HER2/neu-발현 종양으로부터 비롯된 전이 질병을 치료하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 본원은 본 발명의 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원은 본 발명의 백신을 투여하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원은 본 발명의 조성물, 백신, 재조합 폴리펩티드 또는 재조합 뉴클레오티드를 투여하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물, 백신, 재조합 폴리펩티드 또는 재조합 뉴클레오티드를 투여하는 단계는 자신의 별개 구현예에서 각각, 조성물, 백신, 재조합 뉴클레오티드 또는 발현 재조합 폴리펩티드를 포함하는 리스테리아의 약독화 재조합 형태로 수행된다. 다른 구현예에서, 투여는 상이한 약독화 박테리아 백터로 수행된다. 다른 구현예에서, 투여는 DNA 백신 (예를 들어, 네이키드 DNA 백신)으로 수행된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 재조합 폴리펩티드의 투여는 단백질을 재조합적으로 생산한 후, 재조합 단백질을 대상체에 투여하여 수행된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0162] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물의 반복된 투여(부스터 용량)는 종양 퇴행을 이루기 위해 치료의 제1 과정 후 바로 또는 며칠, 몇주 또는 몇 달의 간격 후에 착수될 수 있다. 다른 구현예에서, 반복된 용량은 종양 퇴행을 이루기 위해 치료의 제1 과정 후 바로 또는 며칠, 몇주 또는 몇 달의 간격 후에 착수될 수 있다. 평가는 이미징

기술, 혈청 종양 마커의 분석, 생검 또는 종양 관련 증상의 존재, 부재 또는 개선과 같은 진단 방법을 포함하는 본 분야에 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0163] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 유발된 면역 반응은 $CD8^+$ T 세포-매개 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, 면역 반응은 $CD8^+$ T 세포-매개 반응으로 주로 이루어진다. 다른 구현예에서, 면역 반응의 유일한 검출가능한 성분이 $CD8^+$ T 세포-매개 반응이다.

[0164] 다른 구현예에서, 본 발명에서 제공된 방법 및 조성물에 의해 유발된 면역 반응은 $CD4^+$ T 세포-매개 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, 면역 반응은 $CD4^+$ T 세포-매개 반응으로 주로 이루어진다. 다른 구현예에서, 면역 반응의 유일한 검출가능한 성분이 $CD4^+$ T 세포-매개 반응이다. 다른 구현예에서, $CD4^+$ T 세포-매개 반응은 항원에 대항하는 측정가능한 항체 반응을 동반한다. 다른 구현예에서, $CD4^+$ T 세포-매개 반응은 항원에 대항하는 측정가능한 항체 반응을 동반하지 않는다.

[0165] 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 항원의 서브우성 $CD8^+$ T cell 에피토프에 대항하여 $CD8^+$ T 세포-매개 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 (a) LLO 단백질의 N-말단 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드 분자에 Her2-neu 키메라 항원 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드 분자를 융합하여, LLO-항원 융합 단백질을 인코딩하는 재조합 뉴클레오티드를 생성하는 단계; 및 (b) 재조합 뉴클레오티드 또는 LLO-항원 융합을 대상체에 투여하는 단계를 포함하며; 이에 의해 항원의 서브우성 $CD8^+$ T 세포 에피토프에 대한 $CD8^+$ T 세포-매개 면역 반응을 유도한다.

[0166] 일 구현예에서, 본원은 $CD8^+$ /T 조절 세포의 종양내 비율을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본 발명의 재조합 폴리펩티드, 재조합 리스테리아, 또는 재조합 백터를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0167] 다른 구현예에서, 본원은 $CD8^+$ /T 조절 세포의 종양내 비율을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본 발명의 재조합 폴리펩티드, 재조합 리스테리아, 또는 재조합 백터를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0168] 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물에 의해 유발되는 면역 반응은 항원의 적어도 하나의 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함한다. 다른 구현예에서, 면역 반응 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 면역 반응은 하나의 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응으로 주로 이루어진다. 다른 구현예에서, 면역 반응의 유일한 측정가능한 성분은 적어도 하나의 서브우성 에피토프에 대한 면역 반응이다. 각 유형의 면역 반응은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0169] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 상기 대상체에서 HER2/발현 종양 또는 암에 대한 대상체에서의 내성을 약화시키며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 본원에서 제공되는 재조합 리스테리아 백신 균주를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0170] 면역 반응을 측정하는 방법은 본 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 종양 성장의 억제 측정, 유동 세포 계측, 표적 T 세포 용해 분석(예를 들어, 크롬 방출 분석), 테트라미의 사용 등을 포함한다. 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0171] 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 Her-2-발현 종양으로부터 발산되는 전이 질병을 자연시키거나 저해하는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 Her2 키메라 단백질 또는 이의 단편에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드 또는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 뉴클레오티드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 개체는 Her2-발현 종양에 대한 면역 반응이 증가하고 있으며, 이에 의해 대상체에서 HER2-발현 종양으로부터 발산되는 전이 질병을 자연시키거나 저해한다.

[0172] 다른 구현예에서, 본 발명은 HER2 키메라 단백질의 항원성을 개선시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 방법은 재조합 폴리펩티드를 생성하기 위해 Her-2 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드에 LLO 단백질의 N-말단 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드를 융합시키는 단계를 포함하며, 이에 의해 HER2 키메라 단백질의 항원성을 개선시킨다.

[0173] 다른 구현예에서, 본원은 HER2 키메라 단백질의 항원성을 개선시키는 방법을 제공하며, 여기에서 그리고 다른

구현예에서, 방법은 재조합 뉴클레오티드를 발현하도록 리스테리아 균주를 조작하는 것을 포함한다. 다른 구현 예에서, 상이한 박테리아 벡터는 재조합 뉴클레오티드를 발현하기 위해 사용된다. 다른 구현예에서, 박테리아 벡터는 약독화된다. 다른 구현예에서, DNA 백신(예를 들어, 네이키드 DNA 백신)은 재조합 뉴클레오티드를 발현하는 데 사용된다. 다른 구현예에서, 뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 LLO-HER2 키메라 융합 웹티드의 투여는 단백질을 재조합적으로 생산한 후, 개체에게 재조합 단백질을 투여하여 수행된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0174] 일 구현예에서, 본 발명은 종양의 "에피토프 확산"을 위한 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 조성물 및 방법을 사용한 면역화는 본 발명의 백신에서 수송되는 항원 이외의 항원을 보유하는 종양 내로 확산되는 에피토프를 유도한다.

[0175] 다른 구현예에서, 우성 에피토프 또는 서브우성 에피토프는 치료될 대상체에서 각각 우성 또는 서브우성이다. 다른 구현예에서, 우성 에피토프 또는 서브우성 에피토프는 치료될 집단에서 각각 우성 또는 서브우성이다.

[0176] 일 구현예에서, 본원은 에피토프 확장에 의해 대상체에서 암 또는 종양 성장을 치료하거나 억제하거나 저해하는 방법을 제공하며 여기에서 그리고 다른 구현예에서, 상기 암은 본 발명의 조성물 내에 포함되는 항원 또는 이의 단편의 발현과 연관된다. 다른 구현예에서, 방법은 본 발명의 재조합 폴리웹티드, 재조합 리스테리아, 또는 재조합 벡터를 포함하는 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 대상체는 항원-발현 암 또는 항원-발현 종양에 대항하는 면역 반응이 증가하며, 이에 의해 대상체에서 암 또는 종양 성장을 치료하거나 억제하거나 저해한다.

[0177] 일 구현예에서, "우성 CD8⁺ T 세포 에피토프"는 단백질 또는 단백질을 함유하는 병원균 또는 암세포로 예방접종, 감염 또는 악성 성장하여 유발된 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 30% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 이에 의해 유발되는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 35% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 40% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 45% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 50% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 55% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 60% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 65% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 70% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 75% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 80% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 85% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 90% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 95% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 96% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 97% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 98% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다.

[0178] 일 구현예에서, "서브우성 CD8⁺ T 세포 에피토프"는 단백질 또는 단백질을 함유하는 병원균 또는 암세포로 예방접종, 감염 또는 악성 성장하여 유발된 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 30% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 28% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 26% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 24% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 22% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 20% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 CD8⁺ T 세포를 18% 넘게 인식하는 에피토프

를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 16% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 14% 넘게 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 12% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 10% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 8% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 6% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 5% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 4% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 3% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 2% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 1% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 항원-특이 $CD8^+$ T 세포를 0.5% 미만으로 인식하는 에피토프를 의미한다.

[0179]

우성 에피토프 및 서브우성 에피토프의 각 유형은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0180]

본 발명의 방법 및 조성물에서의 항원은, 일 구현예에서, 개체의 비-종양 세포에서의 검출가능한 수준으로 발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 개체의 비-종양 세포의 적어도 특정 백분율(예를 들어, 0.01%, 0.03%, 0.1%, 0.3%, 1%, 2%, 3%, 또는 5%)의 검출가능한 수준에서 발현된다. 일 구현예에서, "비-종양 세포"는 종양의 체외 세포를 의미한다. 다른 구현예에서, "비-종양 세포"는 비-악성 T 세포를 의미한다. 다른 구현예에서, "비-종양 세포"는 비-형질전환 세포를 의미한다. 다른 구현예에서, 비-종양 세포는 체세포이다. 다른 구현예에서, 비-종양 세포는 생식 세포이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0181]

"검출가능한 수준"은, 일 구현예에서, 표준 분석법을 사용했을 때 검출할 수 있는 수준을 의미한다. 일 구현예에서, 분석법은 면역 분석법이다. 일 구현예에서, 분석법은 효소-결합 면역분석법(ELISA)이다. 다른 구현예에서, 분석법은 웨스턴 블로트이다. 다른 구현예에서, 분석법은 FACS이다. 본 분야에서 허용되는 임의의 다른 분석법이 본원에서 제공되는 방법에서 사용될 수 있음이 숙련자에게 이해될 것이다. 다른 구현예에서, 검출 가능한 수준은 특정 분석법의 백그라운드 수준에 비례하여 결정된다. 이들 기술을 실행하는 방법은 분 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있으며 각 기술은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0182]

일 구현예에서, 재조합 항원-발현 LM으로의 예방접종은 에피토프 확산을 유도한다. 다른 구현예에서, Her2의 맥락 외임에도, LLO-항원 융합으로의 예방접종은 마찬가지로 에피토프 확산을 유도한다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0183]

다른 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 HER2-발현 종양의 성장을 방해하는 방법을 제공하며, 이는 HER2 키메라 항원에 융합된 LLO 단백질의 N-말단 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드를 대상체에 투여하는 것을 포함하며, 여기에서 항원은 하나 이상의 서브우성 $CD8^+$ T 세포 에피토프를 가지고, 대상체는 항원-발현 종양에 대항하는 면역 반응이 증가하고, 이에 의해 대상체에서 HER2-발현 종양의 성장을 방해한다. 다른 구현예에서, 항원은 임의의 우성 $CD8^+$ T 세포 에피토프를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본원은 개체에서 HER2-발현 종양의 성장을 방해하는 방법을 제공하며, 이는 본원에서 제공되는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 뉴클레오티드를 포함하는 리스테리아의 재조합 형태를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0184]

다른 구현예에서, 본 발명은 암을 갖는 숙주에서 세포독성 T 세포의 형성을 도입하는 방법을 제공하며, 이는 본 발명의 조성물을 숙주에게 투여하는 단계를 포함하며, 이에 의해 암을 갖는 숙주에서 세포독성 T 세포의 형성을 유도한다.

[0185]

다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암의 발생을 감소시키는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 개선하는 방법을 제공한다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0186]

일 구현예에서, 조성물은 생체외에서 대상체의 세포에 투여되며; 다른 구현예에서, 조성물은 생체외에서 공여자의 세포에 투여된다; 다른 구현예에서, 조성물은 생체내에서 공여자의 세포 내로 투여된 후 대상체로 전이된다.

각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0187] 일 구현예에서, 본 발명에 의해 치료되는 암은 유방암이다. 다른 구현예에서, 암은 HER2 함유 암이다. 다른 구현예에서, 암은 흑색종이다. 다른 구현예에서, 암은 췌장암이다. 다른 구현예에서, 암은 난소암이다. 다른 구현예에서, 암은 위암이다. 다른 구현예에서, 암은 췌장의 암 병변이다. 다른 구현예에서, 암은 폐 선암이다. 다른 구현예에서, 암은 직장 결장 선암이다. 다른 구현예에서, 암은 폐 편평 선암이다. 다른 구현예에서, 암은 위 선암이다. 다른 구현예에서, 암은 난소 표면 상피 종양(예를 들어, 이의 양성, 증식성 또는 악성 종류)이다. 다른 구현예에서, 암은 구강 평편 세포 암종이다. 다른 구현예에서, 암은 비-소세포 폐 암종이다. 다른 구현예에서, 암은 CNS 암종이다. 다른 구현예에서, 암은 자궁내막 암종이다. 다른 구현예에서, 암은 방광암이다. 다른 구현예에서, 암은 중피종이다. 다른 구현예에서, 암은 악성 중피종(MM)이다. 다른 구현예에서, 암은 두경부암이다. 다른 구현예에서, 암은 전립선 암종이다. 다른 구현예에서, 암은 골육종이다. 다른 구현예에서, 암은 HER2/neu 발현 골육종이다. 다른 구현예에서, 골육종은 개과 골육종이다. 다른 구현예에서, 골육종은 국소화 골육종이다. 다른 구현예에서, 골육종은 전이 골육종이다. 다른 구현예에서, 골육종은 고 등급 골육종이다. 다른 구현예에서, 골육종은 개과 부속지 골육종이다.

[0188] 본 발명의 방법의 다른 구현예에서, 대상체는 항원-발현 종양 또는 표적 항원에 대항하는 면역 반응이 증가하며, 이에 의해 항-종양 효과를 매개한다.

[0189] 다른 구현예에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한 면역원성 조성물을 제공하며, 조성물은 HER2 키메라 단백질에 대한 말단이 절단된 LL0의 융합을 포함한다. 다른 구현예에서, 면역원성 조성물은 융합을 발현하는 리스테리아 균주를 추가로 포함한다.

[0190] 다른 구현예에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한 면역원성 조성물을 제공하며, 조성물은 HER2 키메라 단백질을 발현하는 리스테리아 균주를 포함한다.

[0191] 일 구현예에서, 본 발명의 치료 프로토콜은 치료적이다. 다른 구현예에서, 프로토콜은 예방적이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 백신 또는 조성물은 가족성 유전 또는 숙련자에 의해 이해될 바와 같이 이들 유형의 질병에 취약하게 하는 다른 환경 때문에 유방암 또는 다른 유형의 HER2-함유 종양과 같은 암의 위험에서 사람을 보호하기 위해 사용된다. 다른 구현예에서, 백신은 수술, 종래 화학요법 또는 방사선 치료에 의해 종양 성장을 감축시킨 후 암 면역요법으로서 사용된다. 이러한 치료 후, 본 발명의 백신은 백신의 종양 항원에 대한 CTL 반응이 남아 있는 전이를 파괴하고 암으로부터의 차도를 확장시키기 위해 투여된다. 다른 구현예에서, 백신은 수술, 종래 화학요법 또는 방사선 치료와 조합하여 암 면역요법으로서 사용된다. 다른 구현예에서, 이러한 조합 치료는 절단을 받을 수 없는 대상체에서 사용된다. 다른 구현예에서, 이러한 조합 치료는 절단을 받을 수 없는 원발성 골육종을 갖는 대상체에서 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 백신은 이전에 구축된 종양의 성장에 영향을 주고 존재하는 종양 세포를 죽이기 위해 사용된다.

[0192] 일 구현예에서, "종양 항원 또는 이의 단편," "종양-연관 항원 또는 이의 단편," "이종 항원 또는 이의 단편," 또는 "항원 웨티드 또는 이의 단편"은 본원에서 서로 교환 가능하게 사용되며 종양 항원, 맥관형성 항원, 또는 감염 질병 항원을 포함하는 본 분야에서 공지된 임의의 항원을 포함한다. 다른 구현예에서, 항원은 자가-항원이다.

[0193] 일 구현예에서, 본원에서 제공되는 항원은 종양-연관 항원이며, 일 구현예에서는, 하기 종양 항원 중 하나이다: 서바이빈, MAGE (흑색종-연관 항원 E) 단백질, 예를 들어, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, 티로시나아제; 돌연변이 ras 단백질; 돌연변이 p53 단백질; p97 흑색종 항원, ras 웨티드 또는 진전된 암과 연관된 p53 웨티드; 자궁경부암과 연관된 HPV 16/18 항원, 유방 암종과 연관된 KLH 항원, 결장암과 연관된 CEA(암태아성 항원), gp100, 흑색종과 연관된 MART1 항원, 또는 전립선암과 연관된 PSA 항원. 다른 구현예에서, 본원에서 제공된 바와 같은 조성물 및 방법에 대한 항원은 흑색종-연관 항원이며, 일 구현예에서는 TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, gp-100, 티로시나아제, HSP-70, 베타-HCG, 또는 이들의 조합이다. 본 분야에서 공지된 다른 종양-연관 항원은 본 발명에서 또한 고려된다.

[0194] 다른 구현예에서, 항원 또는 이의 단편은 HPV-E7 (HPV16 또는 HPV18 균주로부터), HPV-E6 (HPV16 또는 HPV18 균주로부터), Her-2/neu, NY-ESO-1, 텔로머라아제(TERT, SCCE, CEA, LMP-1, p53, 카르복시 안하이드라아제 IX (CAIX), PSMA, a 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), HMW-MAA, WT-1, HIV-1 Gag, 프로테이나아제 3, 티로시나아제 관련 단백질 2, PSA (전립선-특이 항원), EGFR-III, 서바이빈, 아폽토시스 반복의 바클로 저해제-함유 5 (BIRC5), LMP-1, p53, PSMA, PSCA, Muc1, PSA (전립선-특이 항원), 또는 이들의 조합으로부터 선택된 항원으로

부터 유래된다.

[0195] 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 종양 또는 암에 대항하는 예방접종을 위해 사용된다.

[0196] 일 구현예에서, 본 발명의 치료 프로토콜은 치료적이다. 다른 구현예에서, 프로토콜은 예방적이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 백신 또는 조성물은 가족성 유전 또는 숙련자에 의해 이해될 바와 같이 이를 유형의 질병에 취약하게 하는 다른 환경 때문에 유방암 또는 다른 유형의 HER2-함유 종양과 같은 암의 위험에서 사람을 보호하기 위해 사용된다. 다른 구현예에서, 백신은 수술, 종래 화학요법 또는 방사선 치료에 의해 종양 성장을 감축시킨 후 암 면역요법으로서 사용된다. 이러한 치료 후, 본 발명의 백신은 백신의 종양 항원에 대한 CTL 반응이 남아 있는 전이를 파괴하고 암으로부터의 차도를 확장시키기 위해 투여된다. 다른 구현예에서, 백신은 수술, 종래 화학요법 또는 방사선 치료와 조합하여 암 면역요법으로서 사용된다. 다른 구현예에서, 이러한 조합 치료는 절단을 받을 수 없는 대상체에서 사용된다. 다른 구현예에서, 이러한 조합 치료는 절단을 받을 수 없는 원발성 골육종을 갖는 대상체에서 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 백신은 이전에 구축된 종양의 성장에 영향을 주고 존재하는 종양 세포를 죽이기 위해 사용된다.

[0197] 다른 구현예에서, 상기 기재된 임의의 방법에서 사용되는 백신 및 면역원성 조성물은 본 발명의 백신 및 면역원성 조성물의 임의의 특징을 갖는다. 각 특징은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0198] 용량 범위의 다양한 구현예가 본 발명에 의해 고려된다. 일 구현예에서, 백신 백터의 경우에서, 용량은 $0.4 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 의 범위이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 $0.4\text{--}4.9 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 으로부터이다. 다른 구현예에서 용량은 약 $0.5\text{--}0.59 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 으로부터이다. 다른 구현예에서 용량은 약 $0.6\text{--}0.69 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 으로부터이다. 다른 구현예에서 용량은 약 $0.7\text{--}0.79 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 으로부터이다. 다른 구현예에서 용량은 약 $0.8 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 $0.4 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 내지 $0.8 \text{ LD}_{50}/\text{용량}$ 이다.

[0199] 다른 구현예에서, 용량은 약 10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1.5×10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 2×10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 3×10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 4×10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 6×10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 8×10^7 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1.5×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 2×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 3×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 4×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 6×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 8×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1.5×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 2×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 3×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 5×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 6×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 8×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1.5×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 2×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 3×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 5×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 6×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 8×10^{10} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1.5×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 2×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 3×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 5×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 6×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 8×10^{11} 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 5.0×10^8 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 용량은 약 3.3×10^9 박테리아/용량이다. 다른 구현예에서, 본원에서 제공되는 방법에서 사용하기 위한 조성물은 3.3×10^9 리스테리아/용량을 포함한다. 각 가능성은

본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0200] 일 구현예에서, 본 발명의 백신 또는 면역원성 조성물은 단독으로 대상체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 백신 또는 면역원성 조성물은 다른 암 치료와 함께 투여된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0201] 재조합 본 발명의 리스테리아의 방법 및 조성물은, 일 구현예에서, HER2 키메라 항원 또는 LLO-HER2 키메라 항원 융합을 인코딩하는 구성물로 안정하게 형질전환된다. 일 구현예에서, 구성물은 추가 서브클로닝을 용이하게 하기 위해 폴리링커를 함유한다. 재조합 리스테리아를 생산하기 위한 여러 기술이 공지되어 있다.

[0202] 일 구현예에서, 구성물 또는 핵산 분자는 상동성 재조합을 사용하는 리스테리아 염색체 내로 통합된다. 상동성 재조합을 위한 기술은 본 분야에서 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, Baloglu S, Boyle SM, 외의 문헌(Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. Vet Microbiol 2005, 109(1-2): 11-7); 및 Jiang LL, Song HH, 외, (Characterization of a mutant *Listeriamonocytogenes* strain expressing green fluorescent protein. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005, 37(1): 19-24)에 기재되어 있다. 다른 구현예에서, 상동성 재조합은 미국 특히 번호 제6,855,320호에 기재된 바와 같이 실행된다. 이 경우에서, E7을 발현하는 재조합 LM 균주는 유전자 산물의 분비를 가능하게 하기 위해 hly 프로모터의 조절 하에서 및 hly 신호 서열의 포함으로 E7 유전자의 염색체 통합으로 만들어졌으며, 이는 Lm-AZ/E7로서 언급되는 재조합체를 산출한다. 다른 구현예에서, 온도 민감성 플라스미드가 재조합체를 선별하기 위해 사용된다. 각 기술은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0203] 다른 구현예에서, 구성물 또는 핵산 분자는 트랜스포슨 삽입을 이용하여 리스테리아 염색체 내로 통합된다. 트랜스포슨 삽입을 위한 기술은 본 분야에서 널리 공지되어 있으며, 그 중에서, DP-L967의 구성물에서 Sun 외의 문헌에서 기재되어 있다(Infection and Immunity 1990, 58: 3770-3778). 트랜스포슨 돌연변이 생성은, 다른 구현예에서, 안정한 게놈 삽입 돌연변이가 형성될 수 있는 이점을 갖지만 외부 유전자가 삽입된 게놈에서의 위치가 공지되지 않은 단점을 갖는다.

[0204] 다른 구현예에서, 구성물 또는 핵산 분자는 파아지 통합 부위를 이용하여 리스테리아 염색체 내로 통합된다 (Lauer P, Chow MY 등, Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. J Bacteriol 2002; 184(15): 4177-86). 이 방법의 특정 구현예에서, 박테리오파아지(예를 들어, U153 또는 PSA 리스테리오파아지)의 인테그라아제 유전자 및 부착 부위는 이종 유전자를 상응하는 부착 부위 내로 삽입하기 위해 사용되며, 이는 게놈 내에서의 임의의 적절한 부위일 수 있다(예를 들어, arg tRNA 유전자의 comK 또는 3' 말단). 다른 구현예에서, 내인성 프로파아지는 구성물 또는 이종 유전자의 통합 전에 사용되는 부착 부위로부터 치유된다. 다른 구현예에서, 이 방법은 단일-카페 통합물을 야기한다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0205] 다른 구현예에서, 다양한 프로모터 중 하나는 항원 또는 항원을 함유하는 융합 단백질을 발현하기 위해 사용된다. 일 구현예에서, Lm 프로모터는 예를 들어, 각각 리스테리아 단백질 용혈소, actA, 포스포티딜이노시톨-특이 포스포리파아제, 포스포리파아제 C, 및 메탈로프로테아제를 인코딩하는, 유전자 hly, actA, plcA, plcB 및 mpt에 대한 프로모터로 사용된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0206] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 본 발명의 HER2 키메라 단백질 또는 LLO 서열의 상동체를 사용한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 비-인간 포유동물로부터의 HER2 키메라 단백질을 사용한다. 임의의 단백질 또는 웨პ티드에 관련되었을 때 용어 "상동성", "상동인" 등은, 일 구현예에서, 서열을 정렬하고 필요하다면 최대 백분율 상동성을 이루기 위해 캡을 도입하고 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존성 치환을 고려하지 않는 후의 자생 폴리웨პ티드에 상응하는 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율을 의미한다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 본 분야에서 널리 공지되어 있다.

[0207] 다른 구현예에서, 임의의 핵산 서열에 관련될 때 용어 "상동성"은 상응하는 자생 핵산 서열의 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열에서 뉴클레오티드의 백분율을 유사하게 나타낸다.

[0208] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 신호 웨პ티드 또는 재조합 폴리웨პ티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 분리된 핵산을 제공한다. 일 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명의 신호 웨პ티드 또는 재조합 폴리웨პ티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 65% 상동성을 공유하는 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명은 신호 웨პ티드 또는 재조합 폴리웨პ티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 75% 상동성을

공유하는 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명은 신호 펩티드 또는 재조합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 85% 상동성을 공유하는 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명은 신호 펩티드 또는 재조합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 90% 상동성을 공유하는 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명은 신호 펩티드 또는 재조합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 95% 상동성을 공유하는 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명은 신호 펩티드 또는 재조합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 97% 상동성을 공유하는 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 본 발명은 신호 펩티드 또는 재조합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산과 적어도 99% 상동성을 공유하는 서열을 포함한다.

[0209] 상동성은, 일 구현예에서, 본 분야에서 널리 기재된 방법에 의해 서열 정렬을 위한 컴퓨터 알고리즘으로 결정된다. 예를 들어, 핵산 서열 상동성의 컴퓨터 알고리즘 분석은 입수가능한 임의의 많은 소프트웨어 패키지, 예컨대, 예를 들어, BLAST, DOMAIN, BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility), GENPEPT 및 TREMBL 패키지의 사용을 포함할 수 있다.

[0210] 다른 구현예에서, "상동성"은 65% 초과의 본원에서 제공되는 서열(핵산 또는 아미노산 서열)로부터 선택된 서열로부터 선택된 서열에 대한 동일성을 의미한다. 다른 구현예에서, "상동성"은 70% 초과의 본원에서 제공되는 서열로부터 선택된 서열에 대한 동일성을 의미한다. 다른 구현예에서, 동일성은 75% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 78% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 80% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 82% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 83% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 85% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 87% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 88% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 90% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 92% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 93% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 95% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 96% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 97% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 98% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 99% 초과이다. 다른 구현예에서, 동일성은 100%이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0211] 다른 구현예에서, 상동성은 본 분야에서 널리 기재된 방법인 후보 서열 혼성화를 통해 결정된다(예를 들어, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds.(1985); Sambrook 외, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel 외, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y). 예를 들어, 혼성화 방법은 자생 카스파아제 펩티드를 인코딩하는 DNA의 보체에 대해, 엄격한 조건 하에서 수행될 수 있다. 혼성화 조건은, 예를 들어, 하기를 포함하는 용액 내에서 42°C에서 밤새 인큐베이션하는 것이다: 10% 내지 20% 포름아미드, 5 X SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 7.6), 5 X 덴하르트 용액, 10% 텍스트란황산, 및 20 µg/ml 변성된 시어드 연어 정자 DNA.

[0212] 본 발명의 일 구현예에서, "핵산"은 적어도 2개의 염기-당-인산염 조합의 스트링을 의미한다. 용어는, 일 구현예에서, DNA 및 RNA를 포함한다. "뉴클레오티드"는, 일 구현예에서, 핵산 고분자의 단량체 유닛을 의미한다. RNA는, 일 구현예에서, tRNA (전이 RNA), snRNA (작은 핵 RNA), rRNA (리보솜 RNA), mRNA (메신저 RNA), 항-센스 RNA, 작은 억제 RNA (siRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 및 리보솜의 형태일 수 있다. siRNA 및 miRNA의 사용은 기재되어 있다(Caudy AA 외, Genes & Devel 16:2491-96 및 여기에 인용된 참조 문헌). DNA는 플라스미드 DNA, 바이러스 DNA, 선형 DNA, 또는 염색체 DNA 또는 이러한 그룹의 유도체의 형태일 수 있다. 게다가, 이들 형태의 DNA 및 RNA는 단일, 이중, 삼중 또는 사중 가닥일 수 있다. 용어는 또한, 다른 구현예에서, 인공 핵산은 다른 유형의 골격을 포함하나 상이한 염기를 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 인공 핵산은 PNA(펩티드 핵산)이다. PNA는 펩티드 골격 및 뉴클레오티드 염기를 함유하며, 일 구현예에서, DNA 및 RNA 분자 둘 다에 결합할 수 있다. 다른 구현예에서, 뉴클레오티드는 개질된 옥세탄이다. 다른 구현예에서, 뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포디에스테르 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 치환되어 개질된다. 다른 구현예에서, 인공 핵산은 본 분야에서 공지된 자생 핵산의 인산염 골격의 임의의 다른 변이체를 함유한다. 포스포로티오에이트 핵산 및 PNA의 사용이 본 분야의 숙련자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, Neilsen PE의 문헌(Curr Opin Struct Biol 9: 353-57); 및 Raz NK 외의 문헌(Biochem Biophys Res Commun. 297: 1075-84)에 기재되어 있다. 핵산의 생산 및 사용은 본 분야의 숙련자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. 및 Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio 및 G. C. Fareed에 기재되어 있다. 각 핵산 유도체는 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0213] 본원에서 열거된 임의의 아미노산 서열에 대한 단백질 및/또는 펩티드 상동성은, 일 구현예에서, 면역블롯 분석법을 포함하는 본 분야에서 널리 기재된 방법에 의해 또는 구축된 방법을 통해, 입수가능한 임의의 많은 소프트

웨어 패키지를 사용하여 아미노산 서열의 컴퓨터 알고리즘 분석을 통해 결정된다. 이들 패키지의 일부는 FASTA, BLAST, MPsrch 또는 Scanps 패키지를 포함할 수 있으며, Smith 및 Waterman 알고리즘, 및/또는 예를 들어, 분석을 위해 국제/지역 또는 BLOCKS 정렬의 이용을 사용할 수 있다. 상동성을 결정하는 각 방법은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0214] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 수행하는 데 사용되는 시약을 포함하는 키트를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 조성물, 툴, 또는 장비를 포함하는 키트를 포함한다.

[0215] 용어 "접촉" 또는 "투여"는, 일 구현예에서, 암 세포 또는 종양을 본 발명의 조성물과 직접적으로 접촉하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, 용어는 암 세포 또는 종양을 본 발명의 조성물과 간접적으로 접촉하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 분산 또는 화합물이 체내에서 순환하게 하는 본 분야에서 공지된 임의의 다른 능동 수송 또는 수동 수송 공정에 의해 조성물이 암 세포 또는 종양과 접촉하게 한 후 대상체가 본 발명의 조성물과 접촉되는 방법을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 조성물의 적어도 단일 투여를 포함할 수 있으며, 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 조성물의 다중 투여를 포함할 수 있다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0216] 다른 구현예에서, 용어 "유전자" 및 "재조합 유전자"는 본 발명 폴리펩티드를 인코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 핵산 분자를 의미한다. 이러한 천연 대립형질 변이는 통상적으로 주어진 유전자의 뉴클레오티드 서열에서 1% 내지 5%의 변화를 야기할 수 있다. 대안 대립형질은 많은 상이한 개인 또는 생물에서 관심 유전자를 서열결정하여 확인될 수 있다. 이는 다양한 개인 또는 생물에서 동일한 유전자 좌를 확인하기 위한 혼성화 프로브를 사용하여 용이하게 실행될 수 있다. 천연 대립형질 변이의 결과이며 가능성 활성을 대체하지 않는 임의의 및 모든 이러한 뉴클레오티드 변이 및 결과적으로 생성된 아미노산 다형 또는 변이는 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

약학적 조성물

[0218] 본 발명의 백신 및 조성물을 함유하는 약학적 조성물은, 다른 구현예에서, 본 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 방법에 의해, 예컨대 비경구적으로, 파라-암적으로(paracancerally), 경점막으로, 근육내로, 정맥내로, 피내로, 피하로, 복강내로, 심실내로, 두개내로, 질내로 또는 종양내로 대상체에게 투여된다.

[0219] 본원에서 제공되는 방법 및 상조성물의 다른 구현예에서, 백신 또는 조성물은 경구로 투여되므로, 경구 투여에 적합한 형태, 즉, 고형 또는 액상 제형으로 제형화된다. 적합한 고형 경구 제형은 정제, 캡슐, 알약, 과립, 펠렛 등을 포함한다. 적합한 액상 경구 제형은 용액, 혼탁액, 분산액, 에멀젼, 오일 등을 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에서, 유효 성분은 캡슐로 제형화된다. 이 구현예에 따라, 본 발명의 조성물은 유효 성분 이외에 불활성 담체 또는 희석제, 젤라틴 캡슐을 포함한다.

[0220] 다른 구현예에서, 백신 또는 조성물은 액상 제제의 정맥내, 동맥내, 근육내 주사에 의해 투여된다. 적합한 액상 제형은 용액, 혼탁액, 분산액, 에멀젼, 오일 등을 포함한다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 정맥내 투여되므로 정맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 동맥내 투여되므로 동맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 근육내 투여되므로 근육내 투여에 적합한 형태로 제형화된다.

[0221] 일 구현예에서, 용어 "치료하는"은 질병을 치유하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 질병을 예방하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 질병의 발생을 감소시키는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 질병의 증상을 개선시키는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 환자의 무실행 생존율 또는 전체 생존률을 증가시키는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 질병의 진행을 안정화하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 차도를 유도하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는"은 질병의 진행을 늦추는 것을 의미한다. 용어 "감소시키는," "억제하는" 및 "저해하는"은 다른 구현예에서 줄이거나 하락하는 것을 의미한다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0222] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "약"은 5%가 더해지거나 빼지고, 또는 다른 구현예에서 10%가 더해지거나 빼지고, 또는 다른 구현예에서 15%가 더해지거나 빼지고, 또는 다른 구현예에서 20%가 더해지거나 빼지는 정량적 용어를 의미한다.

[0223] 용어 "대상체"는 치료를 필요로 하거나 질환 또는 이의 후유증에 민감한 성인 인간 또는 인간 아동, 십대 또는 청소년을 포함하는 포유동물을 포함할 수 있으며 또한 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 랙 및 마우스와 같은 비-인간을 포함할 수 있음이 숙련자에게 이해될 것이다. 용어는 가축을 포함할 수 있음이 또한 인식될 것이

다. 용어 "대상체"는 모든 점에 있어서 정상인 개인을 배제하지 않는다.

[0224] 일 구현예에서, 용어 "대상체"는 또한 절단할 수 없는 애완용 개 및 고양이를 포함한다. 다른 구현예에서, 용어 "대상체"는 또한 수술할 수 없는 인간을 포함한다. 다른 구현예에서, 용어 "대상체"는 또한 절단할 수 없는 인간을 포함한다. 다른 구현예에서, 용어 "대상체"는 또한 인간 아동을 포함한다.

[0225] 치료의 목적을 위한 용어 "포유동물"은 인간, 가축, 및 개를 포함하는 개과 동물 및 말을 포함하는 동물원, 스포츠 및 애완용 동물, 고양이, 소, 돼지, 양 등을 포함하는 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 의미하나, 이에 제한되지 않음이 상속련자에 의해 이해될 것이다.

[0226] 종양의 치료에 관련하여 "치료학적 유효량"은 하나 이상의 하기 효과를 적용할 수 있는 양을 의미한다: (1) 진행을 감속시키고 성장 저지를 완료하는 것을 포함하는, 어느 정도까지 종양 성장의 저해; (2) 종양 세포 수의 감소; (3) 종양 크기의 감소; (4) 말초 기관으로 종양 세포 침투의 저해(즉, 감소, 진행 감속 또는 완전한 중단); (5) 전이의 감소(즉, 감소, 진행 감속 또는 완전한 중단); (6) 종양의 퇴행 또는 거부를 야기할 수 있으나 야기할 필요가 없는 항-종양 면역 반응의 증강; 및/또는 (7) 장애에 연관된 하나 이상의 증상의 어느 정도까지의 완화. 종양 치료의 목적을 위해 본원에서 제공된 백신의 "치료학적 유효량"은 경험적으로 그리고 정기적인 방식으로 결정될 수 있다.

[0227] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 좀 더 충분히 설명하기 위해 나타낸 것이다. 그러나, 이들은 절대로 본 발명의 넓은 범주를 한정하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

실시예

물질 및 방법

[0230] 올리고뉴클레오티드는 Invitrogen (Carlsbad, CA)에 의해 합성되었으며 DNA 서열결정은 Genewiz Inc, South Plainfield, NJ에 의해 실시되었다. 유동 세포 계측 시약은 Becton Dickinson Biosciences (BD, San Diego, CA)로부터 구매했다. 세포 배양 배지, 보충제 및 모든 다른 시약들은, 지시되지 않는 한 Sigma (St. Louise, MO)로부터 구했다. HER2/neu HLA-A2 웨티드는 EZbiolabs (Westfield, IN)에 의해 합성되었다. 완전 RPMI 1640 (C-RPMI) 배지는 2mM 글루타민, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 및 1mM 피루브산나트륨, 10% 소태아혈청, 폐니실린/스트렙토마이신, Hepes (25mM)를 함유한다. 폴리클로날 항-LLO 항체는 이전이 기재되었으며 항-HER2/neu 항체는 Sigma에서 구입했다.

마우스 및 세포주

[0232] 모든 동물 실험은 University of Pennsylvania 또는 Rutgers University에서 IACUC에 의한 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다. FVB/N 마우스는 Jackson laboratories (Bar Harbor, ME)로부터 구입했다. 랫 HER2/neu 종양 유전자로 조작된 단백질을 과발현하는 FVB/N HER2/neu 트랜스제닉 마우스는 University of Pennsylvania의 동물 거점 시설에서 거주시키고 사육했다. 고수준의 랫 HER2/neu 단백질을 발현하는 NT-2 종양 세포주는 이들 마우스에서 자발적인 유방 종양으로부터 유래되었으며 상기 기재한 바와 같이 성장시켰다. DHFR-G8 (3T3/neu) 세포는 ATCC로부터 수득되었으며 the ATCC 권고에 따라 성장시켰다. EMT6-Luc 세포주는 John Ohlfest 박사 (University of Minnesota, MN)로부터의 너그러운 기증품이었으며 완전 C-RPMI 배지에서 배양하였다. 생물발광 작업은 University of Pennsylvania(Philadelphia, PA)의 Small Animal Imaging Facility (SAIF)에서 지도 하에 실시되었다.

리스테리아 구성물 및 항원 발현

[0234] HER2/neu-pGEM7Z 은 친절하게도 University of Pennsylvania의 Mark Greene 박사에 의해 제공되었으며 the pGEM7Z 플라스미드(Promega, Madison WI) 내로 클로닝된 전장 인간 HER2/neu (hHer2) 유전자를 포함하였다. 이 플라스미드는 hHER2/neu의 3개의 세그먼트, 즉, EC1, EC2, 및 IC1를 PCR pfx DNA 폴리머라아제(Invitrogen) 및 표 1에 나타낸 올리고를 사용한 PCR로 증폭시키기 위한 주형으로서 사용되었다.

[0235] 표 1: 인간 HER2-κ 메라의 클로닝을 위한 프라이머

	DNA 서열	염기쌍 영역	아미노산 영역 또는 연결 지점
HER2-κ 메라 (F)	TGATCTCGAGACCCACCTGGACATGCTC (서열번호: 57)	120-510	40-170
HerEC1-EC2F (연결 지점)	CTACCAAGACACGATTGTGGAAG-AATATCCA GGAGTTGCTGGCTGC (서열번호: 58)	510/1077	170/359
HerEC1-EC2R (연결 지점)	GCACCCAGCAAACCTCTGGATATT-CTTCCACAA AATCGTGTCTGGTAG (서열번호: 59)		
HerEC2-IC1F (연결 지점)	CTGCCACCAGCTGTGCCGCCGAGGG- CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGA (서열번호: 60)	1554/2034	518/679
HerEC2-IC1R (연결 지점)	TCGTGTACTTCCGGATCTTCTGCTG CCCTGGGC GCACAGCTGGTGGCAG (서열번호: 61)		
HER2-κ 메라 (R)	GTGGCCGGGTCTAGATTAGTCTAAGAGGCAGGCCATAGG (서열번호: 62)	2034-2424	679-808

[0236] [0237] Her2/neu κ 메라 구성물은 SOEing PCR 방법 및 주형으로서 각각의 개별 hHER2/neu 세그먼트에 의해 직접 융합으로 생성되었다. 프라이머는 표 2에 보여진다.

[0238] 상이한 세그먼트 인간 Her2 영역의 증폭을 위한 프라이머의 서열.

	DNA 서열	염기쌍 영역	아미노산 영역
HER2-EC1(F)	CCGCCTCGAGGCCCGCGAGCACCCAAGTG (서열번호: 63)	58-979	20-326
HER2-EC1(R)	CGCGACTAGTTAACCTCTGCTGTACCTC (서열번호: 64)		
HER2-EC2(F)	CCGCCTCGACTACCTTCTACGGACGTG (서열번호: 65)	907-1504	303-501
Her-2- EC2(R)	CGCGACTAGTTACTCTGGCCGGTGGCAG (서열번호: 66)		
HER2-HER2-IC1(F)	CCGCCTCGAGCAGCAGAAGATCCGGAAGTAC (서열번호: 67)	2034-3243	679-1081
HER2-IC1(R)	CGCGACTAGTTAACGCCCTCGGAGGGTG (서열번호: 68)		

[0239] [0240] ChHer2 유전자는 XhoI 및 SpeI 제한 효소를 사용하여 pAdv138로부터 잘라졌으며, *Lmdd* 셔틀 벡터, pAdv134 내에서 LLO의 말단이 절단된, 비-용혈 단편을 갖는 프레임 내 클로닝되었다. 삽입의 서열, LLO 및 *hly* 프로모터는 DNA 서열결정 분석에 의해 확인되었다. 이 플라스미드는 전기-컨피던트 *actA*, *da1*, *dat* 돌연변이 리스테리아 모노사이토케네스 균주 내로 전기천공되었으며, *LmddA* 및 양성 클론은 스트렙토마이신(250 μ g/ml)을 함유하는 뇌심장 침출액(BHI) 야가 플레이트 상에서 선별되었다. 일부 실험에서 hHER2/neu (*Lm*-hHER2) 단편을 발현하는 유사한 리스테리아 균주는 비교 목적을 위해 사용되었다. 이들은 이전에 기재되었다. 모든 연구에서, 무관한 리스테리아 구성물(*Lm*-대조)가 면역계에서 리스테리아의 항원 독립적 효과를 설명하기 위해 포함되었다. *Lm*-대조는 ADXS31-164와 같은 동일한 리스테리아 플랫폼에 근거하나, HPV16-E7 또는 NY-ESO-1과 같은 상이한 항원을 발현하지 않았다. 리스테리아로부터의 융합 단백질의 발현 및 분비가 테스트되었다. 각 구성물은 생체내에서 폐시지화되었다.

[0241] 세포독성 분석

[0242] 3마리 내지 5마리 FVB/N 마우스의 그룹들을 1×10^8 콜로니 형성 유닛(CFU)의 *Lm*-LLO-ChHer2, ADXS31-164, *Lm*-hHer2 ICI 또는 *Lm*-대조(무관한 항원을 발현함)으로 1주 간격으로 3회 면역화시키거나 처리되지 않고 남겨뒀다. NT-2 세포를 생체내에서 성장시켰으며 트립신으로 탈착시키고 37°C에서 45분간 미토신 C(무혈청 C-RPMI 배지 중 250 μ g/ml)으로 처리하였다. 5회 세척 후, 이들을 면역화된 동물 또는 처리되지 않은 동물로부터 수확된 비장과 1:5(자극제: 응답자)의 비율로 37°C 및 5% CO₂에서 5일 동안 공동-인큐베이션 하였다. 표준 세포독성 분석을 이전에 기재된 방법에 따라 표적으로서 유로퓸 표지된 3T3/neu(DHFR-G8) 세포를 사용하여 수행하였다. 사멸된 표적 T 세포로부터의 방출된 유로퓸을 590 nm에서 분광광도계(Perkin Elmer, Victor²)를 사용하여 4시간 인큐베이션 후 측정하였다. 특이 용해 백분율을 (실험 그룹에서의 용해-자발적 용해)/(최대 용해-자발적 용해)로서 규정하였다.

[0243] 면역화된 마우스로부터의 비장세포에 의한 인터페론- γ 분비

[0244] 3마리 내지 5마리 FVB/N 또는 HLA-A2 트랜스제닉 마우스의 그룹들을 1×10^8 CFU의 ADXS31-164, 음성 리스테리아 대조(무관한 항원을 발현함)로 1주 간격으로 3회 면역화시키거나 처리하지 않고 남겨뒀다. FVB/N 마우스로부터의 비장세포를 마지막 면역화 후 1주일째에 분리하고 C-RPMI 배지 내에서 미토신 C 처리된 NT-2 세포의 존재 하에 5×10^6 세포/웰로 24 웰 플레이트에서 공동-배양하였다. HLA-A2 트랜스제닉 마우스로부터의 비장세포를 1 μ M의 HLA-A2 특이 웨티드 또는 1 μ g/ml의 재조합 His-태그된ChHer2 단백질의 존재 하에서 인큐베이션하여, *E. coli*에서 생산하고 니켈 기반 친화성 크로마토그래피 시스템으로 정제하였다. 상청액으로부터의 시료를 24시간 또는 72시간 후에 수득하고 제조업자의 권고에 따라 인터페론- γ (IFN- γ) 사용 마우스 IFN- γ 효소-결합 면역 흡착 분석(ELISA) 키트를 사용하여 인터페론- γ (IFN- γ)의 존재에 대해 테스트하였다.

[0245] INF- γ ELISpot 분석

[0246] 각각의 표시된 시점에서의 저온보존된 PBMC를 해동하고 37°C에서 밤새 둔 다음 계수하였다. 세포는, 5일 동안 키메라 백신에 존재하는 HER2/Neu의 EC1, EC2 및 IC1 도메인 및 재조합 인간 IL-2 (Invitrogen, Fredrick, MD)를 나타내는 중복 인간 HER2/Neu 웨티드(5개 아미노산에 의해 11량체 중복됨)의 2.5 uM 풀로 자극되었다. 세포는 수확되어 $1 \times$ PBS로 2회 세척되고 계수되었다. IFN- γ ELISpot 분석을 시판되는 개과 IFN- γ ELISpot 분석 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 수행했다. 간략하게, 0.8 - 2 x 105 자극된 세포를 IL-2이 더해진 2.5 uM의 EC1, EC2 또는 IC1 웨티드 풀 또는 IL-2 단독(백그라운드 계수를 결정하기 위해)으로 자극하였다. 모든 분석은 삼중으로 수행되었다. 플레이트는 제조업자의 지시에 따라 현상되었다. 스팟을 CTL-면역스팟 분석기(C.T.L, Shaker Heights, OH)를 사용하여 계수하였다. 스팟의 수를 비-자극 웰에서 계수된 스팟의 수의 두배를 빼서 평균화시켰다.

[0247] Her2 트랜스제닉 동물에서의 종양 연구

[0248] 6주령 FVB/N 랫 HER2/neu 트랜스제닉 마우스(9마리 내지 14마리/그룹)를 5×10^8 CFU의 *Lm*-LL0-ChHer2, ADXS31-164 또는 *Lm*-대조로 6회 면역화시켰다. 이들을 자발적 유방 종양의 출현에 대해 주 2회 관찰하였으며, 이는 52주까지 전자 캘리퍼스를 사용하여 측정하였다. 탈출된 종양은 이들이 평균 직경에서 1cm^2 크기에 도달할 때 제거되어 -20°C에서 RNAlater 중에 보관되었다. 이들 종양의 탈출에서 Her2/neu 단백질에서의 돌연변이의 효과를 결정하기 위해, 게놈 DNA를 게놈 DNA 분리 키트를 사용하여 추출하고 서열결정하였다.

[0249] 비장 및 종양에서 조절 T 세포에서의 ADXS31-164의 효과

[0250] 마우스에게 1×10^6 NT-2세포가 피하(s.c.) 이식되었다. 7, 14 및 21일에, 이들을 1×10^8 CFU의 ADXS31-164, *Lmdd4*-대조로 면역화시키거나 처리하지 않고 두었다. 종양 및 비장을 28일째에 추출하고 CD3 $^+$ /CD4 $^+$ /FoxP3 $^+$ Treg의 존재에 대해 FACS 분석으로 테스트하였다. 간략하게, 비장세포를 C-RPMI 배지 중 2개 유리 슬라이드 사이에서 비장을 균질화하여 분리하였다. 종양을 멀균 면도날로 분쇄하고 PBS 중 DNase (12 U/ml), 및 콜라제나아제(2 mg/ml)를 함유하는 버퍼로 소화시켰다. 교반하면서 실온에서 60분 인큐베이션한 후, 세포를 온화한 파이펫팅으로 분리했다. 적혈구 세포를 RBC 용해 버퍼로 용해한 후 10% FBS를 함유한 완전 RPMI-1640 배지로 여러 번 세척하였다. 나일론 메쉬를 통해 여과한 후, 종양 세포 및 비장세포를 FACS 버퍼(2% FBS/PBS)에 재현탁하고 항-CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-FITC, CD25-APC 항체로 염색한 후 항-Foxp3-PE로 투과화 및 염색하였다. 유동 세포 계측 분석을 4-색 FACS calibur(BD)를 사용하여 수행하고 데이터를 세포 퀘스트 소프트웨어(BD)를 사용하여 분석하였다.

[0251] 통계학적 분석

[0252] 로그-랭크 카이-자승 테스트를 생존 데이터에 사용하였고 CTL 및 ELISA 분석에 스튜던트 *t* 테스트를 사용하였으며, 삼중으로 실시되었다. 0.05 미만의 *p*-값(*로 표시됨)은 이들 분석에서 통계학적으로 유의한 것으로 간주되었다. 모든 통계학적 분석은 Prism 소프트웨어, V.4.0a (2006) 또는 SPSS 소프트웨어, V.15.0 (2006)로 실시되었다. 모든 FVB/N 랫 HER2/neu 트랜스제닉 연구에서 발명자는 그룹 당 8마리 내지 14마리 마우스를 사용하였고, 모든 야생형 FVB/N 연구에서 발명자는 다른 방식으로 언급되지 않는 한 적어도 8마리 마우스를 사용하였다. 모든 연구는 HER2/neu 트랜스제닉 마우스 모델에서의 장기간 종양 연구를 제외하고 적어도 1회 반복되었다.

[0253] 실시예 1

[0254] Her-2 단편에 융합된 LLO 단편을 분비하는 L. 모노사이토게네스 균주의 생산: ADXS31-164의 구성물.

키메라 *HER2/neu* 유전자의 구성이 이전에 기재되었다(ChHer2). 간략하게, *ChHer2* 유전자는 SOEing PCR 방법에 의한 *Her2/neu* 단백질의 2개의 세포외(aa 40-170 및 aa 359-433) 및 1개의 세포내 단편 (aa 678-808)의 직접 융합에 의해 생산되었다. 키메라 단백질은 단백질의 공지된 인간 MHC 클래스 I 에피토프 중 대부분을 보유한다. *ChHer2* 유전자는 플라스미드, pAdv138 (*Lm*-LLO-ChHer2를 구성하기 위해 사용되었음)로부터 제거되고 *LmddA* 셔틀 플라스미드 내로 클로닝되어, 플라스미드 pAdv164를 야기하였다 (도 1A). 이들 2개의 플라스미드 골격 사이에는 2개의 주요 차이가 있다. 1) pAdv138은 재조합 박테리아의 실험관내 선별을 위해 클로람페니콜 저항 마커(*cat*)를 사용하는 반면, pAdv164는 바실러스 서브틸리스로부터의 D-알라닌 라세미화 효소 유전자(*dal*)을 보유하며, *dal-dal* 유전자가 결여된 *LmddA* 균주에서 실험관내 선별 및 생체내 플라스미드 보유에 대한 대사 보완 경로를 사용한다. 이 백신 플랫폼은 조작된 리스테리아 백신 균주의 항생제 저항에 대한 FDA 우려를 해결하기 위해 설계되고 발달되었다. 2) pAdv138과 달리, pAdv164는 플라스미드 내에 *prfA* 유전자의 카피를 보유하지 않으며(하기 서열 및 도 1A 참조), 이는 *Lmdd* 균주의 생체내 보완을 위해 필수적인 것이 아니기 때문이다. *LmddA* 백신 균주는 또한 *actA* 유전자(리스테리아의 세포내 이동 및 세포에서 세포로의 확산의 원인임)가 결여되어 있어 이 골격으로부터 유래된 재조합 백신 균주가 이의 모체 균주인 *Lmdd*로부터 유래된 것보다 100배 적은 독성을 나타낸다. *LmddA*-기반 백신은 또한 면역화된 마우스의 비장으로부터의 *Lmdd*-기반 백신보다 더 빨리 지워진다(48시간 미만). ~104 KD까지의 밴드가 웨스턴 블로트 분석을 사용하여 항-LLO 항체에 의해 검출되었으므로, 이 균주로부터의 융합 단백질 tLLO-ChHer2의 발현 및 분비는 실험관내 성장의 8시간 후의 TCA 침전 세포 배양 상청액에서의 *Lm*-LLO-ChHer2에서와 비슷하다 (도 1B). tLLO만을 발현하는 리스테리아 골격 균주는 음성 대조로서 사용되었다.

[0256] pAdv164 서열(7075 염기쌍)(도 1 참조):

tgacagtgtcgaatgcaggtaaatgcggacgcagctaaacggatctcgccgacatgtcagcagacggcgaaggccatacatgccatgccaatctgactgcattaaaaagccttttcagccggagtccagcggcgttgcgcagtgaccattagatctttacggcagcggagcaatcagctttaaagcgctaaactgcattaaagaaatagcctttttcatccgctgtcgaaatggtaatacccttgcactttaacggagggttgcggtaagaattgccatcacgttctgaacttcttcgtttacaccaagtctgttcatccccgtatgcacccatcagatgaaaatagaagagaaccccttgcgtggcggctgcctcctgaagccattcaacagaataacctgttaaggtcagtcataactcagcagcgattgccacataactccggggaaaccgcgccaagcacaatataggccctcaatccctttgcgactgaaatcgcttcatccaaatggccacggcaagcatgaagcacctgcgtcaagagcagcccttgcgtttctgcattaccatgcccgtaggcgttgccttcacaactgcccataactggacatgttccggatgttttcatattgctgacatttccattatcgccgacaaatgtcaatttccgcccacgtatctgtaaaaagggtttgtcattggaaaactctctttttcagaaaatccagtaacgttaagtatggaaattatattatattgattaatactaagttaccagttttcacctaaaaacaaatgatgagataatagctccaaaggctaaaggactataccactatgttaattaa (서열번호: 53)

[0258] 실시예 2: ADXS31-164는 LM-LLO-ChHER2만큼 면역원성이다.

항-*HER2/neu* 특이 세포독성 T 세포의 생산에서 ADXS31-164의 면역원성 특성을 표준 CTL 분석에서 *Lm*-LLO-ChHer2 백신의 특성과 비교하였다. 두 백신 모두 3T3/*neu* 표적 세포에 의해 발현되는 *HER2/neu* 항원을 향하여 강하지만 비슷한 세포독성 T 세포 반응을 유발한다. 따라서, LLO에 융합된 *Her2/neu*의 세포내 단편만을 발현하는 리스테리아로 면역화된 마우스는 더 많은 MHC 클래스 I 에피토프를 함유하는 키메라보다 더 낮은 용해 활성을 보였다. CTL 활성은 처리되지 않은 동물 또는 비관련 리스테리아 백신이 주입된 마우스에서 검출되지 않았다(도 2A). ADXS31-164는 또한 야생형 FVB/N 마우스로부터의 비장세포에 의한 IFN- γ 의 분비를 자극할 수 있었다(도 2B). 이는 미토신 C 처리된 NT-2 세포와 함께 공동-배양된 이들 세포의 배양 상청액에서 검출되었으며, 높은 수준의 *HER2/neu* 항원을 발현하였다(도 5C).

[0260] ADXS31-164로의 면역화 후 인간 MHC 클래스 I 에피토프의 적절한 처리 및 제시가 HLA-A2 마우스에서 테스트되었다. 면역화된 HLA-A2 트랜스제닉으로부터의 비장세포를 *Her2/neu* 분자의 세포외(HLYQGCQVV 서열번호: 11 또는 KIFGSLAFL 서열번호: 12) 또는 세포내 (RLLQETELV 서열번호: 13) 도메인에 위치한 맴핑된 HLA-A2 제한 에피토프에 상응하는 웨티드와 72시간 동안 공동-인큐베이션하였다(도 2C). 재조합 ChHer2 단백질이 양성 대조로서 사용되었으며 무관한 웨티드 또는 웨티드가 없는 것이 음성 대조로서 사용되었다. 이 실험으로부터의 데이터는 ADXS31-164가 표적 항원의 상이한 도메인에 위치된 인간 에피토프에 대한 항-*HER2/neu* 특이 면역 반응을 유발할 수 있음을 보인다.

[0261] 실시예 3: ADXS31-164는 자발적 유방 종양의 발생을 예방에서 LM-LLO-ChHER2에서보다 더 효과적이었다.

ADXS31-164의 항-종양 효과를 20-25주령에서 천천히 성장하는 자발적 유방 종양이 발달한 *HER2/neu* 트랜스제닉

동물에서 *Lm*-LLO-ChHer2와 비교하였다. 무관한 리스테리아-대조 백신으로 면역화된 모든 동물은 21-25주 내에 유방 종양이 발달하였으며 33주 전에 희생되었다. 그에 반하여, 리스테리아-HER2/neu 재조합 백신은 유방 종양의 형성에서 상당한 지연을 일으켰다. 45주에서, ADXS31-164 예방접종된 마우스의 50% 초파(9마리 중 5마리)가 *Lm*-LLO-ChHer2로 면역화된 마우스의 25%에 비해 여전히 종양이 없었다. 52주에서, ADXS31-164로 면역화된 8마리 마우스 중 2마리가 여전히 무-종양으로 남아있었으며, 다른 실험 그룹으로부터의 모든 마우스는 이미 그들의 질병에 굴복하였다(도 3). 이를 결과는 더 많은 약독화에도 불구하고, HER2/neu 트랜스제닉 동물에서의 자발적 유방 종양 발생의 예방에서 ADXS31-164가 *Lm*-LLO-ChHer2보다 더 효과적임을 나타낸다.

[0263] 실시예 4: ADXS31-164로의 면역화에 따른 HER2/NEU 유전자에서의 돌연변이.

HER2/neu의 MHC 클래스 I 애피토프에서의 돌연변이가 작은 단편 백신 또는 HER2/neu의 세포외 도메인에서 애피토프를 표적화하는 모노클로날 항체인 트拉斯투주맙(헤르셉틴)으로 면역화됨에 따라 종양 탈출에 원인이 됨이 고려되었다. 이를 평가하기 위해, 계놈 물질이 트랜스제닉 동물 내 탈출 종양으로부터 추출되었으며 키메라 또는 대조 백신으로 면역화된 종양에서의 *neu* 유전자의 상응하는 단편이 서열결정되었다. 돌연변이는 대안적 탈출 메커니즘을 제안하는 임의의 예방접종된 HER2/neu 내에서 관찰되지 않았다(데이터는 도시하지 않음).

[0265] 실시예 5: ADXS31-164는 종양내 T 조절 세포 내 상당한 감소를 일으킨다.

비장 및 종양에서 조절 T 세포의 빈도에서의 ADXS31-164의 영향을 설명하기 위해, 마우스에 NT-2 종양 세포를 이식하였다. 비장세포 및 종양내 림프구가 3회 면역화 후 분리되고 $CD3^+$ / $CD4^+$ / $CD25^+$ / $FoxP3^+$ 세포로서 규정되는 Treg에 대해 염색하였으나, 개별적으로 분석했을 때 비슷한 결과가 FoxP3 또는 CD25 마커로 수득되었다. 결과는 ADXS31-164로의 면역화가 무관한 리스테리아 백신 또는 처리되지 않은 동물과 비교했을 때, 비장에서 Treg의 빈도에 영향을 미치지 않았음을 나타낸다(도 4 참조). 그에 반해서, 리스테리아 백신으로의 면역화는 종양에서 Treg의 존재에 상당한 영향을 초래하였다(도 5A). 비처리된 종양에서 $CD3^+$ T 세포의 평균 19.0%는 Treg인 반면, 이 빈도는 무관한 백신에 대해 4.2%, ADXS31-164에 대해 3.4%까지 감소하였으며, 종양내 Treg의 빈도에서 5배 감소하였다(도 5B). *LmddA* 백신 중 하나로 처리된 마우스의 종양내 Treg의 빈도에서의 감소는 종양의 크기에서의 차이에 기여하지 않을 것이다. 대표 실험에서, ADXS31-164로 면역화된 마우스로부터의 종양은 비처리된 마우스(8.69 ± 0.98 , $n = 5$, $p < 0.01$) 또는 무관한 백신으로 처리된 마우스(8.41 ± 1.47 , $n = 5$, $p = 0.04$)로부터의 종양보다 상당히 작지만[평균 직경(mm) \pm SD, 6.71 ± 0.43 , $n = 5$], 이들 마지막 두 그룹의 비교는 종양 크기에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.73$). *LmddA* 백신으로 처리된 종양에서의 Treg의 더 낮은 빈도는 증가된 종양내 CD8/Treg 비율을 야기하며, 이는 더 선호되는 종양 미세환경이 *LmddA* 백신으로 면역화된 후에 수득될 수 있음을 제안한다. 그러나, 표적 항원 HER2/neu (ADXS31-164)를 발현하는 백신만이 종양 성장을 감소시킬 수 있었으며, 이는 Treg에서의 감소가 종양에서 항원-특이 반응의 존재시에만 영향이 있음을 나타내는 것이다.

[0267] 실시예 6: 탈출 돌연변이는 HER-2 키메라를 발현하는 리스테리아 백신에 의해 도입되지 않았다.

LM-LLO-138, LmddA164 및 무관한 백신 LM-LLO-NY와 같은 상이한 백신으로 면역화된 마우스의 종양 시료를 수확하였다. DNA를 이들 시료로부터 정제하고 HER2/neu 영역 IC1, EC1 및 EC2에 상응하는 DNA 단편을 증폭하여 서열 결정하여 임의의 면역 탈출 돌연변이가 있는지를 결정하였다. 각 DNA로부터의 서열의 정렬을 CLUSTALW를 사용하여 수행하였다. 분석의 결과는 종양으로부터 수확된 DNA 서열에서 돌연변이가 없음을 나타냈다. 이를 서열의 상세한 분석은 하기에 나타냈다.

[0269] EC2의 정렬 (HER2/neu의 975 -1029 bp)

참조 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT(서열번호: 14)

LM-LLO-138-2 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LM-LLO-138-3 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LM-ddA-164-1 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LMddA164-2 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LM-ddA-164-3 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

LMddA164-4 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

- [0277] Lm-ddA-164-5 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
- [0278] LmddA-164-6 GGTACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTCTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
- [0279] 참조 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC (서열번호: 15)
- [0280] Lm-LLO-138-2 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0281] Lm-LLO-138-3 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0282] Lm-ddA-164-1 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0283] LmddA164-2 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0284] Lm-ddA-164-3 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0285] LmddA164-4 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0286] Lm-ddA-164-5 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0287] LmddA-164-6 CGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCACCTCGAGGGCGAGGGCATCACCAGTGAC
- [0288] 참조 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG (서열번호: 16)
- [0289] Lm-LLO-138-2 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0290] Lm-LLO-138-3 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0291] Lm-ddA-164-1 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0292] LmddA164-2 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0293] Lm-ddA-164-3 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0294] LmddA164-4 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0295] Lm-ddA-164-5 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0296] LmddA-164-6 AATGTCCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGAGCCTGGCATTTGCCGGAG
- [0297] 참조 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG (서열번호: 17)
- [0298] Lm-LLO-138-2 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0299] Lm-LLO-138-3 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0300] Lm-ddA-164-1 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0301] LmddA164-2 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0302] Lm-ddA-164-3 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0303] LmddA164-4 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0304] Lm-ddA-164-5 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0305] LmddA-164-6 AGCTTGATGGGACCCCTCCCGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG
- [0306] 참조 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC (서열번호: 18)
- [0307] Lm-LLO-138-2 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC
- [0308] Lm-LLO-138-3 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC
- [0309] Lm-ddA-164-1 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC
- [0310] LmddA164-2 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC
- [0311] Lm-ddA-164-3 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC
- [0312] LmddA164-4 TTCGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGCCAGACAGTCTC

- [0313] Lm-ddA-164-5 TTGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCANACAGTCTC
- [0314] LmddA-164-6 TTGAAACCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCT
- [0315] 참조 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC (서열번호: 19)
- [0316] Lm-LLO-138-2 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0317] Lm-LLO-138-3 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0318] Lm-ddA-164-1 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0319] LmddA164-2 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0320] Lm-ddA-164-3 CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0321] LmddA164-4 CGTGACCTCAGTGTCTTCAAAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0322] Lm-ddA-164-5 CGTGACCTCAGTGTCTTCAAAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0323] LmddA-164-6 CGTGACCTCAGTGTCTTCAAAACCTCGAATCATTGGGACGGATTCTCACGATGGC
- [0324] 참조 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG (서열번호: 20)
- [0325] Lm-LLO-138-2 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG
- [0326] Lm-LLO-138-3 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG
- [0327] Lm-ddA-164-1 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG
- [0328] LmddA164-3 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG
- [0329] Lm-ddA-164-5 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG
- [0330] Lm-ddA-164-6 GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGATCCACTCGCTGGGCTCGCTCACTGCGG
- [0331] 참조 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT (서열번호: 21)
- [0332] Lm-LLO-138-2 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT
- [0333] Lm-LLO-138-3 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT
- [0334] Lm-ddA-164-1 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT
- [0335] LmddA164-3 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT
- [0336] Lm-ddA-164-5 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT
- [0337] Lm-ddA-164-6 GAGCTGGCAGTGGATTGGCTTGATTCAACCGAACGCCATCTGCTTGACACACT
- [0338] 참조 GTACCTTGGGACCGCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG (서열번호: 22)
- [0339] Lm-LLO-138-2 GTACCTTGGGACCGCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
- [0340] Lm-LLO-138-3 GTACCTTGGGACCGCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
- [0341] Lm-ddA-164-1 GTACCTTGGGACCGCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
- [0342] LmddA164-3 GTACCTTGGGACCGCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
- [0343] Lm-ddA-164-5 GTACCTTGGGACCANCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
- [0344] Lm-ddA-164-6 GTACCTTGGGACCGCTTCCGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG
- [0345] 참조 CGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTGGTCTGTAACACTCACTGTGTGCCACGGGCAC (서열번호: 23)
- [0346] Lm-LLO-138-2 CGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTGGTCTGTAACACTCACTGTGTGCCACGGGCAC
- [0347] Lm-LLO-138-3 CGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTGGTCTGTAACACTCACTGTGTGCCACGGGCAC
- [0348] Lm-ddA-164-1 CGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTGGTCTGTAACACTCACTGTGTGCCACGGGCAC

- [0349] LmddA164-3 CCGGAAGAGGATTGTGGCTCGAGGGCTGGCTGTAACTCAGTGTGCCACGGCAC
- [0350] Lm-ddA-164-6 CCGGAAGAGGATTGTGGCTCGAGGGCTGGCTGTAACTCAGTGTGCCACGGCAC
- [0351] 참조 TGCTGGGGCCAGGGCCCACCCAGTGTCACTGCAGTCATTCCCTCGGGGCCAGGAG (서열번호: 24)
- [0352] Lm-LLO-138-2 TGCTGGGGCCAGGGCCCACCCAGTGTCACTGCAGTCATTCCCTCGGGGCCAGGAG
- [0353] Lm-LLO-138-3 TGCTGGGGCCAGGGCCCACCCAGTGTCACTGCAGTCATTCCCTCGGGGCCAGGAG
- [0354] Lm-ddA-164-1 TGCTGGGGCCAGGGCCCACCCAGTGTCACTGCAGTCATTCCCTCGGGGCCAGGAG
- [0355] LmddA164-3 TGCTGGGGCCAGGGCCCACCCAGTGTCACTGCAGTCATTCCCTCGGGGCCAGGAG
- [0356] Lm-ddA-164-6 TGCTGGGGCCAGGGCCCACCC-----
- [0357] IC1의 정렬 (HER2/neu의 2114-3042 bp)
- [0358] 참조 CGCCCAGCGGAGCAATGCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC (서열번호: 25)
- [0359] Lm-LLO-NY-2 CGCCCAGCGGAGCAATGCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
- [0360] Lm-LLO-138-4 CGCCCAGCGGAGCAATGCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
- [0361] Lm-ddA-164-2 CGCCCAGCGGAGCAATGCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
- [0362] Lm-ddA-164-3 CGCCCAGCGGAGCAATGCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
- [0363] Lm-ddA164-6 CGCCCAGCGGAGCAATGCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC
- [0364] 참조 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA (서열번호: 26)
- [0365] Lm-LLO-NY-1 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0366] Lm-LLO-NY-2 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0367] Lm-LLO-138-1 TAAGGAAGGTGAACGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0368] Lm-LLO-138-2 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0369] Lm-LLO-138-3 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0370] Lm-LLO-138-4 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0371] Lm-ddA-164-1 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0372] Lm-ddA-164-2 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0373] Lm-ddA-164-3 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0374] Lm-ddA-164-4 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0375] Lm-ddA-164-5 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0376] Lm-ddA164-6 TAAGGAAGGTGAAGGTGCTGGATCAGGAGCTTGGACTGTCTACAAGGGCATCTGGA
- [0377] 참조 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT (서열번호: 27)
- [0378] Lm-LLO-NY-1 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- [0379] Lm-LLO-NY-2 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- [0380] Lm-LLO-138-1 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- [0381] Lm-LLO-138-2 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- [0382] Lm-LLO-138-3 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- [0383] Lm-LLO-138-4 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT
- [0384] Lm-ddA-164-1 TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0385] Lm-ddA-164-2 TCCCAGATGGGAGAATGTGAAAATCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0386] Lm-ddA-164-3 TCCCAGATGGGAGAATGTGAAAATCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0387] Lm-ddA-164-4 TCCCAGATGGGAGAATGTGAAAATCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0388] Lm-ddA-164-5 TCCCAGATGGGAGAATGTGAAAATCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0389] Lm-ddA164-6 TCCCAGATGGGAGAATGTGAAAATCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

[0390] 참조 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC (서열번호: 28)

[0391] Lm-LLO-NY-1 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0392] Lm-LLO-NY-2 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0393] Lm-LLO-138-1 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0394] Lm-LLO-138-2 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0395] Lm-LLO-138-3 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0396] Lm-LLO-138-4 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0397] Lm-ddA-164-1 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0398] Lm-ddA-164-2 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0399] Lm-ddA-164-3 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0400] Lm-ddA-164-4 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0401] Lm-ddA-164-5 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0402] Lm-ddA164-6 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGTTCTC

[0403] 참조 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC (서열번호: 29)

[0404] Lm-LLO-NY-1 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0405] Lm-LLO-NY-2 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0406] Lm-LLO-138-1 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0407] Lm-LLO-138-2 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0408] Lm-LLO-138-3 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0409] Lm-LLO-138-4 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0410] Lm-ddA-164-1 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0411] Lm-ddA-164-2 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0412] Lm-ddA-164-3 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0413] Lm-ddA-164-4 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0414] Lm-ddA-164-5 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0415] Lm-ddA164-6 CGTATGTGTCCCGCCTCTGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTACACAGC

[0416] 참조 TTATGCCCTACGGCTGCCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC (서열번호: 30)

[0417] Lm-LLO-NY-1 TTATGCCCTACGGCTGCCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

[0418] Lm-LLO-NY-2 TTATGCCCTACGGCTGCCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

[0419] Lm-LLO-138-1 TTATGCCCTACGGCTGCCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

[0420] Lm-LLO-138-2 TTATGCCCTACGGCTGCCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

- [0421] Lm-LLO-138-3 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0422] Lm-LLO-138-4 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0423] Lm-ddA-164-1 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0424] Lm-ddA-164-2 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0425] Lm-ddA-164-3 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0426] Lm-ddA-164-4 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0427] Lm-ddA-164-5 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0428] Lm-ddA164-6 TTATGCCCTACGGCTGCCTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTGCCTAGGCTCC
- [0429] 참조 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC (서열번호: 31)
- [0430] Lm-LLO-NY-1 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0431] Lm-LLO-NY-2 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0432] Lm-LLO-138-1 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0433] Lm-LLO-138-2 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0434] Lm-LLO-138-3 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0435] Lm-LLO-138-4 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0436] Lm-ddA-164-1 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0437] Lm-ddA-164-2 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0438] Lm-ddA-164-3 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0439] Lm-ddA-164-4 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0440] Lm-ddA-164-5 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0441] Lm-ddA164-6 AGGACCTGCTCACTGGTGTGTTCAGATTGCCAAGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC
- [0442] 참조 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA (서열번호: 32)
- [0443] Lm-LLO-NY-1 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0444] Lm-LLO-NY-2 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0445] Lm-LLO-138-1 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0446] Lm-LLO-138-2 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0447] Lm-LLO-138-3 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0448] Lm-LLO-138-4 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0449] Lm-ddA-164-1 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0450] Lm-ddA-164-2 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0451] Lm-ddA-164-4 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0452] Lm-ddA-164-5 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0453] Lm-ddA-164-6 GGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCAACCACGTCA
- [0455] 참조 AGATTACAGATTTCGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG (서열번호: 33)
- [0456] Lm-LLO-NY-1 AGATTACAGATTTCGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0457] Lm-LLO-NY-2 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0458] Lm-LLO-138-1 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0459] Lm-LLO-138-2 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0460] Lm-LLO-138-3 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0461] Lm-LLO-138-4 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0462] Lm-ddA-164-1 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0463] Lm-ddA-164-2 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0464] Lm-ddA-164-3 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0465] Lm-ddA-164-4 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0466] Lm-ddA-164-5 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0467] Lm-ddA-164-6 AGATTACAGATTCGGGCTGGCTGGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

[0468] 참조 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA (서열번호: 34)

[0469] Lm-LLO-NY-1 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0470] Lm-LLO-NY-2 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0471] Lm-LLO-138-1 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0472] Lm-LLO-138-2 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0473] Lm-LLO-138-3 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0474] Lm-LLO-138-4 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0475] Lm-ddA-164-1 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0476] Lm-ddA-164-2 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0477] Lm-ddA-164-3 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0478] Lm-ddA-164-4 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0479] Lm-ddA-164-5 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0480] Lm-ddA-164-6 ATGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGATGGCATTGGAAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

[0481] 참조 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG (서열번호: 35)

[0482] Lm-LLO-NY-1 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0483] Lm-LLO-NY-2 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0484] Lm-LLO-138-1 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0485] Lm-LLO-138-2 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0486] Lm-LLO-138-3 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0487] Lm-LLO-138-4 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0488] Lm-ddA-164-1 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0489] Lm-ddA-164-2 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0490] Lm-ddA-164-3 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0491] Lm-ddA-164-4 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

[0492] Lm-ddA-164-5 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG

- [0493] Lm-ddA164-6 CCCATCAGAGTGATGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTGGGG
- [0494] 참조 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA (서열번호: 36)
- [0495] Lm-LLO-NY-1 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0496] Lm-LLO-NY-2 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0497] Lm-LLO-138-1 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0498] Lm-LLO-138-3 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0499] Lm-LLO-138-4 CCAAACCTTACGATGNAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0500] Lm-ddA164-6 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0501] Lm-ddA-164-2 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0502] Lm-LLO-138-2 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0503] Lm-ddA-164-3 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0504] Lm-ddA-164-5 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0505] Lm-ddA-164-1 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0506] Lm-ddA-164-4 CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA
- [0507] 참조 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT (서열번호: 37)
- [0508] Lm-LLO-NY-1 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0509] Lm-LLO-NY-2 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0510] Lm-LLO-138-1 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0511] Lm-LLO-138-2 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0512] Lm-LLO-138-3 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0513] Lm-LLO-138-4 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0514] Lm-ddA-164-1 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0515] Lm-ddA-164-2 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0516] Lm-ddA-164-3 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0517] Lm-ddA-164-4 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0518] Lm-ddA-164-5 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0519] Lm-ddA164-6 CGCCTACCTCAGCCTCAAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT
- [0520] 참조 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT (서열번호: 38)
- [0521] Lm-LLO-NY-1 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0522] Lm-LLO-NY-2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0523] Lm-LLO-138-2 GGATGATTGACTCTGAATGTCCCCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0524] Lm-LLO-138-3 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0525] Lm-LLO-138-4 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0526] Lm-ddA-164-1 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0527] Lm-ddA-164-2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT
- [0528] Lm-ddA-164-3 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGAGTTGGTGTCAAATTTT

- [0529] Lm-ddA-164-5 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAATT
- [0530] Lm-ddA-164-4 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAATT
- [0531] Lm-ddA164-6 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAATT
- [0532] 참조 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT (서열번호: 39)
- [0533] Lm-LLO-NY-1 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0534] Lm-LLO-NY-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0535] Lm-LLO-138-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0536] Lm-LLO-138-3 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0537] Lm-LLO-138-4 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0538] Lm-ddA-164-1 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0539] Lm-ddA-164-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0540] Lm-ddA-164-3 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0541] Lm-ddA-164-5 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0542] Lm-ddA-164-6 CACGTATGGCGAGGGACCCCAGCGTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT
- [0543] EC1의 정렬 (HER2/neu의 399-758 bp)
- [0544] 참조 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT (서열번호: 40)
- [0545] Lm-LLO-138-1 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT
- [0546] Lm-LLO-138-2 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT
- [0547] Lm-ddA-164-1 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT
- [0548] LmddA-164-2 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT
- [0549] LmddA-164-3 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT
- [0550] LmddA164-4 CCCAGGCAGAACCCCAGAGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAACGATCTCACAGAGATCCT
- [0551] 참조 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG (서열번호: 41)
- [0552] Lm-LLO-138-1 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG
- [0553] Lm-LLO-138-2 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG
- [0554] Lm-ddA-164-1 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG
- [0555] LmddA-164-2 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG
- [0556] LmddA-164-3 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG
- [0557] LmddA164-4 GAAGGGAGGAGTTTGATCCGTGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTG
- [0558] 참조 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC (서열번호: 42)
- [0559] Lm-LLO-138-1 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC
- [0560] Lm-LLO-138-2 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC
- [0561] Lm-ddA-164-1 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC
- [0562] LmddA-164-2 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC
- [0563] LmddA-164-3 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC
- [0564] LmddA164-4 CCGGGCCTGTCCACCTGTGCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGTGAGAGTCC

[0565] 참조 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG (서열번호: 43)

[0566] Lm-LLO-138-1 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0567] Lm-LLO-138-2 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0568] Lm-ddA-164-1 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0569] LmddA-164-2 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0570] LmddA-164-3 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0571] LmddA164-4 GGAAGACTGTCAGATCTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

[0572] 참조 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGCA (서열번호: 44)

[0573] Lm-LLO-138-1 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGCA

[0574] Lm-LLO-138-2 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGCA

[0575] Lm-ddA-164-1 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGCA

[0576] LmddA-164-2 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGTA

[0577] LmddA-164-3 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGTA

[0578] LmddA164-4 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCAAGTA

실시예 7: ADXS31-164로의 말초 면역화는 뇌에서의 전이 유방암 세포주의 성장을 지연시킬 수 있다.

[0580] 마우스를 ADXS31-164 또는 무관한 *Lm*-대조 백신으로 IP 면역화시킨 후 루시페라아제 및 낮은 수준의 HER2/neu를 발현하는 5,000개 EMT6-Luc 종양 세포를 두개내 이식하였다(도 6c). 종양을 접종 후 상이한 시간에 마취된 마우스의 생체외 이미징으로 모니터링하였다. 종양 접종 후 8일에 모든 대조 동물에서 종양이 검출되었으나, ADXS31-164 그룹에서의 마우스는 어떠한 검출가능한 종양도 보이지 않았다(도 6a 및 6b). ADXS31-164는 이들 종양의 발생을 명백히 지연시킬 수 있으며, 종양 접종 후 11일에 음성 대조군의 모든 마우스는 종양에 이미 굴복했으나, ADXS31-164 그룹의 모든 마우스는 여전히 생존해 있었고 종양 성장의 작은 징조만을 보였다. 이들 결과는 ADXS31-164의 말초 투여로부터 수득된 면역 반응이 중추 신경계에 가능하게 도달할 수 있으며 *LmddA*-기반 백신이 CNS 종양의 치료를 위한 유망한 용도를 가질 것임을 강하게 제안한다.

실시예 8: ADXS31-164로의 면역화에 의한 개과 골육종의 치료.

[0582] 개과 골육종은 10살 초과의 큰 개의 가장 중요한 사명요인인 긴(다리) 뼈의 암이다. 표준 치료는 진단 후 즉시 절단 및 뒤이은 화학요법이다. 그러나, 변함없이, 암은 폐로 전이된다. 화학요법으로, 개는 치료하지 않았을 때의 6개월 내지 12개월에 비해 약 18개월 생존한다. Her2 항원은 골육종의 50%까지 존재하는 것으로 여겨진다. ADXS31-164은 이 항원을 발현하는 세포에 면역 공격을 생성하고 인간 유방암을 치료하기 위해 개발되었다.

[0583] 골육종의 조직학적 진단 및 악성 세포에 의한 HER2/neu의 발현의 증거를 갖는 개는 등록이 가능하다.

개과 골육종 시험

[0585] 첫 번째 연대에서 다리는 절단된 후 화학요법 치료 라운드가 진행된다. 3개 용량의 Her-2 백신이 6개월 간격 부스터로 또는 이것 없이 뒤이어 투여된다.

[0586] 모든 개는 4주의 카보플라틴 요법을 받았다. 마지막 카보플라틴 용량 후 4주째에, 개는 총 3개 용량으로 3주마다 한번 ADXS-HER2를 받는다. 그룹 1(3마리 개)는 용량 당 1×10^8 CFU를 받고, 그룹 2(3마리 개)는 각각 용량 당 5×10^8 CFU를 받고 그룹 3(3마리 개)은 용량 당 1×10^9 CFU를 받는다. 잠재적으로 독성을 제한하는 용량이 관찰되어야 하는 경우 추가 개들이 더 많은 데이터를 모으기 위해 그룹에 추가된다. 그러므로 9마리 내지 18마리 개들이 초기 연구에서 치료될 수 있다.

[0587] 두 번째 연대에서, 단일 용량의 백신만이 총 4개 용량에 대해 화학요법하기 전(1개월 전)에 투여되는 것을 제외하고는 동일하게 반복된다.

[0588] 또한, 두 연대 모두에서 단일 용량이 화학요법 후 1달에 투여된다.

[0589] **실시예 9: HER2/NEU 과발현 개과 골육종을 갖는 동반자 개에서 ADXS-cHER2의 안정성을 평가하는 1상 용량 단계적 증가 연구**

[0590] 파일럿 1상 용량 단계적 증가 연구는 골육종을 갖는 개에서 종양-특이 면역을 안전하고 효과적으로 자극할 수 있는 인간 HER2/neu 재조합 백신을 발현하는 *L. 모노사이토케네스*의 용량을 결정하기 위해 실시되었다. 의심되거나 확인된 OSA에 기인하는 다리 결단에서 PennVet을 제시하는 모든 개의 종양을 일상적으로 수집하여 OSA의 진단을 확인하기 위해 조직병리학적으로 평가하였다. 게다가, 모든 개로부터의 종양 색션을 IHC 및 웨스턴 블로트으로 평가하여 종양이 HER2/neu를 발현하는지를 결정하였다. OSA의 조직학적 진단 및 악성 세포에 의한 HER2/neu의 발현의 증거를 갖는 개만이 등록이 가능하였다. 수술로부터 얻어진 종양 조직의 단일 세포 혼탁액을 냉동보관하여 항-종양 면역성을 결정하기 위해 크롬 방출 분석에서 자가 종양 표적으로서 사용된다.

[0591] 부속지 OSA 및 확인된 Her2-neu의 발현을 갖는 18마리까지의 개인 소유의 개가 등록되었다(도 7). 등록(마지막 카보플라틴 치료 후 3주)에서, 모든 개는 완전 혈구 측정(CBC), 화학 스크린(CS) 및 요검사(UA)를 포함하는 기본 임상 실험실 테스트 및 심장초음파에 의한 심장 기능의 기선 평가 및 심장-특이 트로포닌 I (cTnI) 수준의 측정을 받았다. 흉부 방사선 사진은 폐 전이가 존재하는지를 결정하기 위한 것이다. 폐 전이 증거가 없는 개만이 연구에 포함될 수 있었다. 등록 시간에서, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)가 항-종양 면역성의 기선 수준을 평가하기 위해 수집된다(항-종양 면역성의 평가 참조). 게다가, 카보플라틴에 의해 면역이 더 이상 억제되지 않음을 보장하는 기저 면역 기능을 평가하기 위해 혈액을 수득하였다. 기능적으로 온전한 면역 시스템을 갖는 개만이 리스테리아 백신을 받을 수 있었다.

[0592] ***Lm* 재조합체 투여 및 데이터 수집**

[0593] 모든 개는 단일 ADXS31-164ADXS31-164 재조합 백신을 사용하여 예방접종되었다. 첫 번째 *Lm*-huHer2-neu 백신은 마지막 카보플라틴 용량 후 3주에 주어졌으며 총 3개 용량에 대해 이 이후 3주마다 1회 주어졌다(도 7).

[0594] 그룹 1(3마리 개)은 ADXS31-164(*Lm*-인간 chimericHER2/neu) 백신을 용량 당 1×10^8 CFU로 받았고, 그룹 2(3마리 개)는 각각 용량 당 5×10^8 CFU per로 받았고, 그룹 3(3마리 개)은 용량 당 1×10^9 CFU로 받았고, 용량 당 3.3×10^9 CFU로 받았다(1마리 개). 재조합 *Lm*은 30분에 걸쳐 천천히 정맥내 주입으로 투여된다. 그룹 1에서 선택된 용량은 마우스에서 키메라 ADXS31-164 재조합체에 대해 구축된 안전한 용량이다. 인간에서, 로박신 C에 대한 비-독성 용량이 마우스에서 구축된 것보다 더 높은 오직 하나의 로그이며, 이 용량은 이 파일럿 시험에서 그룹 3에서 평가된 용량이다.

[0595] *Lm* 투여 시간에, 개는 전신성 부작용의 증거에 대해 모니터링되었다. 주입 동안, 심박동수 및 심장 리듬이 ECG에 의해 모니터링되었으며 호흡 속도가 기록된다. 또한, 심장 손상이 초음파의 사용 및 트로포닌 I 수준의 측정에 의해 모니터링되었다(도 8). 주입 후, 개는 48시간 동안 밀접하게 모니터링된다. 중심 체온이 MiniMitter Respirationics(본 발명자의 Veterinary Clinical Trials Center에서 일상적으로 사용됨, VCIC)에 의해 Vital Sense 지속 체온 모니터링 시스템을 사용하여 주입 후 12시간 미만 동안 지속적으로 모니터링된다. 맥박수, 리듬 및 질, 호흡 속도 및 노력뿐만 아니라 혈압 및 체온도 처음 6시간 동안 매 시간마다 그 후 4시간마다 모니터링되고 기록되었다(도 9). 면역 자극과 일치하는 모든 증상은 주목되고 유체, 진통제, 항-구토제 및 항-히스타민이 심각한 반응을 조절하는데 필수적으로 사용된다. 모든 개는 하루에 6번 관찰되며 불편함, 무기력, 메스꺼움, 구토 및 설사를 포함하는 재조합체의 독소 효과의 임의의 사인이 기록되었다. 혈액 시료는 전신 투여 후 *Lm*의 청소율을 평가하기 위해 배양에서 첫 번째 ADXS31-164 백신 후 24, 48 및 72시간에 수득되었다.

[0596] **항-종양 면역성의 평가**

[0597] 마지막 카보플라틴 용량 후 3주에, 개는 일상적인 임상 조사 및 CBC, CS, UA 및 cTnI 수준을 포함하는 기저 혈액 작업을 받는다. PBMC는 항-종양 면역성의 기선 평가를 위한 이 시간에 수득된다. 반복된 면역 평가는 각 예방접종의 시간 및 마지막 예방접종 후 3주에 수행된다. PBMC는 하기 묘사된 바와 같이 자가 종양 표적으로 대항하는 CFSE 증식, 사이토카인 생산(ELISpot 및 qRT-PCR) 및 CTL 분석에 의해 HER2/neu 특이 T 세포 반응에 대해 분석된다(도 12).

[0598] **결과**

[0599] 지금까지 발명자는 16마리 개에서 ADXS31-164의 총 41개 주입을 수행하였다.

개의 수	주입수	방식
1	5	전이 질병을 치료하기 위해 프라이밍 시리즈 후 2개 추가 주입
4	4	종양이 없는 상태를 유지하기 위한 프라이밍 시리즈 후 하나의 추가 주입
4	3	종료된 스케줄의 프라이밍 시리즈
1	2	프라이밍 코스의 종료 전에 전이 질병에 굽복
2	1	프라이밍 코스의 종료 전에 전이 질병에 굽복
4	1	진행 중인 백신화의 프라이밍 코스

[0600] [0601] ADXS31-164 용량은 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 및 3.3×10^9 CFU로부터의 범위를 갖는다.

받은 용량	투여된 용량의 총수	개의 수	보고된 부작용
1×10^8	9	3	열, 메스꺼움, 구토, 상승된 간 효소
5×10^8	9	3	열, 메스꺼움, 구토, 상승된 간 효소
1×10^9	17	10	열, 메스꺼움, 구토, 상승된 간 효소, 혈소판 감소
3.3×10^9	1	1	메스꺼움, 구토,

[0602] 백신 투여를 위한 표준 운영 과정

[0603] 표준 운영 과정이 ADXS31-164의 투여를 위해 개발되었다. 예방접종 1시간 전에 환자는 근육내 주입을 통한 2 mg/kg 디펜하드라아민 및 느린 정맥내 푸쉬로서 0.2 mg/kg 온단세트론을 받았다. 백신은 -80°C에서 유지되고 환자측에서 해동되었다. 30분에 걸쳐 200 ml의 0.9% NaCl로 투여되었다. 그런 다음 주입선은 30 ml의 Plasmalyte로 씻어내렸다. 개는 세포 성장 및 회복을 원조하는 아목시실린의 3일 코스(예방접종 후 72시간에 시작) 및 간 보충제의 7일 코스(S-아데노실-메티오닌)와 함께 집으로 보내진다.

[0604] [0605] 연구의 초기 종점은 ADXS31-164의 최대 내량을 결정하기 위한 것이었다.

[0606] 3.3×10^9 까지의 용량이 25 kg 내지 67 kg의 체중 범위의 개에서 잘 용인되었다. 보고된 모든 부작용이 I 등급 독성이었으며 최대 내량은 도달할 수 도 있을 것이다. 부작용은 백신 투여 후 2시간 내지 4시간 내에 일상적으로 발생하였다. 고열은 일반적으로 2시간 내지 4시간 동안 유지 비율(4mls/kg/시)에서 수송되는 정맥내 등장액으로 해결되었다. 열이 104.7 및 그 이상에 다다른 두 경우에서, 카프로펜의 단일 피하 주입은 1-2시간 내에 정상 체온을 유도하였다. 메스꺼움 및 구토는 일반적으로 자기-제한적이나 심한 에피소드가 주목되는 경우에, 1 mg/kg의 세레니아가 투여되고 이는 추가 메스꺼움 및 구토를 예방하는데 매우 효과적이었다. 총 5마리 개에서 백신 투여 48시간 내에 간 효소의 경미한 I 등급 상승이 발달되었으나 - 이들은 예방접종 후 1주 안에 해소되었다.

[0607] 리스테리아의 청소율

[0608] 지금까지 예방접종된 16마리 개 모두에서 혈액 배양을 수행한 후에 예방접종 후 24시간에 어느 개에서도 말초 순환에서 리스테리아가 검출되지 않았다. 예방접종된 개의 소변 및 배설물에서의 리스테리아의 배출은 평가되지 않았다.

[0609] 연구의 두 번째 종점은 진행 없는 생존율 및 전체 생존율이다. 골육종을 갖는 개에서 유리한 통계학적으로 유의한 전체 생존율은 ADXS31-164가 다리 절단 및 카보플라틴의 4개 용량 후 투여됐을 때 관찰되었다. 처음 두 용량 그룹(6마리 개)으로부터의 초기 결과는 주인이 시험에 참석하지 않기로 선택했지만 결과적으로 생존한($p = 0.003$) 6마리 개에 비해 ADXS31-164를 받은 개에서 유의한 생존 이점을 보인다(도 13). 예방접종되지 않은 개의 평균 생존 시간은 239.5일이다. 예방접종된 개의 평균 생존 시간은 아직 도달하지 않았다. 이는 그룹을 치료하기 위한 의도 내에서 모든 개가 분석에 포함됐을 때 여전히 사실이다.

[0610] 결론에서, 심혈관, 조혈, 간, 또는 신장 시스템에 유의한 단기간 또는 장기간 부작용이 있다는 증거가 없다. 게다가, 최소 잔류 질병의 존재시 ADXS31-164의 투여는 전이 질병을 지연/예방할 수 있으며 HER2/neu 양성 골육종을 갖는 개의 전체 생존율을 연장시킬 수 있다.

[0611] 실시예 10: 골수종(OSA)의 자발적 개과 동물 모델에서 ADXS31-164를 평가하는 1상 임상 시험

[0612] 물질 및 방법

[0613] 백신 제조

- [0614] ADXS31-164의 설계 및 생성. 간략하게, 리스테리아 모노사이토케네스 (*Lm*)의 *dal* *dat* *actA* 돌연변이 균주를 키메라 인간 HER2/neu 구성물을 수송하는 pADV 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 구성물을 말단이 절단된 리스테리오리신 O 구성물에 융합된, 다수의 HLA-A2 제한 면역우성 에피토프를 함유하는 인간 HER2/neu 분자의 2개의 세포의 도메인(EC1 및 EC2) 및 1개의 세포내 도메인(IC1)을 함유한다. 전달 플라스미드는 또한 바실러스 p60 *dal* 유전자를 포함하며 영양요구성 보완을 통한 돌연변이 *Lm* 내로 유지된다. 박테리아 저항 카세트는 없다. 백신은 Vibalogics GmbH (Cuxhaven, Germany)에 의해 제조되며 사용 전에 -80°C에서 저장된다.
- [0615] 조직병리학적, 단계적 및 면역조직화학적
- [0616] 모든 원발성 부속지 골육종 종양의 조직병리학적 평가는 면허가 있는 수의과 병리학자에 의해 수행되었다 (J.E.). 종양은 조직학적 특성에 기반한 골아 세포, 조연골 세포, 섬유아세포 및 모세혈관화장성으로서 기재되었다. 원발성 종양은 분열 지수, 핵 다형태성 및 존재하는 매트릭스 및 괴사의 수에 기반하여 점수를 매겼다. 조직학적 점수는 등급(I, II 또는 III)으로 전환되었다.
- [0617] HER2/neu 염색에서, 포르말린 고정되고, 탈석회화된 파라핀에 끼워진 조직의 5 마이크론 두께의 연속 섹션이 음전하의 유리 슬라이드 상에 올려졌다. 섹션은 80°C에서 20분간 가열되고, Pro Par (클리어런트) 내에 함침되고 에탄올로 재-수화되었다. 항원 회수는 시트르산나트륨 버퍼(pH ~9.0)를 끓여 수행되었다. 내인성 페옥시다아제는 3% 과산화수소를 사용하여 차단되었다. 염색은 토키 항-인간 HER2/neu 항체(Neu(c-18):sc-284, Santa Cruz Biotechnology) 또는 토키 IgG 동형(Universal Negative Control serum, NC498, Biocare Medical)으로 수행되었다. 결합된 항체는 Universal Streptavidin-Biotin2 System (DAKO/LSAB2, HRP)을 사용하여 검출되었다. 조직은 3,3'-디아미노벤자린 용액(DAKO)으로 염색되었으며 헤마톡실린으로 대비염색되었다. 슬라이드는 Nikon E600 무한 보정 정립 현미경을 사용하여 보여졌다. 명시야 이미지는 Nikon Digital Sight DS-Fi1 컬러 카메라 및 이미지 분석용 NIS-Element BR3.0을 사용하여 습득되었다. 조직 섹션은 면허가 있는 병리학자에 의해(J.E.) HER2/neu에 대한 신생세포 염색(< 10% = 1, 10%~50% = 2, > 50% = 3) 및 HER2/neu 염색의 강도(약함 = 1, 중간 = 2, 강함 = 3)의 백분율에 근거하여 HER2/neu 확실성에 대해 평가하고 점수를 매겼다. 점수는 각 조직 섹션에 대해 10 hpf 이내로 분석된 세포에 근거하였다. 결합된 HER2/neu 점수는 HER2/neu 염색에 대해 양성인 종양 세포의 백분율 및 HER2/neu 염색 강도의 백분율로 주어진 두 개의 개별 점수를 합해 얻었다. HER2/neu에 대해 양성인 10% 초과의 이들의 종양 세포 염색을 갖는 개들만이 시험등록이 가능하였다.
- [0618] 자격 기준 및 임상 실험 설계
- [0619] 다리 절단 또는 다리-스페어링 수술(limb-sparing surgery)에 의해 원발성 종양이 제거되고 3주마다 한 번씩(또는 골수억제가 일어날 경우 4주마다 한번) 아주번트 화학요법으로서 주어지는 4회 용량의 300 mg/m² 카보플라틴을 받은, HER2/neu 양성 OSA의 조직병리학적 및 면역조직화학적 진단을 갖는 개는 스크리닝 자격이 있었다. 개는 그들의 마지막 카보플라틴 치료 후 3주째에 스크리닝되었다. 빈틈없는 물리적 검사인 완전 혈구 측정(CBC), 화학 스크린(CS) 및 요검사 (UA)를 일반적인 건강 상태를 결정하기 위해 수행하였다. 기본적인 선천적 면역 기능 및 적응 면역 기능을 각각 유동 세포 분석 호중구 산화 과열 분석 및 미토겐-유도 림프구 증식 측정을 사용하여 테스트하였다. 기선 심장 상태를 심전도기록법, 초음파 심장 검진 및 혈청 심장 트로포닌 I 수준으로 평가하였다. 흉부 방사선 사진은 폐 전이 질병의 존재를 결정하기 위해 수행되었다 (도 14B 참조). 온전한 선천적 면역기능 및 적응 면역 기능을 갖고 심장 질병을 앓고 있는 증거가 없고 폐 전이 질병의 증거가 없는 전신적으로 건강한 것으로 여겨지는 이들 개만이 등록 자격이 있었다. 연구 과정 동안 사망한 개는 부검하였다. 전이 질병의 존재 및 위치가 기록되었으며 전이 병변에서 HER2/neu 발현을 평가하기 위한 조직병리학 및 면역조직화학이 수행되었다.
- [0620] 면역 분석
- [0621] 호중구 산화 과열 분석. 헤파린 나트륨 항-응고 혈액 내의 적혈구 세포는 0.83% NH₄Cl을 사용하여 용해되었으며 남아있는 백혈구 세포는 1 x PBS로 2회 세척되었다. 세포는 15ug/ml의 디하이드로로다민 123(DHR-123; Molecular Probes, Grand Island, NY)으로 표지되고 37°C에서 30분 동안 3 nM 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA, Sigma, St. Louis, MO)로 활성화되었다. 세포는 유동세포 측정 분석 전에 15분 동안 열음 상에 위치시켰다. 세포는 FACS Canto 세포측정기(BD Biosciences, San Jose, CA)로 획득되고 FloJo 소프트웨어 (Treestar, San Carlos, CA)를 사용하여 분석되었다.
- [0622] 림프구 증식 분석. 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)는 밀도 원심분리에 의해 헤파린 나트륨 항-응고 전체 혈액으로부터 분리되었다. PBMC는 1 x PBS로 2회 세척되고 계수되었다. 세포는 5 uM CFSE로 표지되고 37°C에서 5일간

1.25 uM 콘카나발린 A로 자극되었다. 세포는 수확되고 FACS 버퍼 내에서 2회 세척되고, APC-접합 랫 항-개과 CD4 및 PE 접합 랫 항-개과 CD8 항체(Serotec, Raleigh, NC)로 표지되고 유동 세포 측정으로 분석되었다. 면역 기능 분석에서, 건강한 콜로니 개(IACUC #804197)로부터 입수한 말초 혈액을 양성 대조로서 사용하였다.

[0623] T 세포 서브세트 분석. 각 예방접종 전, 재-실행시 및 그후 2달마다 기선에선 획득한 PBMC를 CD4 및 CD8 T 세포 서브세트에 대해 분석하였다. 간략하게, 냉동된 세포를 해동하고 마우스 항-개과 CD3, PE-표지 랫 항-개 CD8 또는 Alexa-표지 랫 항-개 CD4 (Serotec, Raleigh, NC)로 표면 염색하기 전에 FACS 버퍼(1x PBS, 0.2% BSA 분획 V, and 4 mM 아지드화나트륨)로 2회 세척하였다. 세포를 유동 세포 측정 습득 전에 바로 필수 염료 7-ADD과 함께 인큐베이션하였다. 전체CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 수를 유동 세포 계측 백분율 및 Cell Dyn 3700CS 혈액학 분석기를 사용하여 결정된 총 림프구 계수로부터 계산하였다.

[0624] 백신 투여

[0625] 예방접종 전에, 개는 메스꺼움 및 아나필락시스를 각각 예방하기 위해 5HT3 길항제 온단세트론(0.2mg/kg)을 정맥내로 받고 H1 수용체 차단제인 디펜히드라민(2mg/kg)을 근육내로 받았다. 표준 3+3 임상 실험 설계가 사용되었다. ADXS31-164는 하기 용량으로 투여되었다; 그룹 1(2×10^8 CFU), 그룹 2(5×10^8 CFU), 그룹 3(1×10^9 CFU) 및 그룹 4(3.3×10^9 CFU). ADXS31-164는 100 ml의 0.9% NaCl(그룹 1 및 2) 및 200 ml의 0.9% NaCl(그룹 3 및 4)로 희석되었으며 정맥내로 30분에 걸쳐 투여되었다. 온도, 맥박, 호흡 속도, 심박동수 및 리듬(EKG에 의한) 및 혈압이 주입 후 매 시간마다 모니터링되었다. 체온이 103^F를 초과하는 경우에, 체온이 103^F 이하로 떨어질 때까지 4 ml/kg/hr으로 정맥내 Plasmalyte 상에 개를 위치시켰다. 개는 무기력, 메스꺼움 또는 구토의 징후에 대해 매 시간마다 모니터링되었다. 혈액 시료를 예방접종 후 24시간 및 1주째에 뽑아 혈액학 또는 생화학 파라미터에서의 임의의 변화를 평가하였으며 혈액 배양을 예방접종 후 24시간째에 수행하여 혈류에서 살아있는 박테리아의 잔존율을 결정하였다. 모든 개는 임의의 잔류 리스테리아를 죽이고 간에 대한 항-산화 지지체를 제공하기 위해 예방접종 후 72시간에 짧은 코스의 아목시실린 및 S-아데노실메티오닌(SAMe)을 받았다.

[0626] 초기 시리즈에서 마지막 백신을 받은 후 적어도 5달째에 전이 질병이 없는 개를 가진 주인은 1×10^9 CFU의 표준 용량으로 부스터 백신을 받는 옵션을 제안받았다. 부스터 백신은 기재된 바와 같이 투여되었으며 개는 상기 기재된 바와 같이 주입한 후 모니터링되었다.

[0627] 독성

[0628] 독성은 Veterinary Co-operative Oncology Group- Common Terminology Criteria for Adverse Events(VCOG-CTCAE)에 따라 등급화되었다. 심장 독성의 평가는 기선, 각 예방접종 시점, 마지막 예방접종 후 3주째, 및 그 이후 사망까지 2달마다 일련의 심전도, 초음파 심장진단도 및 혈청 심장 트로포닌 I 수준을 통해 수행되었다. 평가되는 파라미터는 좌심실 분획 단축(LVFS) 및 확장기에서의 좌심실 내부 면적(LVIDd) 및 수축기에서의 좌심실 내부 면적(LVIDs)을 포함하였다. LVIDd 및 LVIDs는 개들 중에서 광범위한 신체 크기에 대해 설명하기 위해 체중에 대해 표준화되었다.

[0629] ELISpot 분석

[0630] 각각의 표시된 시점에서의 저온보존된 PBMC를 해동하고 37^{oC}에서 밤새 둔 다음 계수하였다. 세포는, 5일 동안 키메라 백신에 존재하는 HER2/Neu의 EC1, EC2 및 IC1 도메인 및 재조합 인간 IL-2 (Invitrogen, Fredrick, MD)를 나타내는 중복 인간 HER2/Neu 웨პ티드(5개 아미노산에 의해 중복된 11량체)의 2.5 uM 풀로 자극되었다. 세포는 수확되어 $1 \times$ PBS로 2회 세척되고 계수되었다. IFN- γ ELISpot 분석은 시판되는 개과 IFN- γ ELISpot 분석 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 수행되었다. 간략하게, 0.8 - 2 $\times 10^5$ 자극된 세포를 IL-2이 더해진 2.5 uM의 EC1, EC2 또는 IC1 웨პ티드 풀 또는 IL-2 단독(백그라운드 계수를 결정하기 위해)으로 자극하였다. 모든 분석은 삼중으로 수행되었다. 플레이트는 제조업자의 지시에 따라 현상되었다. 스팟을 CTL-면역스팟 분석기(C.T.L, Shaker Heights, OH)를 사용하여 계수하였다.

[0631] 1차 및 2차 결과 측정

[0632] 전이에 대한 시간(TTM)을 전이 질병의 절단 및 발병 사이의 시간으로서 계산하였다. OSA 특이 생존율을 절단 및 사망 사이의 시간으로서 계산하였다. 관련되지 않은 원인으로 사망한 환자는 그들의 사망 시점에서 삭제되었다.

[0633] 결과

[0634]

자격 기준을 충족하는 18마리 개를 1상 임상 실험에 등록하였다. 연령, 품종, 성별, 종양 위치, 아형, 등급 및 HER2/neu 상태가 기록되었다(표 4). 표준 3+3 임상 실험 설계가 사용되었다. ADXS31-164는 하기 용량으로 투여되었다; 그룹 1: 2×10^8 CFU (n = 3), 그룹 2: 5×10^8 CFU (n = 3), 그룹 3: 1×10^9 CFU (n = 9), 및 그룹 4: 3×10^9 CFU (n = 3). 스크리닝 시점에 확인된, 이미 존재하는 폐 전이 질병을 갖는 추가 5마리 개 또한 특별 케어 기준으로 ADXS31-164를 받았다(표 4). 이들 개 중 4마리는 그들의 원발성 종양으로부터 50% 초과의 신생 세포에서 강한 HER2/neu 염색을 가졌다. 이들 개 중 3마리는 다수의 폐 전이 결절을 가졌으며 2마리 개는 스크리닝에서 단일 전이 결절을 가졌다. 다수의 폐 결절을 갖는 개는 대안 치료를 위한 연구에서 각각 질병 진행 및 철회 전에 하나의 백신을 접종받았다. 단일 결절을 갖는 2마리 개는 3개 백신 각각의 전체 코스를 접종받았다. 이미 존재하는 전이 질병을 갖는 개는 1×10^9 CFU (n = 3) 또는 3×10^9 CFU (n = 2) ADXS31-164를 받았다(표 5).

[0635]

도 15는 3회의 예방접종이 절단 및 뒤이은 화학요법 후 투여되는, 1상 임상 실험의 시각표의 도식을 보인다.

[0636]

표 4: 등록된 개의 인상착의 및 종양 특징

연령	품종	성별	종양 위치	아형	등급	HER2 점수	용량	전체 생존율(일)
그룹 1								
12.5	아메리칸 퍼블	FS	견위부 상완골	골아 세포	II	2	2×10^8	738
11.5	흔혈품종	FS	요골 원위부	골아 세포	I	5	2×10^8	267
9	래브라도	MC	견위부 상완골	섬유아세포	II	7.5	2×10^8	977+
그룹 2								
6	흔혈품종	FS	경골 원위부	골아 세포	I	4.5	5×10^8	943+
7	로트와일러	MC	척골 원위부	골아 세포	III	2.25	5×10^8	925
4.5	잉글리쉬 불독	MC	견위부 상완골	골아 세포	I	4	5×10^8	346
그룹 3								
6	OES	MC	원위 대퇴골	골아 세포	II	1.5	1×10^9	744+
9	그레이하운드	MC	견위부 상완골	골아 세포	II	5	1×10^9	444
8	골든 리트리버	MC	척골 원위부	섬유아세포	I	3	1×10^9	488+
2	래브라도	FS	근위 경골	섬유아세포	I	4.5	1×10^9	438+
7.5	카바리에 강	FS	근위 경골	골아 세포	II	7.5	1×10^9	439+
6.5	골든 리트리버	FS	요골 원위부	골아 세포	I	4.5	1×10^9	430+
10	그레이하운드	MC	원위 대퇴골	골아 세포	II	2	1×10^9	276
5.5	래브라도	MC	원위 대퇴골	골아 세포	I	9	1×10^9	312+
9	골든 리트리버	FS	원위 대퇴골	골아 세포	I	6	1×10^9	336+
그룹 4								
6.6	그레이트 레인	MC	요골 원위부	골아 세포	II	7.5	3×10^9	259
7	흔혈품종	MC	견위부 상완골	골아 세포	II	9	3×10^9	345+
6.5	로트와일러	FS	견위부 상완골	골아 세포	II	6	3×10^9	332+

[0637]

[0638]

표 5: 특별 케어 기준으로 치료된 이미 존재하는 전이 질병을 갖는 개의 인상착이 및 종양 특징

연령	품종	성 별	종양 위치	아형	등급	HER2 점수	용량	전체 생존율(일)
전이 질병을 갖는 백신 그룹								
5	네오플리탄 마스티프	MC	요골 원위부	섬유아세포	I	7.50	1 x 10^9	233
6.5	그레이트 레인	FS	요골 원위부			6	1 x 10^9	256
2	래브라도	F	근위 비골	골아 세포	III	7.5	1 x 10^9	153
6.5	베르니즈 마운틴 개	FS	척골 원위부	골아 세포	III	8.25	3 x 10^9	336
7	로트와일러	MC	요골 원위부	골아 세포	II	4.00	3 x 10^9	231

[0639]

결과

[0640]

안전성 및 독성 = 안전성은 모든 23마리 예방접종된 개에 대해 평가되었다. 모든 개는 예방접종 일자에 관찰된 일시적이고 낮은 등급의 독성을 갖는 ADXS31-164 투여를 잘 견뎠다(표 6). 체온에서의 통계학적으로 유의한 증가는 용량과 관계없이 모든 그룹에서 ADXS31-164 투여 후 4시간 동안 발생했다(도 9A). 저혈압은 임의의 시점 또는 임의의 용량에서 관찰되지 않았다(도. 9B). 8/18의 개(이미 존재하는 전이 질병 없음) 및 3/5의 개(이미 존재하는 전이 질병 있음)는 예방접종의 4시간 내에 103°F 초과의 열이 발생하며 그 시간에 정맥내 유체가 주어졌다. 3마리 개는 체온을 감소시키기 위해 비-스테로이드성 항-염증 약물의 단일 용량을 받았다. 모든 경우에서, 열은 추가 개입 없이 해결되었다. 치료학적 개입이 필요하지 않은 일시적인 무기력, 메스꺼움 및 구토는 용량에 관계없이 예방접종의 4시간 내에 발생하였다. 2마리 개에서 일시적인 단일 또는 이중 심실 조발 수축이 예방접종 후 짧게 확인되었다. 이미 존재하는 전이 질병을 갖는 1마리 개는 예방접종의 2시간 내에 심실 심실 빙박이 발생했다. 리도카인, 프로카인아미드, 소탈롤 및 코르티코스테로이드로의 치료는 효과가 거의 없으나 부정맥은 72시간 내에 해결되었다. 백혈구 및 호중구 계수에서의 일시적이지만 통계학적으로 유의한 증가는 ADXS31-164 후 24시간에 발생하였으며 혈소판 및 림프구의 감소를 수반하였다(도 17). ADXS31-164 용량과 혈액학적 변화의 규모 사이의 연관성은 없지만, 생존한 개와 사망한 개 사이에 백혈구, 호중구 및 단핵구 반응의 규모에 상당한 차이가 있었다(도 18a 내지 도 18f). 간 효소의 혈청 농도에서 온화한 일시적인 증가는 간친화성 리스테리아에 의해 발생하는 약한 염증과 일치하는 것으로 대략 절반의 개에서 발생했다(표 6). 말초 혈액에서 확인된 모든 변화는 증상이 없었으며 ADXS31-164 투여 일주일 내에 해결되었다. 임의의 개에서 신장 기능의 유의한 변화는 기록되지 않았다. 19/23의 개는 ADXS31-164 투여 후 24시간째에 혈액 배양을 실시하였으며 모두 음성이었고, 이는 매우 약독화된 *LmddA* 균주의 신속한 제거와 일치하는 것이다.

[0642]

HER2/neu 표적화 모노클로날 항체가 심장 독성을 야기함을 고려하여 본 발명자는 기선, 각 예방접종 전 및 그 후 2달마다 심장 트로포닌 I, 분획 단축 (%), LVIDd 및 LVIDs를 포함하는 심장 손상의 바이오마커 및 기능부전의 초음파심박동 측정을 평가하였다. 임의의 예방접종된 개에서 심장 트로포닌 I, 분획 단축, LVIDd 또는 LVIDs에서의 유의하고 지속적인 변화는 확인되지 않았다 (도 26a 내지 도 26a). 그룹 3에서의 1마리 개는 각 예방접종 시간에 혈청 심장 트로포닌 I의 단계적인 증가를 보였으나, 이는 기능부전의 초음파심박동기록의 정후를 수반하지 않았다. 수치는 마지막 예방접종 후 기선으로 돌아갔으며 반복된 평가에서 상승하지 않았다.

[0643]

임상 실험 동안 심장 트로포닌 I 수준이 도 25(a 내지 d)에 보여지는 바와 같이 분획 단축, 수축기에서 좌심실 내부 직경(LVIDs) 및 확장기에서 LVID(LVIDd)와 함께 측정되었으며, ADXS31-164의 투여 후 장기간 또는 단기간 심장 독성의 증거가 없었다.

[0644]

하기 표 6은 임상 실험 동안 최소 치료 관련 부작용이 보고되었음을 보이는 데이터를 나타낸다.

[0645]

표 6: ADXS31-164 예방접종에서 또는 이의 48 시간 내에 발생하는 치료 관련 부작용.

치료 관련 부작용을 갖는 개의 수					
ADXS31-164 용량	2×10^8	5×10^8	1×10^9	3×10^9	총
구성된 개의 수	3	3	11	6	23
일반 장애					
발열($T > 103$)	등급 1	2	1	5	13
피로	등급 1	1	0	7	2
매스꺼움	등급 1	1	2	10	15
	등급 2	1	0	0	1
구토	등급 1	1	2	9	15
	등급 2	2	0	0	5
심혈관 기형					
부경맥	등급 1	0	1	0	1
	등급 2	0	0	1	1
심박 급속증	등급 1	0	0	2	1
	등급 2	0	0	1	1
저혈압		0	0	0	0
고혈압	등급 1	2	3	8	18
혈액학 파라미터					
혈소판감소증	등급 1	2	2	6	3
	등급 2	0	0	2	1
생화학적 파라미터(증가률)					
γ -GT	등급 1	0	2	1	0
	등급 1	0	1	6	1
ALKP	등급 2	0	0	0	1
	등급 3	1	0	0	1
ALT	등급 1	1	1	3	0
	등급 2	0	0	0	1
AST	등급 3	1	0	0	1
	등급 1	1	1	4	2
AST	등급 2	0	0	2	0
	등급 3	0	0	1	0
BUN		0	0	0	0
CREA		0	0	0	0
심장 트로포닌 I	등급 1	0	0	1	1

[0646]

결론: ADXS31-164 독성을 낮은 등급이며 일시적이다.

ADXS31-164에 대한 면역 반응

도 18에 나타난 결과는 백신을 접종받은 개에서 ADXS31-164에 대한 초기 면역 반응이 개의 생존을 예상하였음을 입증한다. 도 18은 ADXS31-164가 WBC, 호중구 및 단핵구 계수에서의 증가를 유도하였으며, 이는 생존과 연관된 것이고 혈소판 및 림프구에서 일시적인 감소를 수반하는 것임을 보인다(도 17).

[0650]

면역반응을 유도하고 유지하는 ADXS31-164의 능력 및 특히 HER2/Neu 특이 T 세포 면역성을 유도하는 ADXS31-164의 능력은 임상 실험 동안 평가되었다. 면역 반응을 평가하고 HER2/Neu 특이 T 세포 반응이 ADXS31-164에 의해 유도되는지를 결정하기 위해, HER2/Neu 특이 T 세포 수를 IFN- γ ELISpot으로 평가하였다. 시료는 기선(카보플라틴 후 3주), 예방접종때마다 및 그 후 2달마다 수득되었다. 도 19는 ELISpot 분석의 결과를 보인다.

[0651]

HER2/neu 특이 면역 반응. HER2/neu의 인간 EC1, EC2 및 IC1 도메인(개과 HER2/neu와 각각 89%, 93% 및 98%의 동일성을 공유함)에 대한 면역학적 반응은 각각 4/18, 6/18 및 1/18의 개에서 기선에서 검출되었다. 하나 이상의 Her2/neu 도메인에 대항하여 유도된 IFN- γ 반응은 3차 ADXS31-164 예방접종 후 3주째에 7마리 개에서 검출되었다(표 7). 이들 개 중 5마리는 고도로 보존된 IC1 도메인에 대한 면역 반응을 나타냈다. 5마리의 추가된 개는 2달 후 IC1 도메인에 대한 IFN- γ 반응을 나타냈다. 3마리의 추가된 개는 재발 시점(개 001, 002 및 017)에서 EC2 단독, EC2 및 IC1 또는 EC1, EC2 및 EC3 중 어느 하나에 대한 IFN- γ 반응을 나타냈다. 이들의 초기 예방접종 시리즈 동안 HER2/neu에 대한 면역 반응을 나타내는 3마리 개를 15달 내지 17달에 걸쳐 IFN- γ ELISpot으로 평가하였다. HER2/Neu 특이 IFN- γ 반응은 유지되지 않으나, 개는 이 시간 동안 전이 질병 없이 유지되었다. 10마리 개가 추가 부스터 백신 접종을 받았으며, 6마리의 평가 가능한 개 중 2마리 개가 부스터 예방접종 후 2달에 HER2/neu 특이 IFN- γ 반응이 증가함이 검출가능하였다. 재발된 8마리 개 중, 5마리는 ADXS31-164 후 3주간 HER2/neu 특이 IFN- γ 반응에서 증가가 없었다.

[0652]

표 7

개	ADX31-164 후												재발 시간	전체 생존률	
	기선			3주			2달 재검			4달 재검					
	EC1	EC2	IC1	EC1	EC2	IC1	EC1	EC2	IC1	EC1	EC2	IC1			
그룹 1															
001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-R	+R	-R	350 ^B	738	
002	-	+	-	-	-	-	-R	+R	+R	DEAD			185 ^L	267	
003	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	1000+		
그룹 2															
004	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	966+		
007	+	+	-	+	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	869 ^B	948+	
008	-	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	318 ^{B*}	346	
그룹 3															
013	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	767+		
017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+R	+R	+R	322 ^B	444	
024	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	511+		
025	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	461+		
026	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	462+		
027	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	453+		
036	-	-	-	+R	-R	+R	사망			251 ^L			276		
038	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	ND	ND	335+		
039	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-R	-R	+R	315 ^L	350+	
그룹 4															
030	+	+	+	-	+	+	ND	ND	ND	사망			226 ^{L*}	259	
037	-	-	-	+R	+R	+R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	190 ^L	368+	
040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	355+		

[0653]

[0654]

보강 예방접종. 등록시 전이 질병이 없는 18마리 개 중 10마리에 초기 백신 시리즈 후 5달 및 10달 사이에 단일 강부스터 백신을 투여하였다. 이들 개 중 4마리는 1차 추가 백신 후 4달 및 15달 사이에 주어진 추가 보강 백신을 접종받았다. 유사한 낮은 등급의 일시적인 부작용이 초기 예방접종 시리즈에서와 같이 보강 예방접종 시점에서 주목되었다.

[0655]

도 20(A 및 B)은 반복된 보강 예방접종이 또한 HER2 특이 면역을 자극하였음을 보인다. 반복된 보강 예방접종은 동물 289-003에서 6달 및 10달에, 그리고 동물 289-004에서 8달에 투여되었다.

[0656]

임상 결과. 예방접종된 그룹에서 8/18의 개가 재발하였으며 4마리는 폐 전이 질병이었고 4마리는 골 전이였다. 골 전이를 갖는 2마리 개는 폐 전이로 진행되었다. 천골에 골 병변을 갖는 1마리 개는 흡인성 폐렴으로 사망하였으며 단독 폐 결절을 갖는 1마리 개는 신아세포종으로 사망하였으나 뼈 및 폐 병변으로부터의 각각의 부검 표본은 전이 골육종의 조직병리학적 확인이 가능하지 않았다. 이들 2마리 개는 OSA 특이 생존 분석에서 삭제되었다. 재발된 개는 초기 임상의의 재량으로 상이한 구제 화학요법 및 방사선 요법을 받았었다. 골 전이를 갖는 4마리 개는 진통제 단독(1마리 개), 일시적인 방사선 단독(1마리 개) 또는 화학요법과의 조합(2마리 개)으로 치료되었다. 2마리 개는 아드리아마이신을 받았고 1마리 개는 폐 전이 질병의 치료를 위해 팔라디아를 받았다. 예방접종된 개에서 중간 OSA 특이 생존율은 아직 도달되지 않았다. TTM 및 OSA 특이 생존율에 대한 카플란-메이어 생존 곡선은 도 21에 보여진다. 예방접종된 개에서 1년 및 2년에서의 전체 생존 비율은 각각 71.4% 및 57%이다. 예방접종 2달 이내에 HER2/neu 특이 IFN-γ 반응이 발생했던 12마리의 개 중, 9마리는 여전히 살아있다(3마리 개 > 900 일, 1마리 개 > 700 일, 3마리 개 > 400일 및 2마리 개 > 300일 및 7마리는 지금까지 종양 없이 남아있음(표 7)). 도 24에 나타낸 결과는 ADXS31-164가 HER2/Neu에 대한 내성을 약화시킴을 입증한다. 이는 OSA뿐만 아니라 다른 HER2/Neu 종양 및/또는 암의 치료에 중요할 것이다.

[0657]

부검 결과. 6/18의 개가 연구 기간 동안 사망하여 이들 개 중 4마리에 대해 부검을 실시하였다. 3마리 개가 폐(3마리 개), 뼈(2마리 개), 종격막(1마리 개) 및 신장(1마리 개)에 관련된 다초점 등급 II 및 III 전이 골육종을 가짐이 발견되었다. 큰 진행성 신장 질량 때문에 안락사된 1마리 개는 신아세포종을 갖는 것으로 발견되었다. 이 개는 또한 단일 폐 결절을 가지고 있으나 유감스럽게도 조직병리학적으로 평가되지 않았다.

[0658]

ADX31-164의 투여 후 생존율, 연장된 생존율, 종양 진행

[0659]

특별 케어 기준으로 스크리닝 및 치료된 다수의 전이 폐 결절을 갖는 3마리 개는 질병 진행 전 및 연구로부터 제거 전에 각각 하나의 백신을 접종받았다. 스크리닝 시점에서 단독 전이 폐 결절을 갖는 것으로 나타난 2마리 개는 3개 백신 모두를 접종받았다(인상 착의 및 종양 특징에 대한 표 5 참조). 진행성 폐 전이 질병은 예방접종에도 불구하고 이들 개 중 1마리에서 발생했다. 3주마다 크기가 2배가 되는 이미 존재하는 폐 결절에도 불구하고

고 두 번째 개에서 추가 폐 병변은 발생하지 않았다(도 22a 및 22b). 마지막 예방접종 후 1주째에서의 CT 스캔은 추가 전이 병변의 부재를 확인하였으며 개는 전이절제술을 받았다. 수술 전에, 종양 마진 및 염증 영역을 검출하기 위해 사용되는 염료 인도시아닌 그린(ICG)이 정맥내 투여되었으며, 수술에서 근적외선 하에서 형광이 폐 결절 및 단독 결절 주위의 건강해 보이는 폐 유조직의 여러 다른 영역으로 보여졌다(도 22c 및 22d). 폐 결절의 조직병리학은 두꺼운 섬유성 캡슐에 둘러싸인, 큰 영역의 출혈 및 괴사를 갖는 전이 OSA를 드러냈다(도 22e). IHC는 결실 자체 내의 매우 소수의 T 세포를 갖는 섬유성 캡슐 주위의 CD3⁺ T 세포의 축적을 보였다(도 22g 및 22h). 근적외선 형광에 의해 확인되는 다른 영역은 T 세포 침윤의 초점 영역을 보였다(도 22f, 22i 및 22j). T 세포는 현저한 분열상을 갖는 비정상적으로 큰 비멘틴 양성 세포 주위에서 보여졌다(도 22k 및 22l). 이를 결과는 폐 내에서 단일 전이 육종 세포가 종양 특이 T 세포에 의해 효과적으로 표적화될 수 있으며 ADXS31-164가 전이 폐 질병을 예방하는 가능한 메커니즘을 제공함을 제안한다. 개는 수술로부터 잘 회복되었으며 피하 조직(골아 세포, 등급 II 및 조연골 세포, 등급 III), 종경막(골아 세포, 등급 II) 및 횡경막(골아 세포, 등급 III)에서 광범위한 공격적인 HER2/neu+ 전이 질병이 발생하기 전에 5달 동안 폐 전이 질병 없이 유지되었다. 결과는 HER2/neu 특이 T 세포 반응의 도입에도 불구하고, 오프-종양 부작용이 확인되지 않았으며, 이로부터 HER2/neu 특이 T 세포의 도입이 HER2/neu 양성 전이 세포의 제거 및 질병 재발로부터의 장기간 보호를 전담함을 보인다. 이는, 많은 개들에 전이 질병이 발생할 때, 진단 후 대략 8달에 5마리 개에서 발생되는 HER2/Neu-특이 T 세포 확장의 시기 및 예방접종 및 전이절제술 후 1마리 개의 폐 유조직 내 초점 T세포 반응의 조직병리학적 결과에 의해 지지된다.

[0660] 도 22 및 도 23에 나타낸 결과는 ADXS31-164의 투여가 전이 질병을 자연시키고 그리고/또는 예방하고 자발적 HER2+ 골육종을 갖는 개에서의 전체 생존율을 연장시킴을 입증한다. 두 도면 모두에서 볼 수 있는 바와 같이, 백신을 접종받은 개는 생존 시간이 상당히 연장되었으며, 백신을 접종받은 이들 개에서 중간 생존율은 아직 도달되지 않았다.

[0661] 본 발명자의 연구가 전이 질병을 예방하는 이 접근에서의 효능을 입증하나, ADXS31-164로의 예방접종은 특별 케어 기준에서 치료된 5마리 개에서의 이미 존재하는 총체의 폐 전이 질병의 퇴행을 유도할 수 없었다. 1마리 개에서 T 세포가 전이 병변을 둘러싼 섬유성 캡슐을 침투하는데 실패하거나 이를 세포에서 구축된 종양 미세환경 내에서 생존하는 것이 실패하는 것과 연관됨을 나타냈다(도 22c). 그러나, 동일 개에서, 전이 OSA 세포라고 알려진 크고 능동적으로 분할하는 간엽 세포 주위의 T 세포 침윤물의 초점 영역이 극도로 정상인 폐 유조직에서 확인되며 예상치 못하게 전이절제술 후에 이 개에서 추가 폐 전이 질병이 발생하지 않았다. 종합하면, 이들 데이터는 ADXS31-164가, 마이크로 전이 폐 질병을 제거하는 HER2/Neu 특이 T 세포의 형태의 적응 면역 반응 및 FAS/FASL 매개 아폽토시스에 대해 전이 OSA 세포를 민감하게 할 수 있는, 가능성있는 선천적인 면역 반응을 유도하는 이의 능력을 통해 폐 전이 질병을 예방함을 제안한다.

[0662] 결론:

[0663] 이 출원을 제출하는 시점에서 12/18의 개가 폐 전이 질병을 나타내지 않으며, 이는 최소 잔류 질병의 세팅으로 투여됐을 때 ADXS31-164가 자발적 HER2+ 골육종을 앓고 있는 대상체의 전이 질병을 예방함을 입증한다. 예방접종된 개는 과거 HER2/Neu+ 대조군에 비해 전체 생존율에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였다. Her2/Neu+ 대조 개에서의 중간 생존율($n = 11$)은 316일($p = 0.032$)이고 ADXS31-164 처리된 개에서의 중간 생존율은 도달되지 않았다. 또한, 결과는 ADXS31-164가 HER2/Neu의 고도로 보존된 IC1 도메인에 대한 말초 내성을 약화시킴을 나타낸다(도 26). ADXS31-164 투여의 24시간 내에서 백혈구의 증가의 규모는(도 18) 생존에 연관된 것이며, 이는 결과가 백신에 대해 반응하는 개의 면역 시스템의 능력에 부분적으로 의존함을 제안한다. 중요하게는, 이 연구는 자발적 OSA를 갖는 개로의 3×10^9 CFU까지의 ADXS31-164의 투여는 안전하고 투여 시점에만 일시적으로 낮은 등급의 부작용을 유발함을 보였다. 게다가, 폐 전이 질병의 예방은 폐에서 미세한 전이 질병의 CD3+ T 세포 매개 제거와 부분적으로 연관될 수 있다. 이 작업은 HER2/Neu를 발현하는 소아과 OSA 및 다른 인간 암에 대한 중요한 관계를 갖는다.

[0664] 게다가, 본원에서 발명자는 3.3×10^9 CFU까지의 용량으로 ADXS31-164를 투여하는 것이 개에게 안전하고 HER2/neu 특이 면역을 유도함에도 불구하고 단기간 또는 장기간 심장 독성을 야기하지 않음을 보인다. 표적에서, 심장 독성을 포함하는 오프 종양 부작용은 다수의 HER2/neu 특이 T 세포의 투여와 연관되거나 또는 트라스투주맙이 안트라사이클린과 동시에 사용되었을 때와 연관된다. 발명자는 심장 독성의 임의의 잠재적 위험을 줄이기 위해 독소루비신 없이 표준 화학요법 프로토콜을 사용했다.

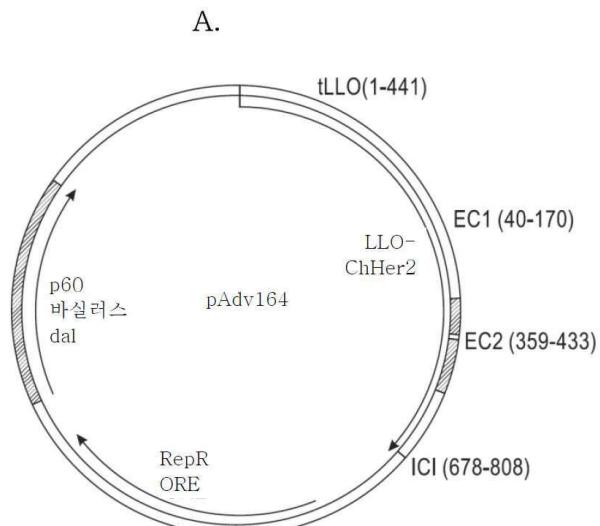
[0665] 본 연구는 ADXS31-164이 OSA를 갖는 개에서 폐 전이 질병을 예방할 수 있음을 입증한다. 이들 결과는 OSA를 갖

는 개에서 안전성 및 전례 없는 생존 시간을 입증하며 소아과 골육종 및 유방 암종을 포함하는 HER2/neu 발현 종양을 갖는 환자에서 전이 질병을 예방하는 ADXS31-164의 능력을 조사하는 방식을 포장한다.

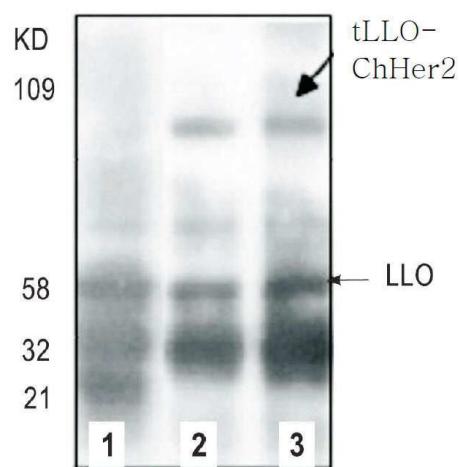
[0666] 본 발명의 특정 특성이 본원에서 설명되고 기재되지만, 많은 개질, 치환, 변화 및 등가물이 본 분야의 당업자에게 현재 떠오를 것이다. 그러므로, 첨부된 청구항이 본 발명의 진정한 사상 내에 포함되는 이러한 모든 개질 및 변화를 아우를 의도임이 이해되어야 한다.

도면

도면1

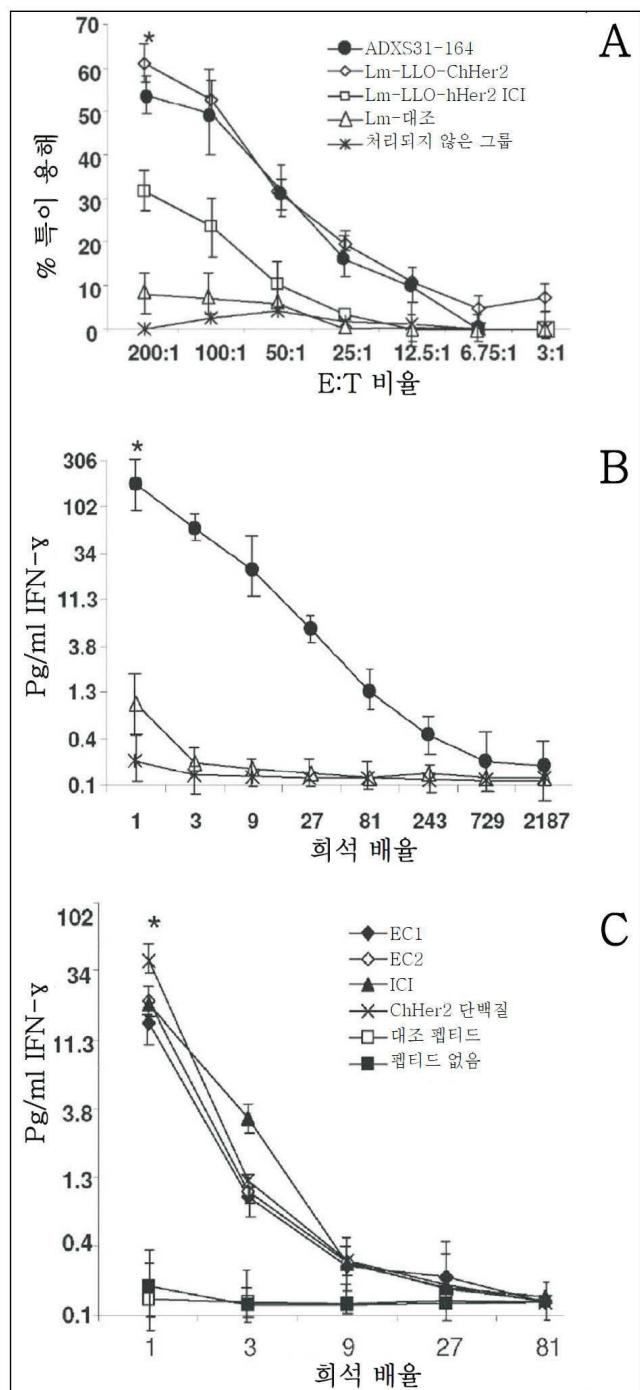


B.

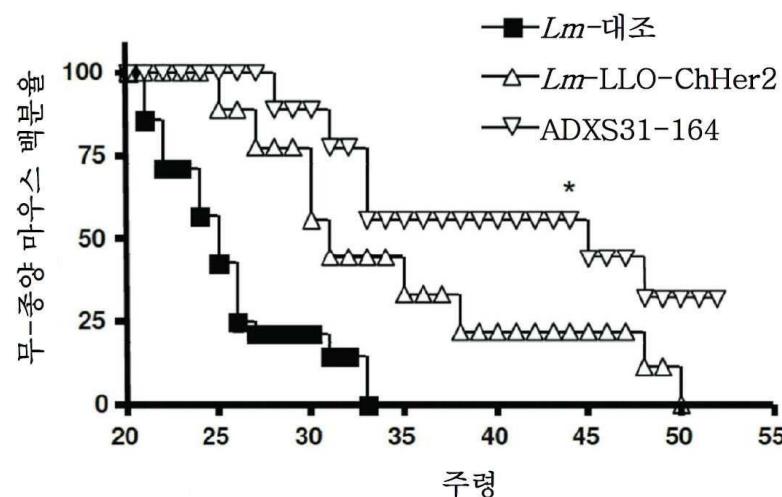


1-음성 *Lm*-대조
2-*Lm*-LLO-ChHer2
3-ADX31-164

도면2

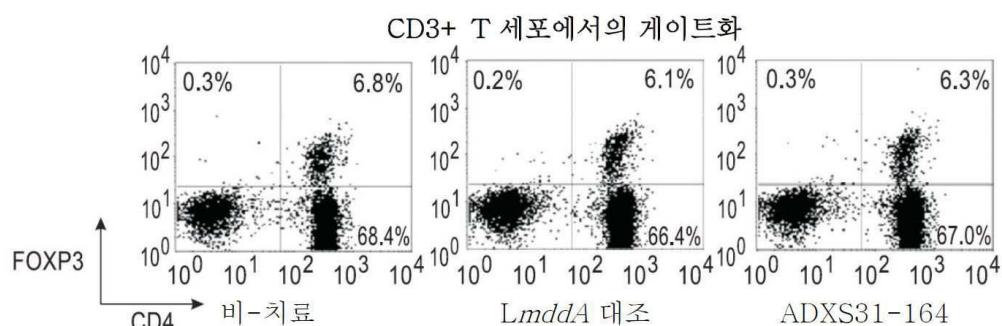


도면3

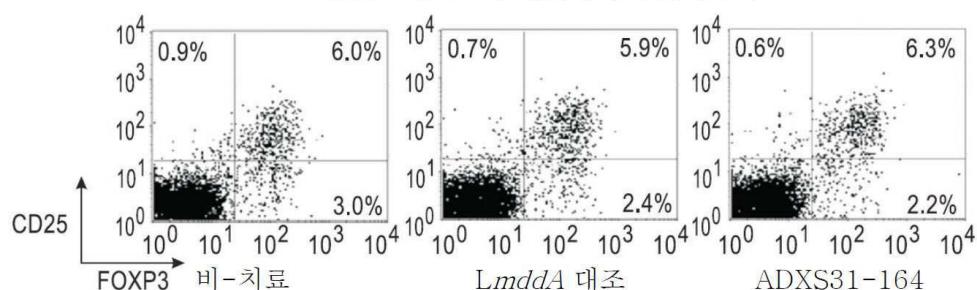


도면4

비장

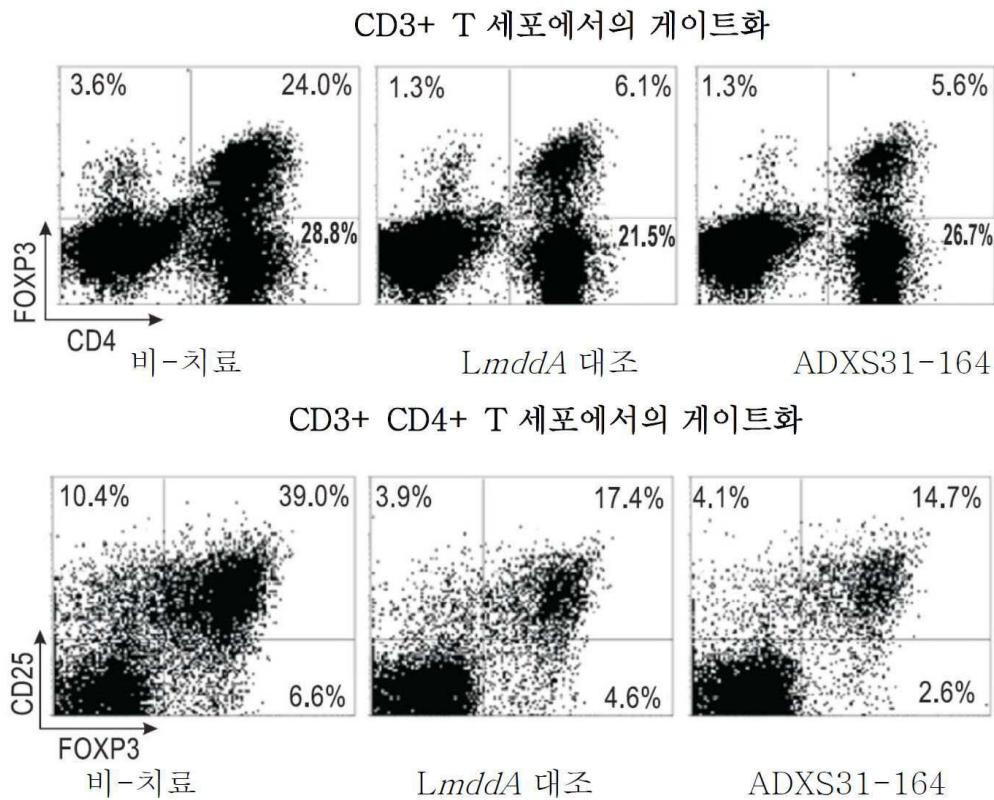


CD3+ CD4+ T 세포에서의 계이트화

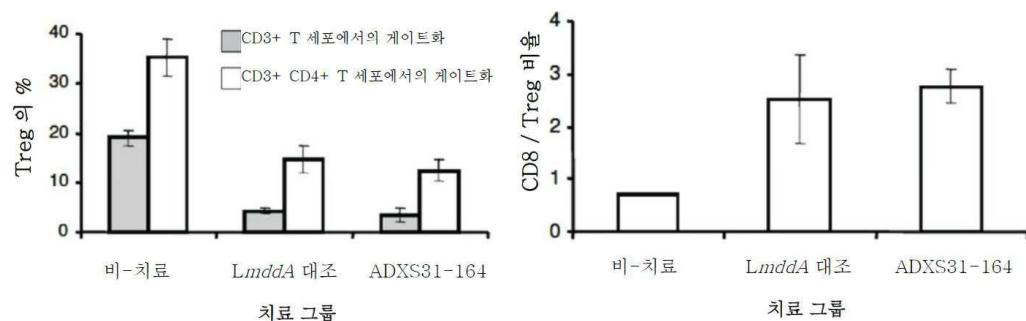


도면5

A.

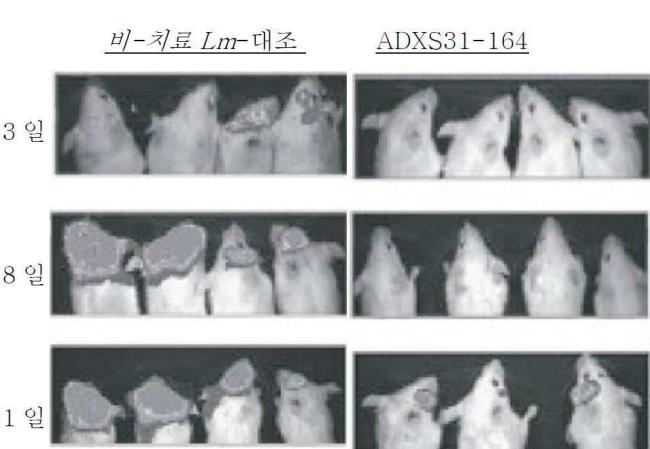


B.

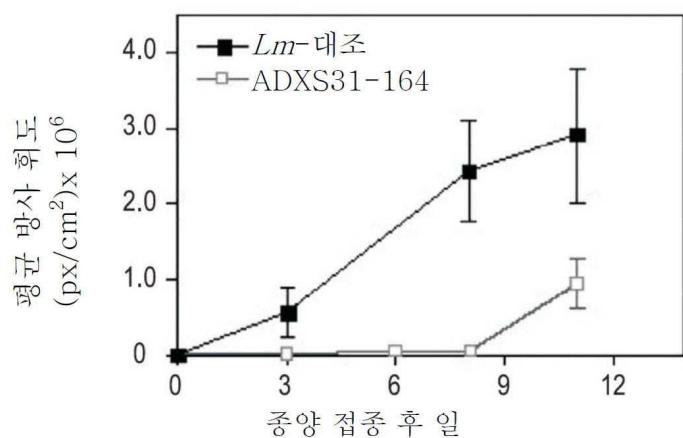


도면6

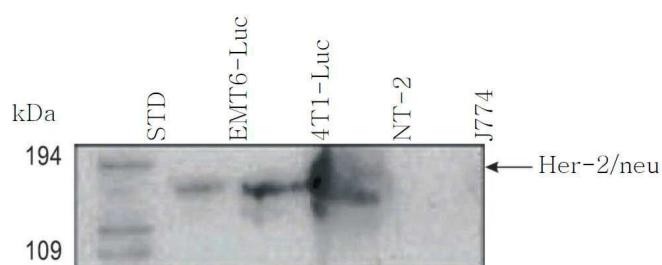
A.



B.



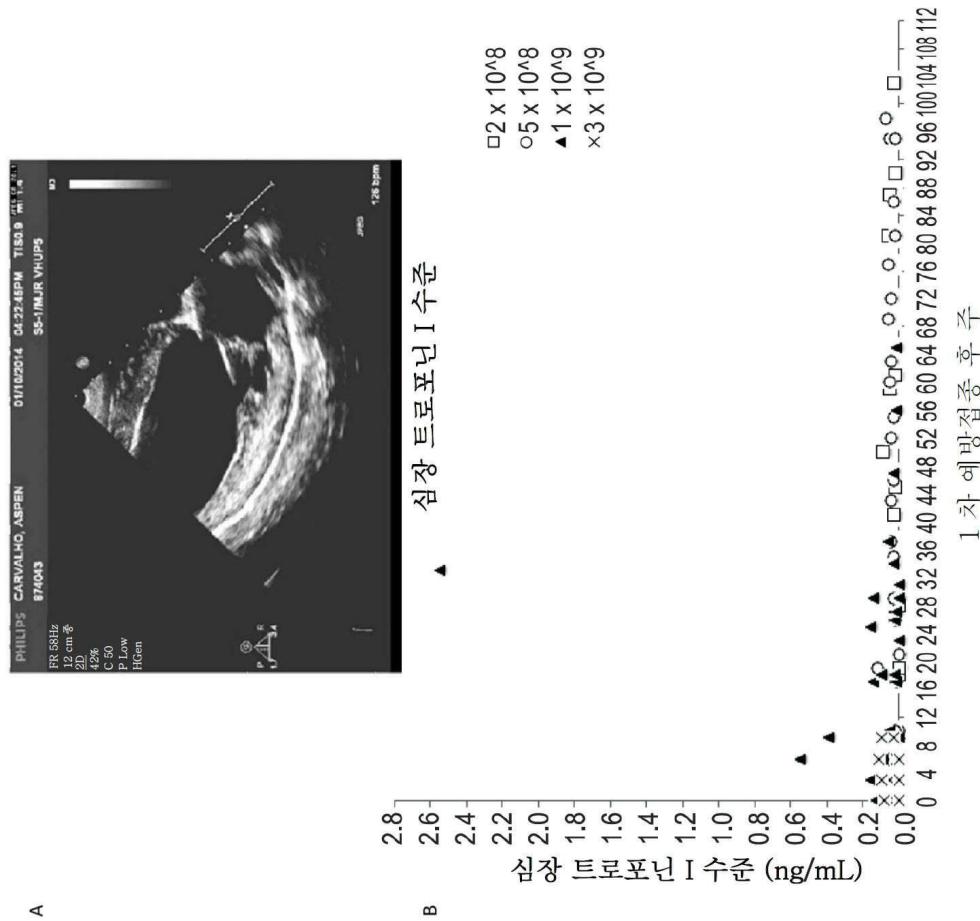
C.



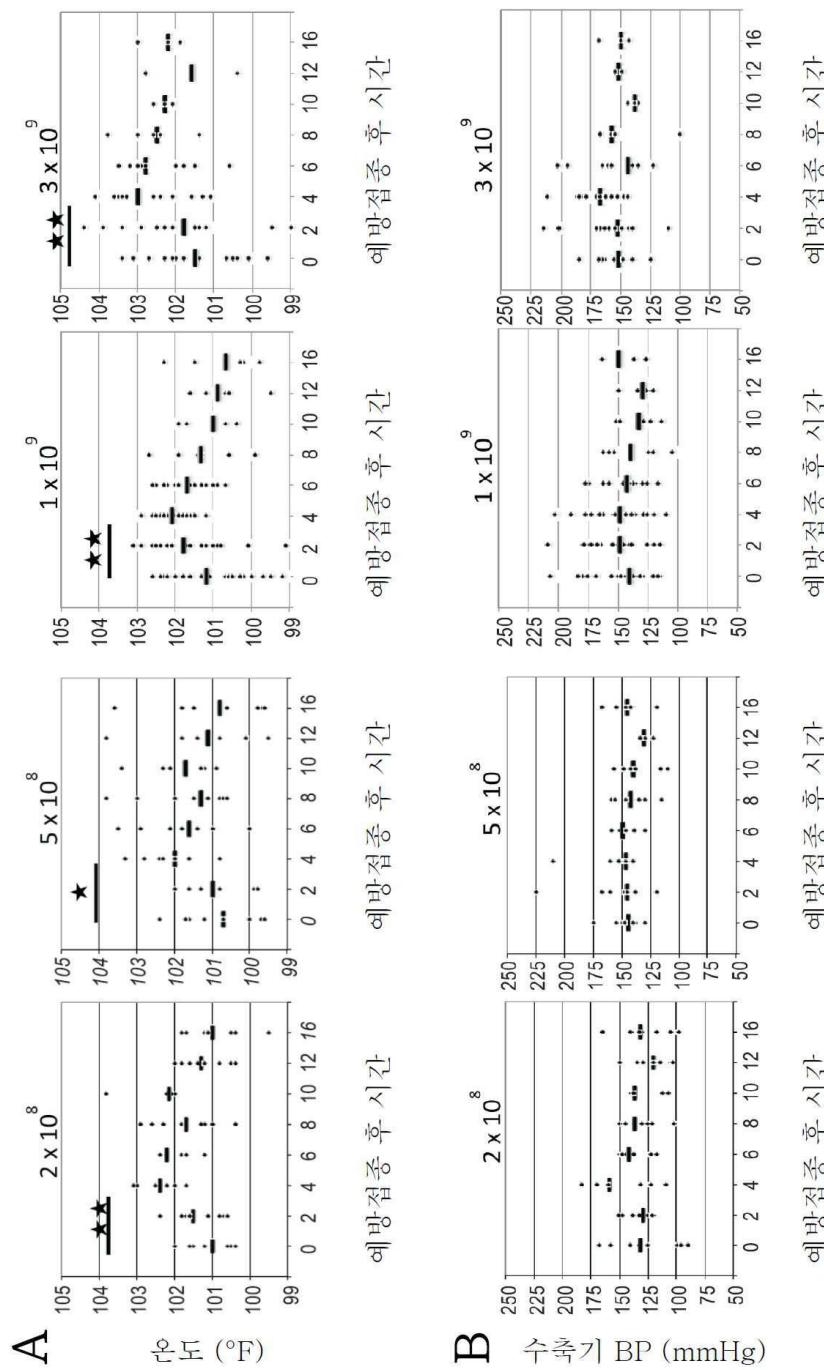
도면7

연번	품종	성별	중양 위치	이형	동급	HER2 첨수	용량	전체 생존율(일)
그룹 1								
12.5	아메리칸 흑불	FS	전위부 상완골	골이 세포	II	2	2×10^8	738
11.5	혼혈풀종	FS	요골 원위부	골이 세포	I	5	2×10^8	267
9	레브라도	MC	전위부 상완골	섬유아세포	II	7.5	2×10^8	1007+
그룹 2								
6	혼혈풀종	FS	경골 원위부	골이 세포	I	4.5	5×10^8	973+
7	로트와일러	MC	척골 원위부	골이 세포	III	2.25	5×10^8	955+
4.5	잉글리쉬 불독	MC	전위부 상완골	골이 세포	I	4	5×10^8	346
그룹 3								
6	OES	MC	원위 대퇴골	골이 세포	II	1.5	1×10^9	774+
9	그레이하운드	MC	전위부 상완골	골이 세포	II	5	1×10^9	444
8	골든 리트리버	MC	척골 원위부	섬유아세포	I	3	1×10^9	518+
2	레브라도	PS	근위 경골	섬유아세포	I	4.5	1×10^9	468+
7.5	카마리에 킹 찰스	FS	근위 경골	골이 세포	II	7.5	1×10^9	469+
6.5	골든 리트리버	FS	요골 원위부	골이 세포	I	4.5	1×10^9	460+
10	그레이하운드	MC	원위 대퇴골	골이 세포	II	2	1×10^9	276
5.5	레브라도	MC	원위 대퇴골	골이 세포	I	9	1×10^9	342+
9	골든 리트리버	FS	원위 대퇴골	골이 세포	I	6	1×10^9	366+
그룹 4								
6.6	그레이트 테인	MC	요골 원위부	골이 세포	II	7.5	3×10^9	259
7	혼혈풀종	MC	전위부 상완골	골이 세포	II	9	3×10^9	375+
6.5	로트와일러	FS	전위부 상완골	골이 세포	II	6	3×10^9	362+

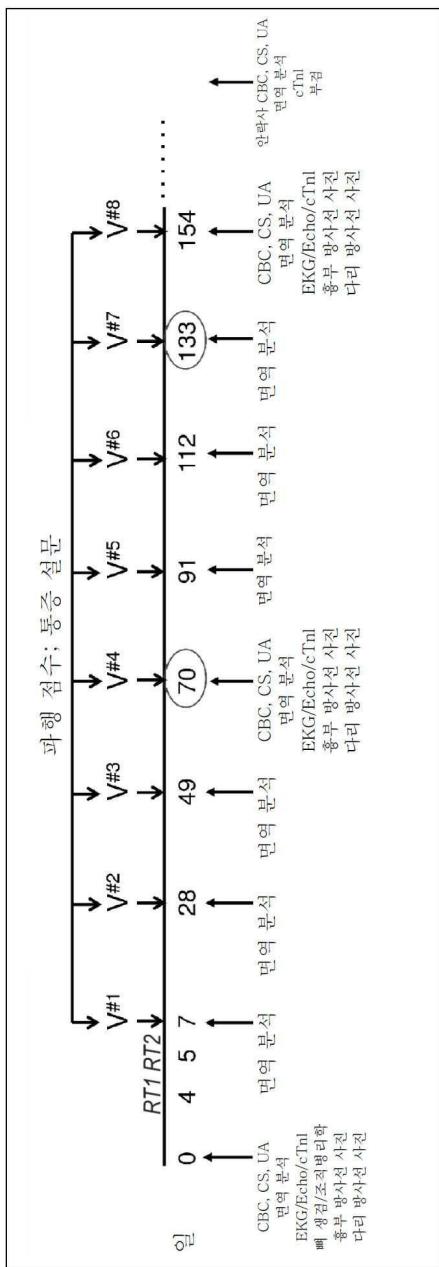
도면8



도면9



도면10



도면11



도면12

주	0	카보플라틴				스크리닝				q2 개
		2	5	8	11	14	15	18	21	
백신										Lm-huHER2/neu
임상 실험실 (CBC, CS, UA)						X	X	X	X	X
심장 기능 테스트 (cTnI, EKG)						X	X	X	X	X
기선 면역 기능 테스트 (호중구 기능, T 세포 증식)						X				
면역 분석 (IFN- γ ELISpot)						X	X	X	X	X
임상 평가 (전이 확인 흉부 방사선 사진)						X		X	X	X

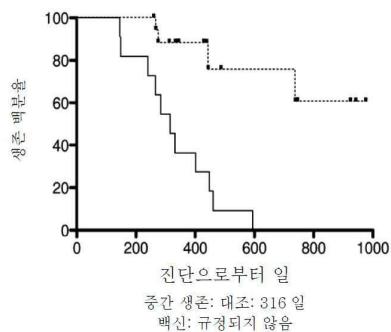
도면13

A.

치료 관련 부작용을 갖는 개의 수						
ADX31-164 용량		2x10 ⁸	5x10 ⁸	1x10 ⁹	3x10 ⁹	총
구성된 개의 수		3	3	12	5	23
일반 장애						
발열(T>103)		2	1	4	4	11
폐로		1	0	7	2	10
매스꺼움	등급 1	1	2	10	2	15
	등급 2	1	0	0	0	1
구토	등급 1	1	2	9	3	15
	등급 2	2	0	0	0	2
심혈관 기형						
부정맥	등급 1	0	1	0	0	1
	등급 2	0	0	1	1	2
심박 급속증	등급 1	0	0	2	1	3
	등급 2	0	0	0	1	1
저혈압		0	0	0	0	0
고혈압	등급 1	2	3	8	5	18
혈액학 파라미터						
혈소판감소증	등급 1	2	2	6	3	13
	등급 2	0	0	2	1	3
생화학적 파라미터(증가됨)						
γ-GT		0	2	1	0	3
	등급 1	0	1	6	1	8
ALKP	등급 2	0	0	0	1	1
	등급 3	1	0	0	0	1
ALT	등급 1	1	1	3	0	5
	등급 2	0	0	0	1	1
	등급 3	1	0	0	0	1
AST	등급 1	1	1	4	2	8
	등급 2	0	0	2	0	2
	등급 3	0	0	1	0	1
BUN		0	0	0	0	0
CREA		0	0	0	0	0
심장 트로포닌 I(> 0.2)		0	0	1	0	1

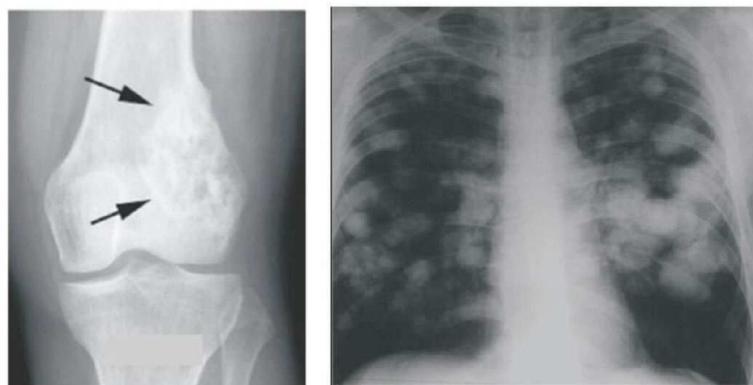
B.

1 차 예방접종 시점에 총체의 전이 질병이 없는
모든 개

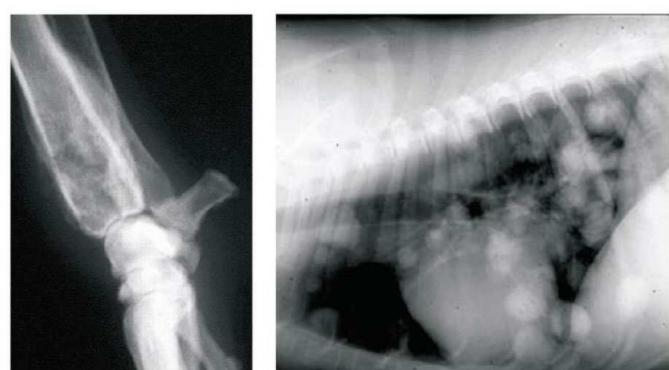


도면14

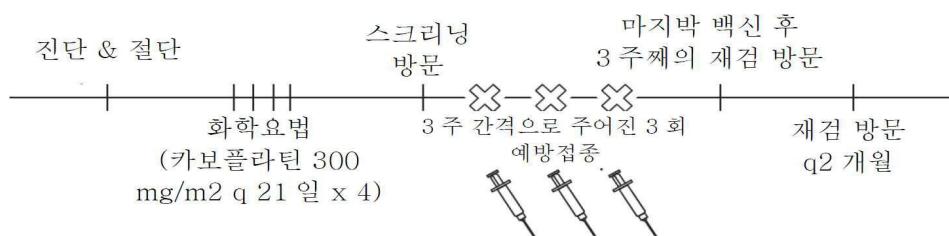
A.



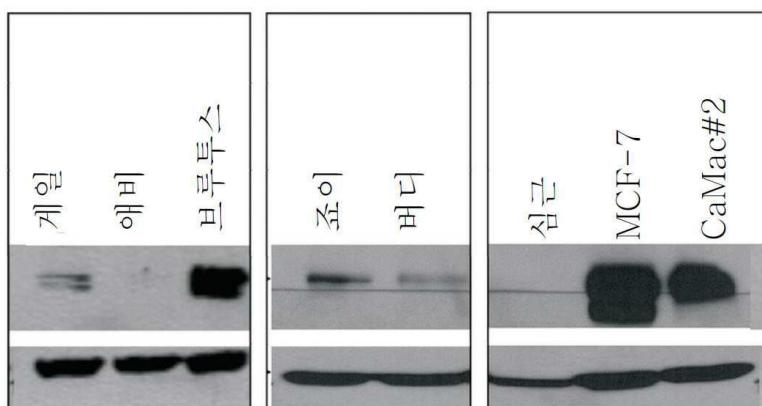
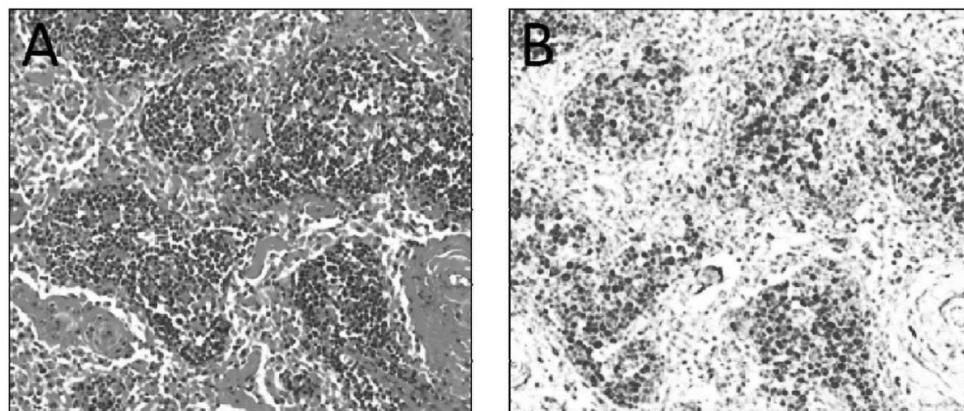
B.



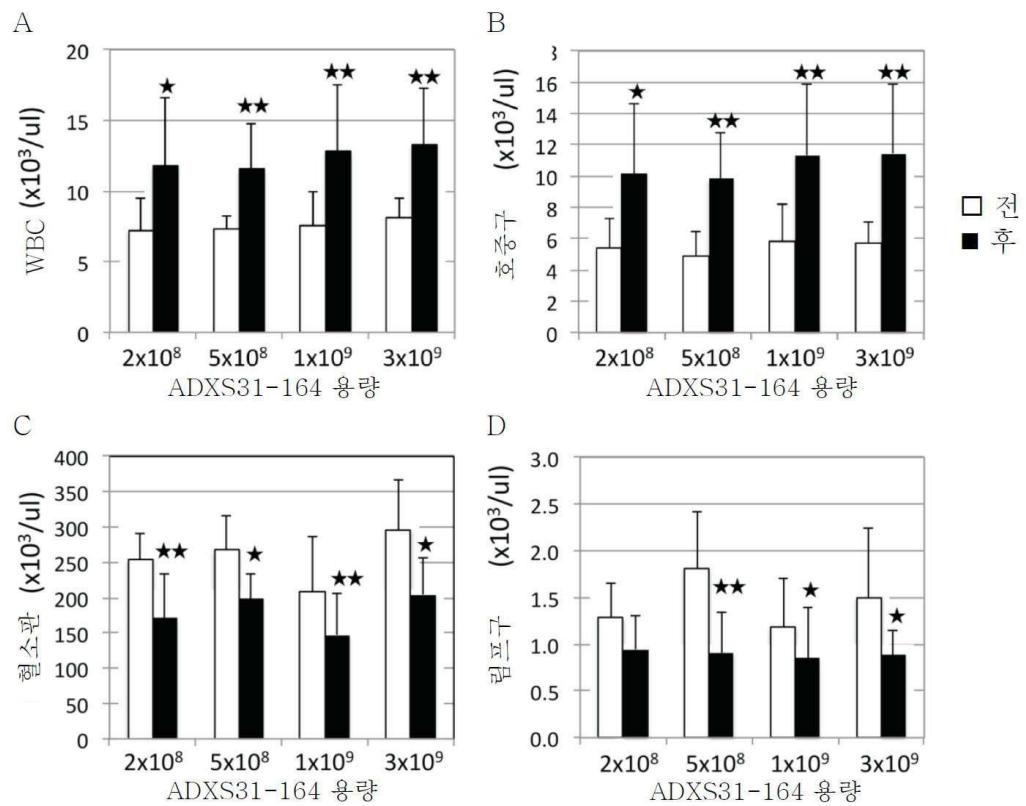
도면15



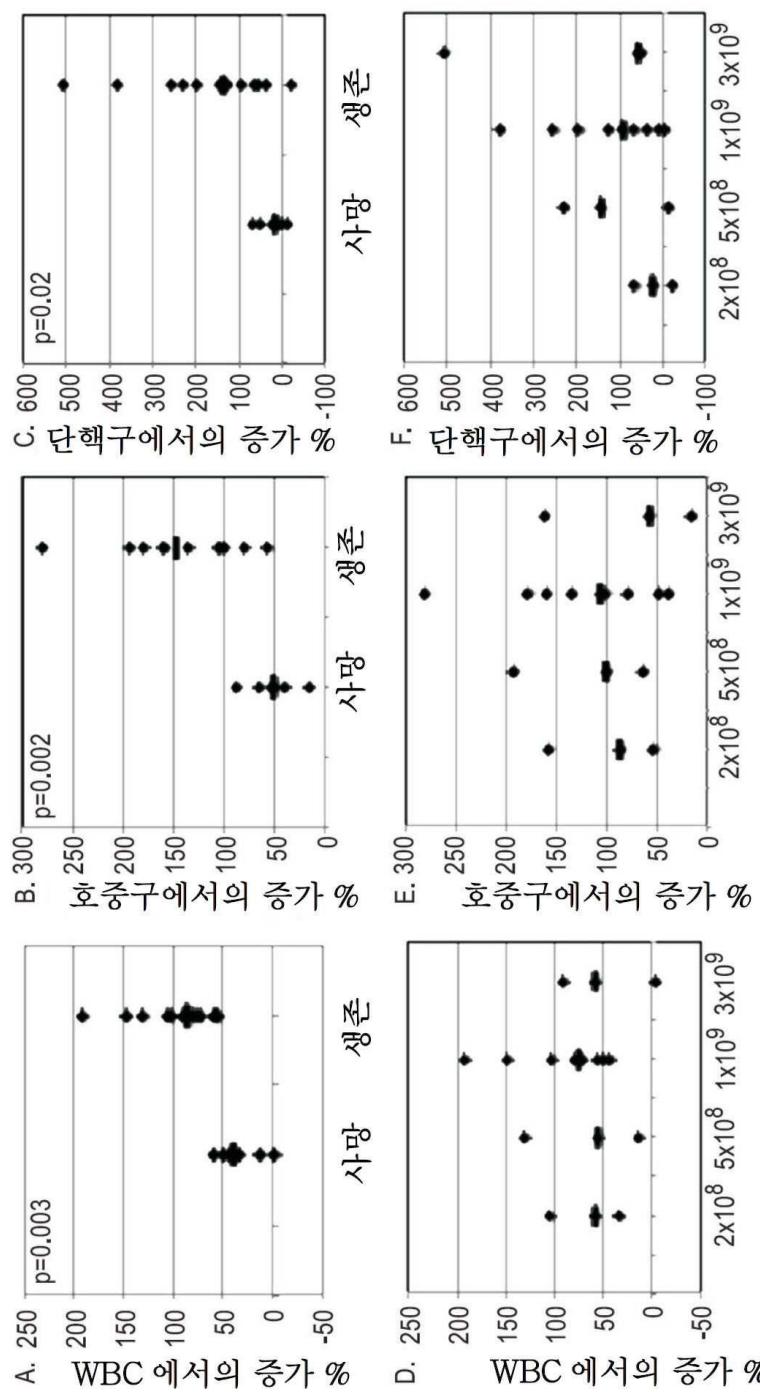
도면16



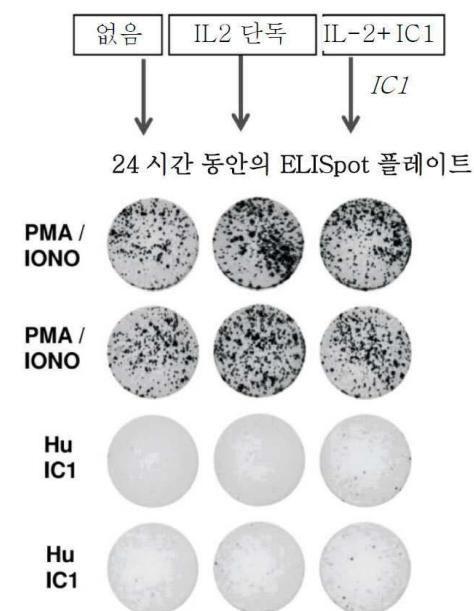
도면17



도면18

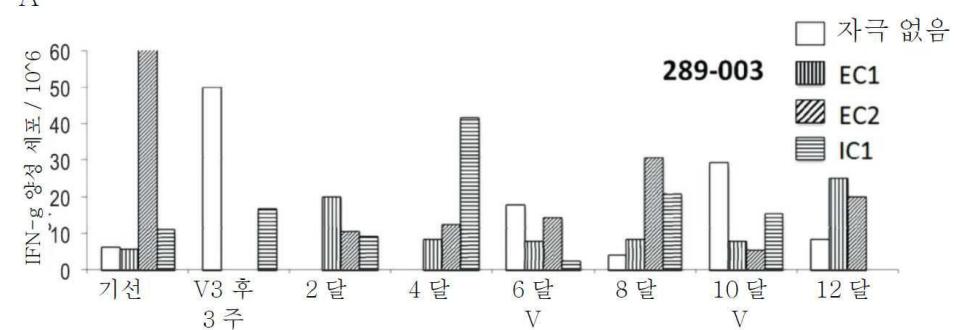


도면19

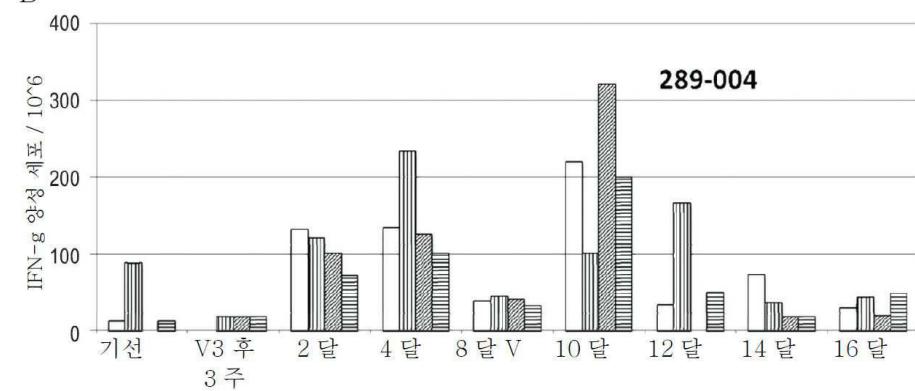


도면20

A



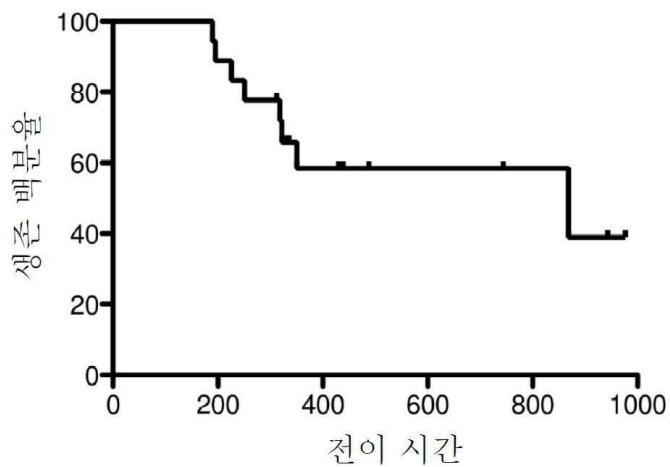
B



도면21

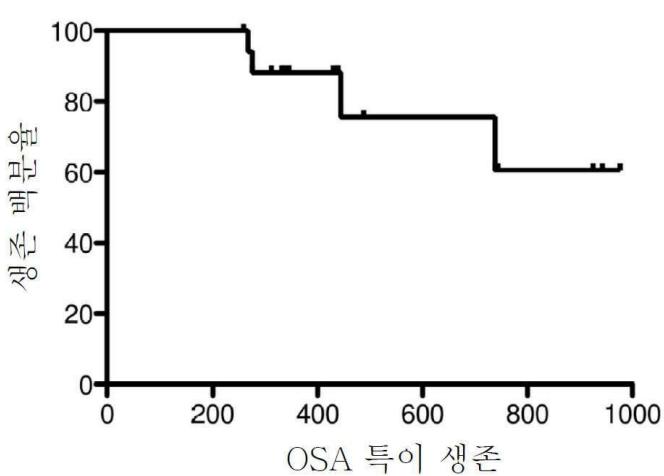
A

전이 시간

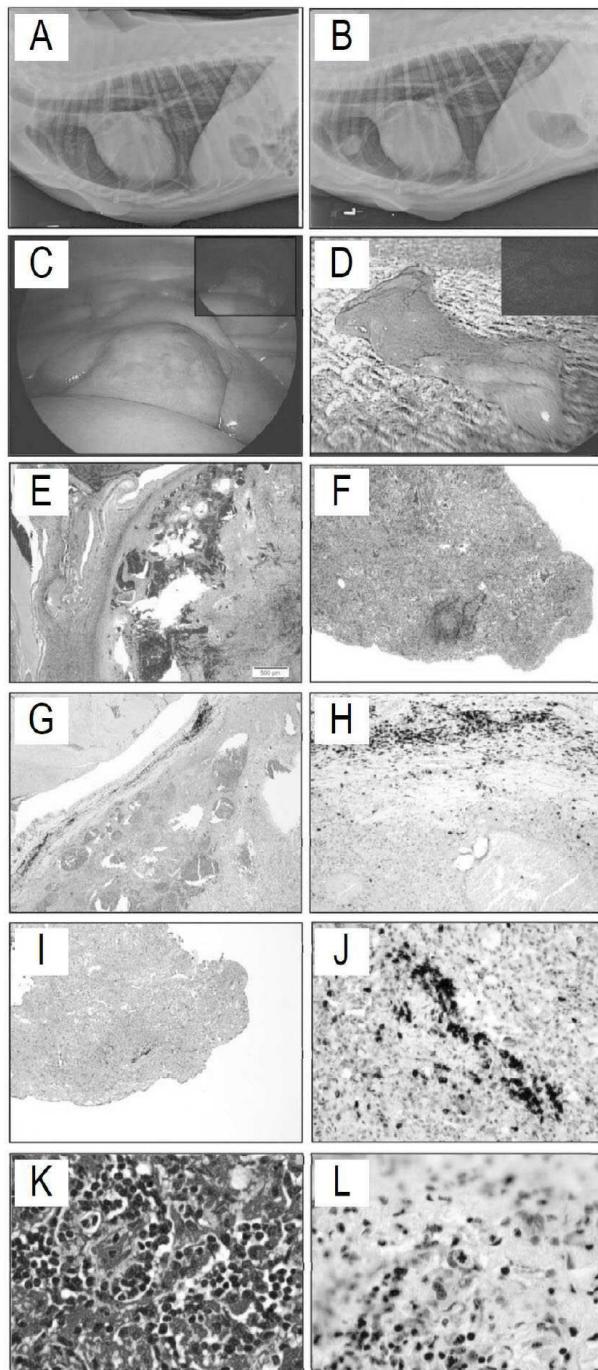


B

OSA 특이 생존

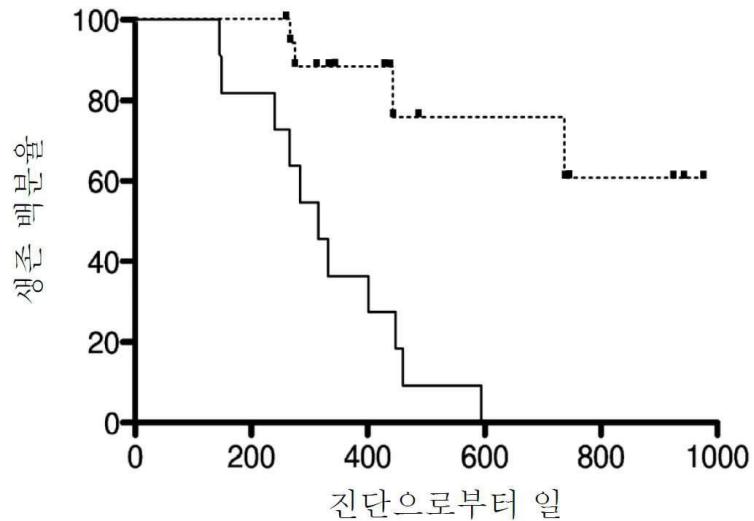


도면22



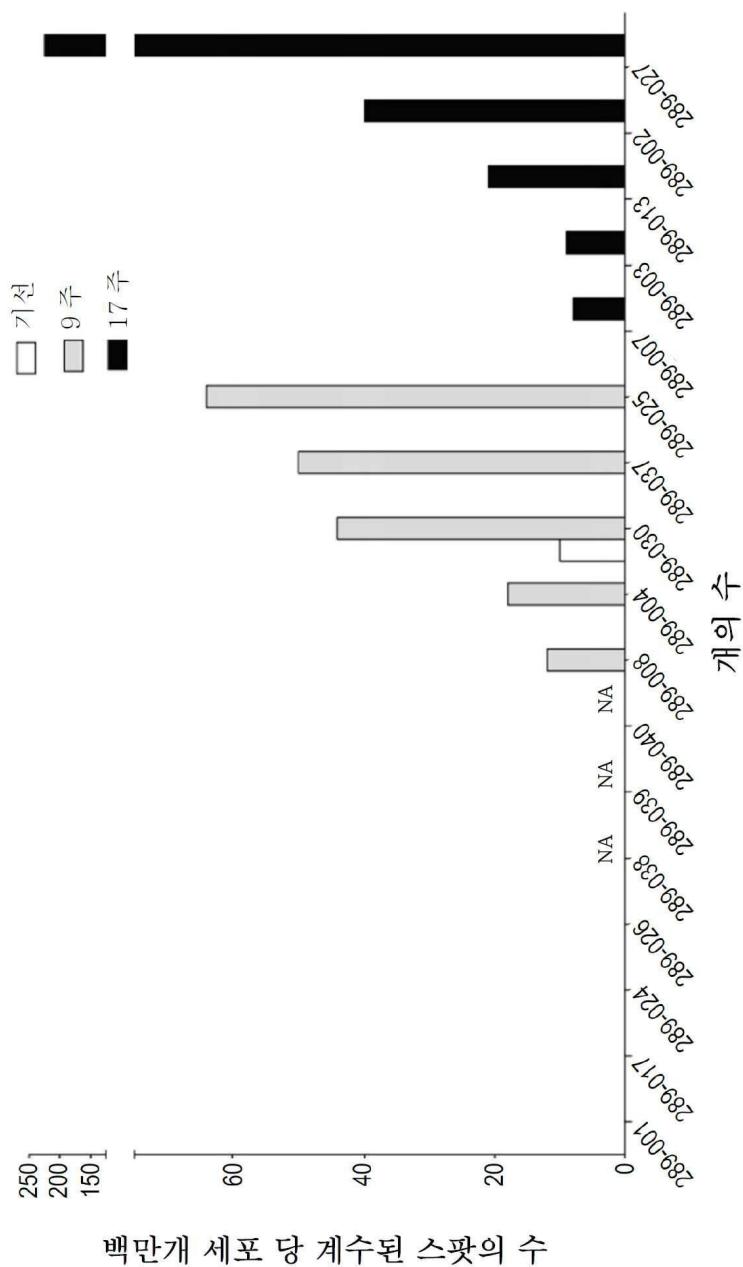
도면23

1 차 예방접종 시점에 총체의 전이
질병이 없는 모든 개

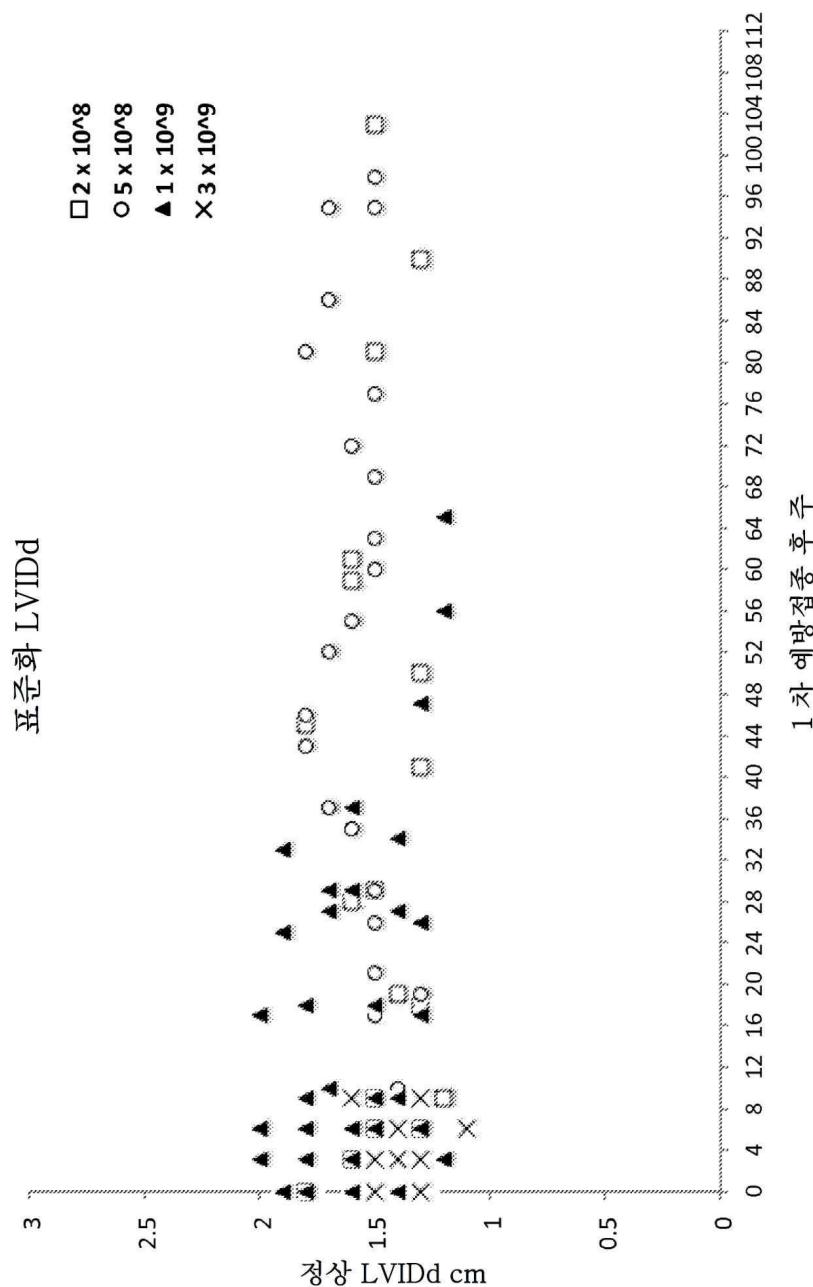


중간 생존: 대조: 316 일
백신: 규정되지 않음

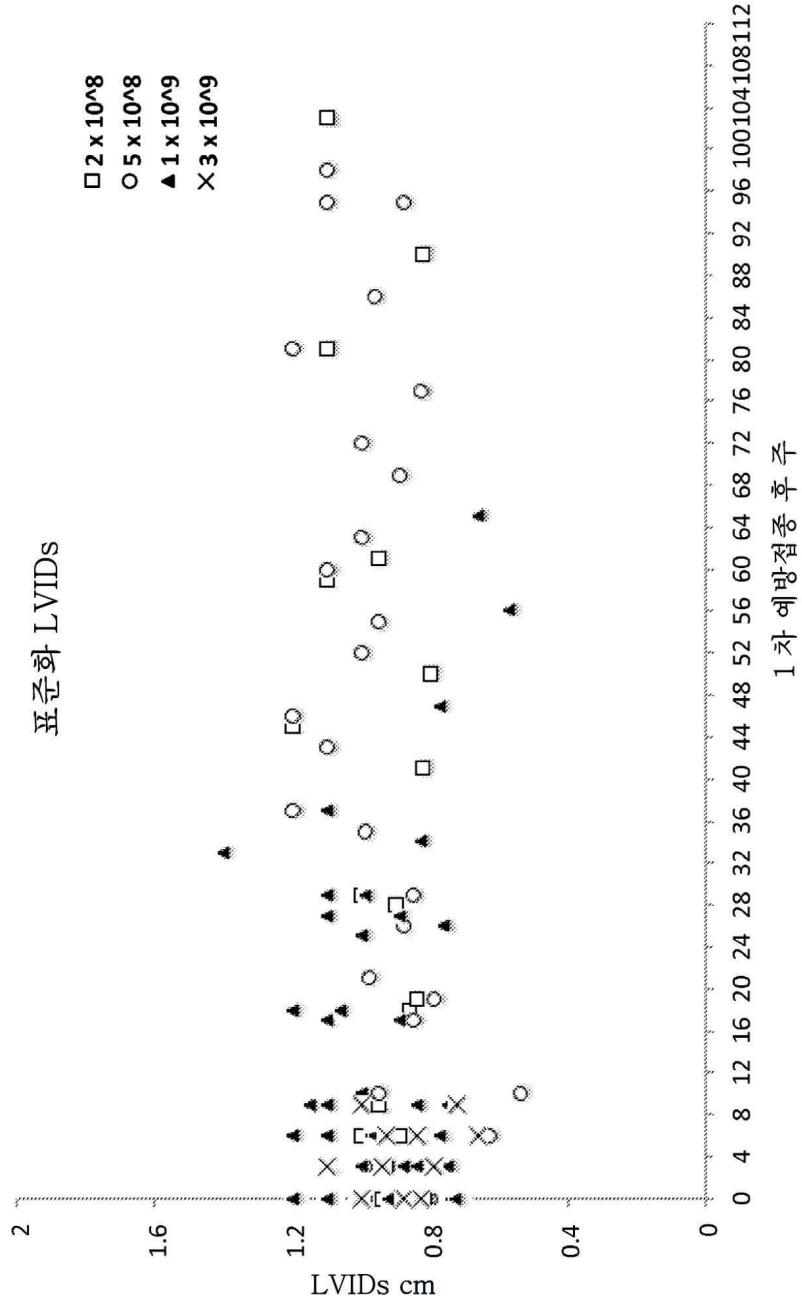
도면24



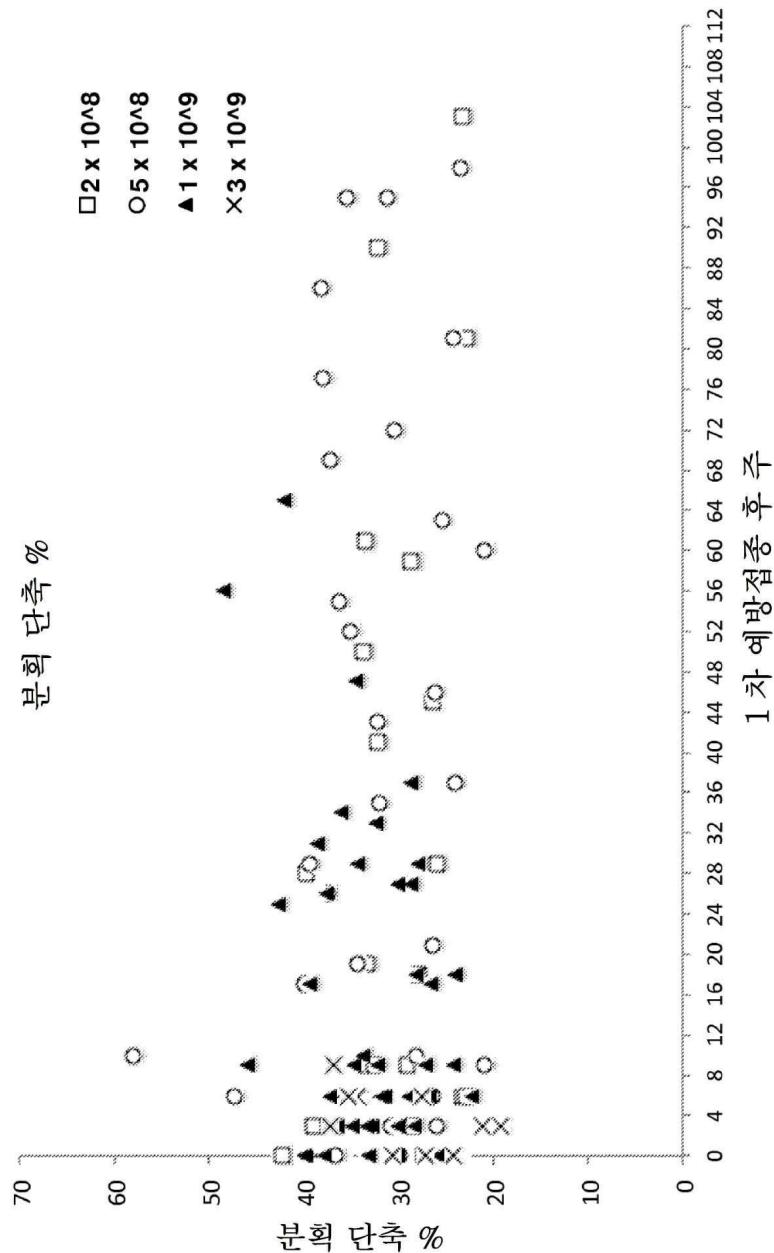
도면25a



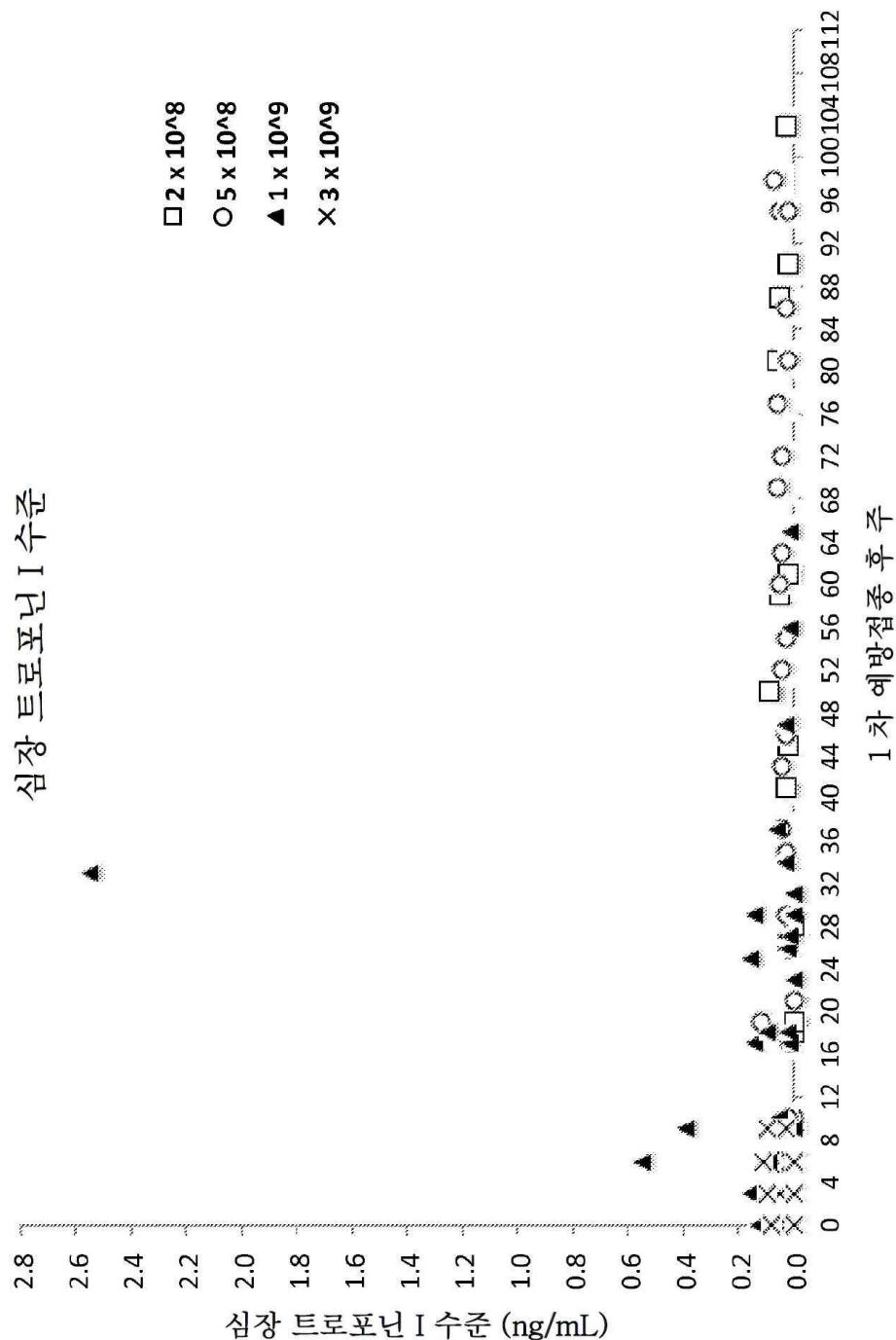
도면25b



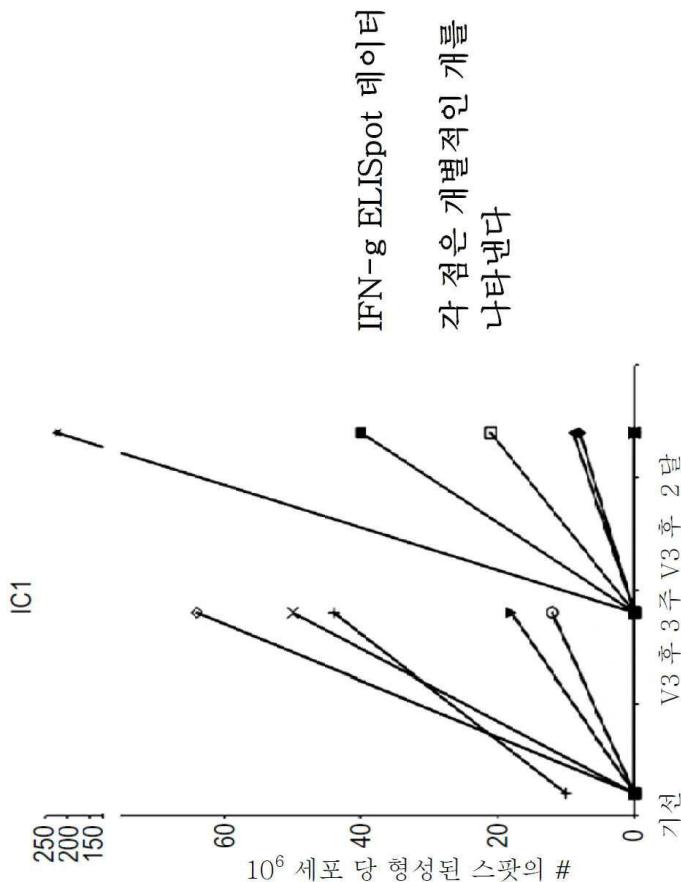
도면25c



도면25d



도면26



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Advaxis, Inc.

The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF HER2/NEU

OVER-EXPRESSING TUMORS

<130> P-73423-PC2

<140> PCT/US15/999999

<141> 2015-02-25

<150> 14/189,008

<151> 2014-02-25

<150> 14/268,436

<151> 2014-05-02

<150> 62/076,411

<151> 2014-11-06

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2/neu chimeric protein

<400> 1

gagacccacc tggacatgct ccggcaccc taccaggcgt gcaggaaac	60
ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agccgtcct tccgtcagga tatccaggag	120
gtgcaggcgt acgtgtcat cgctcacaac caagtggcgtc aggtccact gcagaggctg	180
cgattgtgc gggcacca gcttttag gacaactatg ccctggcgt gctagacaat	240
ggagacccgc tgaacaatac caccctgtc acagggcct cccaggagg cctgcggag	300
ctgcagcttc gaagcctcac agagatctt aaaggagggg tcttgatcca gcggAACCC	360
cagctctgct accaggacac gatTTTgtgg aagaatatcc agagtttgc tggctgcaag	420
aagatcttg ggagcctggc atttctgccc gagagtttgc atggggaccc agcctccaac	480
actgccccgc tccagccaga gcagctccaa gtgtttaga ctctggaaaga gatcacaggt	540
tacctataca tctcagcatg gccggacagg ctgcctgacc tcagcgtctt ccagaacctg	600
caagtaatcc gggacgaat tctgcacaat ggcgcctact cgctgaccct gcaaggcgt	660
ggcatcagct ggctgggct ggcctactg agggacttgg gcagtggact ggcctcatc	720
caccataaca cccacctctg cttcgtgcac acggtgcctt gggaccagct cttcggAAC	780
ccgcaccaag ctctgctcca cactgccaac cggccagagg acgagtgtgt gggcgaggc	840
ctggcctgcc accagctgtg cgcccgaggc cagcagaaga tccggaagta cacgatgcgg	900
agactgctgc agaaacgga gctgggtggag ccgctgacac ctagcggagc gatgccaaac	960
caggcgcaga tgcggatctt gaaagagacg gagctgagga aggtgaaggt gcttggatct	1020
ggcgcttttgc acagactcta caagggcatc tggatccctg atggggagaa tgtaaaatt	1080
ccagtgccca tcaaagtgtt gagggaaaac acatccccca aagccaacaa agaaatctt	1140
gacgaagcat acgtgtatggc tgggtggc tccccatatg tctccgcct tctggcatc	1200
tgccgtacat ccacggtgca gctggtgaca cagttatgc cctatggctg cctcttagac	1260
taa	1263

<210> 2

<211> 420

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2/neu chimeric protein

<400> 2

Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala

35 40 45

His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg

50 55 60

Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly

100 105 110

Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile

115 120 125

Leu Trp Lys Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu

165 170 175

Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro

180 185 190

Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu

195 200 205

His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp

210	215	220
Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile		
225	230	235
His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln		
245	250	255
Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro		
260	265	270
Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala		
275	280	285
Arg Gly Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln		
290	295	300
Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn		
305	310	315
Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys		
325	330	335
Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile		
340	345	350
Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg		
355	360	365
Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr		
370	375	380
Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile		
385	390	395
Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly		
405	410	415
Cys Leu Leu Asp		
420		
<210> 3		
<211> 1323		
<212> DNA		
<213> Listeria monocytogenes		

<400> 3

atgaaaaaaaaa taatgctagt ttttattaca cttatattag ttagtctacc aattgcgcaa	60
caaactgaag caaaggatgc atctgcattc aataaagaaa attcaatttc atccatggca	120
ccaccagcat ctccgcctgc aagtcctaag acgccaatcg aaaagaaaca cgccgatgaa	180
atcgataagt atatacaagg attggattac aataaaaaca atgtattagt ataccacgga	240
gatgcagtga caaatgtgcc gccaagaaaa ggttacaaag atggaaatga atatatttt	300
gtggagaaaa agaagaaatc catcaatcaa aataatgcag acattcaagt tgtgaatgca	360

attcgagcc taacctatcc aggtgctctc gtaaaagcga attcggatt agtagaaaaat	420
caaccagatg ttccctgt aaaacgtgt tcattaacac tcagcattga tttgccaggt	480
atgactaatc aagacaataa aatagttgt aaaaatgcc acaaatacaaa cgtaacaac	540
gcagtaataa cattagtgga aagatggaat gaaaaatatg ctcagctta tccaaatgt	600
agtgcaaaaa ttgattatga tgacgaaatg gcttacagt aatcacaatt aattgcgaaa	660
tttggtacag cattaaagc tggataata agcttgaatg taaacttcgg cgcaatcagt	720
gaagggaaaa tgcagaaga agtcattatgt tttaaacaaa ttactataa cgtgaatgtt	780

aatgaaccta caagaccttc cagattttc ggcaaagctg ttactaaaga gcagttgcaa	840
gcccggag tgaatgcaga aaatcctct gcataatctt caagtgtggc gtatggccgt	900
caagtttatt tggaaattatc aactaattcc catagtacta aagtaaaagc tgctttgt	960
gctgccgtaa gcccggaaatc tgtctcaggt gatgtagaac taacaaatat cataaaaat	1020
tcttccttca aagccgtaat ttacggaggt tccgcaaaag atgaagttca aatcatcgac	1080
ggcaacctcg gagacttacg cgatatttg aaaaaaggcg ctactttaa tcgagaaaca	1140
ccaggagttc ccatgctta tacaacaaac ttctaaaag acaatgaatt agctgttatt	1200

aaaaacaact cagaatatat tggaaacaact tcaaaagctt atacagatgg aaaaattaac	1260
atcgatcaact ctggaggata cgttgctcaa ttcaacattt ctggatga agtaattat	1320
gat	1323

<210> 4

<211> 441

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 4

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu

1 5 10 15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys

20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser

35 40 45

Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr

50 55 60

Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn

100 105 110

Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly

115 120 125

Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val

130 135 140

Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly

145 150 155 160

Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser

165 170 175

Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys

180 185 190

Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp

195 200 205

Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala

210 215 220

Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser

225 230 235 240

Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr

245 250 255

Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys

260 265 270

Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn

275 280 285

Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu

290 295 300

Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala

340 345 350

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp

355 360 365

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

370 375 380

Ile Ala Tyr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile

385 390 395 400

Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp

405 410 415

Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn

420 425 430

Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp

435 440

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 5

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

1 5 10

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 6

Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met

1 5 10 15

Gln Ser Ala Asp Glu Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys

20 25

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 7

Lys Asn Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp

1 5 10 15

Glu Glu Leu Arg

20

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Phe Thr Asp Asp Glu Asn Ser Glu Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp

20 25 30

Arg

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 9

Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro

1 5 10 15

Lys

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Streptococcus equisimilis

<400

> 10

Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro

1 5 10 15

Lys

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-A2 restricted epitopes located at the extracellular domains

of the HER2/neu molecule

<400> 11

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-A2 restricted epitopes located at the extracellular domains

of the HER2/neu molecule

<400> 12

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-A2 restricted epitopes located at the extracellular domains of the HER2/neu molecule

<400> 13

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val

1 5

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 14

ggtcacagct gaggacggaa cacagcgtt tgagaaatgc agcaagccct gtgct 55

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 15

cgagtggtgct atggcttggg catggagcac cttcgagggg cgagggccat caccagtgac 60

<210> 16

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 16

aatgtccagg agtttcatgg ctgcaagaag atctttggga gcctggcatt tttgccggag 60

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 17

agctttcatgg gggacccctc ctccggcatt gctccgctga ggcctgagca gctccaagtg 60

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 18

ttcgaaaccc tggaggagat cacaggttac ctgtacatct cagcatggcc agacagtctc 60

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 19

cgtgacctca gtgtttcca gaaccttcga atcattcggg gacggattct ccacgatggc 60

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 20

gcgtactcat tgacactgca aggcctgggg atccactcgc tggggctgcg ctcactgccc 60

<210> 21

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 21

gagctggca gtggattggc tctgattcac cgcaacgccc atctctgctt tgtacacact 60

<210> 22

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 22

gtaccttggg accagcttt ccggaaccca catcaggccc tgctccacag tggaaaccgg 60

<210> 23

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 23

ccggaagagg attgtgtct cgagggcttg gtctgttaact cactgtgtgc ccacggcac 60

<210> 24

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC2 (base pairs 975 -1029 of HER2/neu)

<400> 24

tgctggggc cagggccac ccagtgtgtc aactgcagtc atttccttcg gggccaggag 60

<210> 25

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 25

cgcgcagcgg agcaatgcc accaggctc agatgcggat cctaaaagag acggagc 57

<210> 26

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 26

taaggaaggt gaaggtgtt ggatcaggag cttttggcac tgtctacaag ggcatctgga 60

<210> 27

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 27

tcccagatgg ggagaatgtg aaaatccccg tggctatcaa ggtgttgaga gaaaacacat 60

<210> 28

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 28

ctcctaaagc caacaaagaa attctagatg aagcgtatgt gatggctgg gtgggttctc 60

<210> 29

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 29

cgtatgtgtc ccgcctcctg ggcatctgcc tgacatccac agtacagctg gtgacacagc 60

<210> 30

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 30

ttatgcccta cggctgcctt ctggaccatg tccgagaaca ccgaggtcgc ctaggctccc 60

<210> 31

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 31

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

1

5

10

15

Gly Thr Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys
 20 25 30
 Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Ala Cys Cys
 35 40 45

Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Thr Gly Cys
 50 55 60

<210> 32

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 32

Gly Gly Cys Thr Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr
 20 25 30

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

35 40 45
 Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Gly Thr Cys Ala

50 55 60

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 33

agattacaga tttcgggctg gctcggctgc tggacattga tgagacagag taccatgcag 60

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 34

atggggcaa ggtgccatc aaatggatgg cattggaatc tatttcaga cgccgggtca 60

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 35

cccatcagag tcatgtgtgg agctatggag tgactgtgtg ggagctgatg actttgggg 60

<210> 36

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 36

ccaaaccta cgttggaaatc ccagccggg agatccctga tttgctggag aaggagaa 59

<210> 37

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 37

cgcttacctc agcctccaaat ctgcaccatt gatgtctaca tgattatggt caaatgtt 58

<210> 38

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 38

ggatgattga ctctgaatgt cgcccgagat tccgggagggt ggtgtcagaa tttt 54

<210> 39

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alignment of IC1 (base pairs 2114-3042 of HER2/neu)

<400> 39

cacgtatggc gagggacccc cagcgtttg tggcatcca gaacgaggac tt 52

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC1 (base pairs 399-758 of HER2/neu)

<400> 40

cccaggcaga accccagagg ggctgcggga gctgcagctt cgaagtctca cagagatcct 60

<210> 41

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC1 (base pairs 399-758 of HER2/neu)

<400> 41

gaagggagga gtttgatcc gtggAACCC tcagctctgc taccaggaca tggtttgtg 60

<210> 42

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC1 (base pairs 399-758 of HER2/neu)

<400> 42

ccgggcctgt ccaccttgtg ccccgccctg caaagacaat cactgttggg gtgagagtcc 60

<210> 43

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alignment of EC1 (base pairs 399-758 of HER2/neu)

<400> 43

ggaagactgt cagatcttga ctggcaccat ctgtaccagt ggttgtgccg ggtgcaaggg 60

<210> 44

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Alignment of EC1 (base pairs 399-758 of HER2/neu)

<400> 44

ccggctgcc actgactgct gccatgagca gtgtgccgca ggctgcacgg gccccaa 60

<210> 45

<211> 3716

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 45

ccggaatcgc gggcacccaa gtgtgttacgg gcacagacat gaagttgcgg ctccctgcca 60

gtcctgagac ccacctggac atgctccgccc acctgtacca gggctgtcag gtatgcagg 120

gcaacttgga gcttacctac gtgcctgcca atgccagcct ctcattcctg caggacatcc 180

aggaagtta gggttacatg ctcatcgctc acaaccaggta gaagcgcgtc ccactgcaaa 240

ggctgcgcatt cgtgagaggg acccagctt ttgaggacaa gtatgcctg gctgtgttag 300

acaacccgaga tcctcaggac aatgtcgcgc cctccacccc aggcagaacc ccagaggggc 360

tgcgggagct gcagcttcga agtctcacag agatcctgaa gggaggagtt ttgatccgt 420

ggaaccctca gctctgctac caggacatgg ttttggaa ggacgtcttc cgcaagaata 480

accaactggc tcctgtcgat atagacacca atcggtcccg ggcctgtcca ctttgtgccc 540

ccgcctgcaa agacaatcac tgggggtg agactccgga agactgtcag atcttgactg 600

gcaccatctg taccatggg tttgtggct gcaaggcccg gctgcccact gactgctgcc 660

atgaggcagt tgccgcaggc tgcacgggcc ccaagcattc tgactgcctg gcctgcctcc 720

acttcaatca tagtgtatc tgtgagctgc actgcccagc cctcgatcacc tacaacacag 780

acaccccttga gtccatgcac aaccctgagg gtcgtacac ctttgtgccc agctgcgtga 840

ccacccctgccctt cttacaactac ctgtctacgg aagtgggatc ctgcactctg gtgtgtcccc 900

cgaataacca agaggcaca gctgaggacg gaacacagcg ttgtgagaaa tgcagcaagc 960

cctgtgctcg agtgtgctat ggtctggca tggagcacct tcgagggcgc agggccatca 1020

ccagtgacaa tgtccaggag tttgtatggct gcaagaagat ctttgggagc ctggcatttt 1080

tgccggagag ctttggatggg gacccttcctt ccggcatttc tccgctgagg cctgaggcagc 1140

tccaagtgtt cggaaaccctgt gaggagatca caggatctt gtacatctca gcatggccag 1200

acagtcctcg tgacctcagt gtcttcaga accttcgaat cattcgggaa cggatttc 1260

acgatggcgc gtactcattg acactgcaag gcctggggat ccactcgctg gggctgcct	1320
cactgcggga gctgggcagt ggattggctc tgattcaccg caacgccccat ctctgcttg	1380
tacacactgt accttgggac cagctttcc ggaacccaca tcagggccctg ctccacagtg	1440
ggaacctggcc ggaagaggat tgtggtctcg agggcttgggt ctgttaactca ctgtgtgcc	1500

acgggcactg ctggggcca gggcccaccc agtgtgtcaa ctgcagtcat ttccctcggg	1560
gccaggagtgttgtggaggag tgccgagtagt ggaaggggct ccccccggag tatgtgagtg	1620
acaagcgctgtctgccgtgt caccggagt gtcagcctca aaacagctca gagacctgct	1680
ttggatcgga ggctgatcag tgtgcagcct gcccacta caaggactcg tcctctgtg	1740
tggctcgctg ccccagtgggt gtgaaaccgg acctctctta catgcccattc tggaagtacc	1800
cggatgagga gggcatatgc cagccgtgcc ccatcaactg cacccactcc tgtgtggatc	1860
tggatgaacagggctgccccca gcagagcaga gagccagcccc ggtgacattc atcatgtcaa	1920

ctgtgtgtgg cgtcctgctg ttcctgatct tagtggtggt cgttggaaatc ctaatcaaac	1980
gaaggagaca gaagatccgg aagtatacga tgcgtaggct gctgcaggaa actgagttag	2040
tggagccgct gacgcccagc ggagcaatgc ccaaccaggc tcagatgcgg atcctaaaag	2100
agacggagct aaggaaggtg aagggtcttg gatcaggagc ttttggcact gtctacaagg	2160
gcatctggat cccagatggg gagaatgtga aaatccccgt ggctatcaag gtgttgagag	2220
aaaacacatc tcctaaagcc aacaaagaaa ttcttagatga agcgtatgtg atggctggtg	2280
tgggttctcc gtatgtgtcc cgcctctgg gcatctgcct gacatccaca gtacagctgg	2340

tgacacagct tatgccctac ggctgccttc tggaccatgt ccgagaacac cgaggtcgc	2400
taggctccca ggacctgctc aactggtgta ttcagattgc caagggatg agctacctgg	2460
aggacgtgac gcttgtacac agggacctgg ctgccccgaa tgtgctagtc aagagtccca	2520
accacgtcaa gattacagat ttcgggctgg ctggctgct ggacattgtat gagacagagt	2580
accatgcaga tggggcaag gtgcctca aatggatggc attggaaatct attctcagac	2640
gccggttcac ccatcagagt gatgtgtgga gctatggagt gactgtgtgg gagctgtgat	2700
cttttggggc caaaccttac gatggaaatcc cagccccggga gatccctgtat ttgtctggaga	2760

agggagaacg cctacctcg cctccaatct gcaccattga tgtctacatg attatggta	2820
aatgttggat gattgactct gaatgtcgcc cgagattccg ggagttggtg tcagaatttt	2880
cacgtatggc gagggacccc cagcgtttg tggcatcca gaacgaggac ttgggccccat	2940
ccagccccat ggacagtacc ttctaccgtt cactgctgga agatgtatgac atgggtgacc	3000
tggtagacgc tgaagagttt ctgggtcccc agcaggattt cttctcccg gaccctacc	3060
caggcactgg gagcacagcc catagaaggc accgcagtc gtccaccagg agtggaggtg	3120

gtgagctgac actgggcctg gagccctcg aagaaggcc cccagatct ccactggctc	3180
cctcggaagg ggctggctcc gatgtgttg atggtgacct ggcaatgggg gtaaccaaag	3240
ggctgcagag cctctctcca catgacctca gccctctaca gcggtacagc gaggaccca	3300
cattacctct gccccccag actgatggct atgttgctcc cctggctgc agccccagc	3360
ccgagtatgt gaaccaatca gaggttcagc ctcagcctcc tttaacccca gagggtcctc	3420
tgcctcctgt ccggcctgct ggtgctactc tagaaagacc caagactctc tctcctggga	3480
agaatgggt tgtcaaagac gttttgcct tcgggggtgc tgtggagaac cctgaatact	3540
tagtaccgag agaaggcact gcctctccgc cccacccttc tctgccttc agcccagcct	3600
ttgacaacct ctattactgg gaccagaact catcgagca ggggcctcca ccaagtaact	3660
ttgaaggac cccactgca gagaaccctg agtacctagg cctggatgta cctgta	3716
<210> 46	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 46	
cccaaggcaga accccagagg ggctgcggga gctgcagctt cgaagtcata cagagatcct	60
gaagggagga gtttgatcc gtggaaaccc tcagctctgc taccaggaca tggttttg	120
gaaggacgctc ttccgcaaga ataaccaact ggctcctgct gatatagaca ccaatcggtc	180
ccggcctgt ccacccctgtg ccccccctg caaagacaat cactgttggg gtgagagtc	240
ggaagactgt cagatcttga ctggcaccat ctgtaccagt ggttgcgcgg ggtgcaaggg	300
ccggctgccc actgactgct gccatgagca gtgtgcgcga ggctgcacgg gccccaaagca	360
<210> 47	
<211> 618	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 47	
ggtcacagct gaggacggaa cacagcgtt tgagaaatgc agcaagccct gtgcgtcagat	60
gtgcgtatggt ctggcatgg agcacctcg aggggcgagg gccatcacca gtgacaatgt	120
ccagtagttt gaaggctgca agaagatctt tgggagccctg gcattttgc cggagagctt	180
tgtatgggac ccctcctccg gcattgcctc gctgaggcct gaggcgtcc aagtgttca	240
aaccctggag gagatcacag gttacctgta catctcagca tggccagaca gtctccgtga	300

cctcagtgtc ttccagaacc ttcaatcat tcggggacgg attctccacg atggcgctgt	360
ctcattgaca ctgcaaggcc tggggatcca ctgcgtggg ctgcgtcac tgcgggagct	420
gggcagtgga ttggctctga ttcaccgaa cgcccatctc tgcttgtac acactgtacc	480
ttgggaccag ctctccgga acccacatca ggccctgctc cacagtgggaa accggccgga	540
agaggattgt ggtctcgagg gcttggctg taactactg tgtccacg ggcactgctg	600
ggggccaggg cccaccca	618

<210> 48

<211> 929

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 48

cgcgcaggcgg agcaatgcc accaggctc agatgcggat cctaaaagag acggagctaa	60
ggaaggtgaa ggtgcttggaa tcaggagctt ttggcactgt ctacaaggc atctggatcc	120
cagatgggaa gaatgtgaaa atccccgtgg ctatcaaggt gttgagagaa aacacatctc	180
ctaaagccaa caaagaaatt ctatgtgaaat cgtatgtat ggctgggtg ggttctccgt	240
atgtgtcccg cctctggc atctgcctga catccacagt acagctggt acacagctta	300
tgcctacgg ctgcctctg gaccatgtcc gagaacacccg agtgcgccta ggctccagg	360

acctgctcaa ctgggtgttt cagattgcca agggatgag ctacctggag gacgtgcggc	420
ttgtacacag ggacctggct gcccggaaatg tgctagtcaa gagtcccaac cacgtcaaga	480
ttacagattt cgggctggct cggctgctgg acattgtat gacagagttt catgcagatg	540
ggggcaaggt gcccataaa tggatggcat tggaatctat tctcagacgc cggttccacc	600
atcagagtga tgggtggc tatggatgtga ctgtgtggaa gctgtatgact tttggggcca	660
aaccttacga tggatccca gcccggaga tccctgattt gctggagaag ggagaacgcc	720
tacctcagcc tccaatctgc accattgtat tctacatgtat tatggtaaaa tggtggatga	780

ttgactctga atgtcgcccg agattccggg agttgggtgc agaattttca cgtatggcga	840
gggaccccca gcgtttgtg gtcatccaga acgaggactt gggcccatcc agcccatgg	900
acagtagctt ctaccgttca ctgctggaa	929

<210> 49

<211> 3798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

atggagctgg cggccttgg cggctgggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccgagcc	60
gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag	120
acccacctgg acatgctccg ccacctctac caggctgcc aggtggtgca gggaaacctg	180
gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgaggatcc ccaggaggtg	240
cagggtacg tgctcatgc tcacaacca gtgaggcagg tccactgca gaggctgcgg	300
attgtgcgag gcacccagct ctttggggac aactatgcc tggccgtgct agacaatgga	360
gaccgcgtga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg	420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgcgtccagc gaaccccccag	480
ctctgctacc aggacacgt tttgtggaa gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct	540
ctcacactga tagacaccaa ccgctctgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaa	600
ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt	660
gccgggtggct gtggccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcc tgaggcgtgt	720
gctgccggct gcacgggccc caagcactt gactgctgg cctgcctcca cttcaaccac	780
agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggcaccc acaacacaga cacgttttag	840
tccatgccca atcccgaggg ccggatataca ttccggccca gctgtgtgac tgcctgtccc	900
tacaactacc ttctacgga cgtggatcc tgcaccctcg tctgccccct gcacaaccaa	960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga	1020
gtgtgctatg gtctggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgc当地	1080
atccaggagt ttgtggctg caagaagatc tttggggacc tggcatttct gccggagagc	1140
tttggatgggg acccagcctc caacactgcc ccgcgtccagc cagagcagct ccaagtgttt	1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatcttag catggccgga cagcctgcct	1260
gacctcagcg tttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcc	1320
tactcgctga ccctgcaagg gctggcatc agctggctgg ggctgcgc当地 actgaggaa	1380
ctggcagtg gactggccct catccacca aacacccacc tctgctcgat gcacacgg	1440
ccctgggacc agctcttgc gaacccgc当地 caagctctgc tccacactgc caacccgcca	1500
gaggacgagt gtgtggcga gggctggcc tgccaccagc tgtgc当地 agggcactgc	1560
tggggtccag gcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccctgggg ccaggagtg	1620
gtggaggaat gccgagact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc cagggactgt	1680
ttgcccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggcttag tgacctgtt tggacccggag	1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc cttctgc当地 ggcccgc当地	1800

cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccacatct ggaagttcc agatgaggag	1860
ggcgcacatgcc acccacttgc acccactcct gtgtggaccc ggtatgacaag	1920
ggctgcccccg ccgaggcagag agccagccct ctgacgtcca tctgtctgc ggtgggtggc	1980
attctgtctgg tcgtggtctt ggggggtggc tttggatcc tcatcaagcg acggcagcag	2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg	2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg	2160
aggaagggtga aggtgcttgg atctggcgt tttggcacag tctacaaggg catctggatc	2220
cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tttgaggaa aaacacatcc	2280
cccaaagcca acaaagaaat ctttagacgaa gcatacgtga tggctgggtgt gggctcccc	2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt	2400
atgccctatg gctgcctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctccag	2460
gacctgtga actgggttat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggtatgtcg	2520
ctcgataca gggacttggc cgctcgaaac gtgcgttca agagtccaa ccatgtcaaa	2580
attacagact tcgggcttgc tcggctgtc gacattgacg agacagagta ccatgcagat	2640
ggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccggc gcggttacc	2700
caccagagtg atgtgtggag ttatgggtgt actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc	2760
aaaccctacg atggatccc agcccgaggatccctgacc tgcgtggaaa gggggagcgg	2820
ctgccccagc ccccatctg caccattgtat gtctacatga tcatggtcaa atgtggatg	2880
attgactctg aatgtcgcc aagattccgg gagttgggtgt ctgaattctc ccgcattggcc	2940
agggaccccc agcgcttgc ggtcatccag aatgaggact tggggccagc cagtccttg	3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggaccc ggtggatgct	3060
gaggagttatc tggtaaaaaa gcaggcgttc ttctgtccag accctggccc gggcgctgg	3120
ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca	3180
ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc caetggcacc ctccgaagg	3240
gctggctccg atgtatttga tggtgacctg ggaatggggg cagccaagg gctgcaaagc	3300
ctccccacac atgacccac cccctctacag cggtagactg aggacccac agtaccctg	3360
ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccct ctgacgtcca gccccagcc tgaatatgt	3420
aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctt gcctgctgcc	3480
cgacctgctg gtgccactct ggaaagggcc aagactctt cccaggaa gaatgggtc	3540

gtcaaagacg ttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacacccag	3600	
ggaggagctg cccctcagcc ccaccctct cctgcctca gcccagcctt cgacaacctc	3660	
tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaaggaca	3720	
cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtgaac cagaaggcca	3780	
agtccgcaga agccctga	3798	
<210> 50		
<211> 393		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 50		
gagacccacc tggacatgct ccgccaccc taccaggctt gccaggggtt gcagggaaac	60	
ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tcctgcagga tatccaggag		120
gtgcaggcgt acgtgctcat cgctcacaac caagtggc aggtccact gcagaggctg	180	
cggattgtgc gaggcaccca gcttttag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat	240	
ggagaccgcg tgaacaatac cacccctgtc acaggggcct cccaggagg cctgcgggag	300	
ctgcagcttc gaagcctcac agagatctt aaaggagggg tcttgatcca gcggaaacccc	360	
cagctctgct accaggacac gatttgtgg aag	393	
<210> 51		
<211> 477		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 51		
aatatccagg agtttgctgg ctgcaagaag atcttgga gcctggcatt tctgccggag	60	
agctttgatg gggacccagc ctccaacact gccccgtcc agccagagca gctccaagtg	120	
ttttagactc tggaaagat cacaggttac ctatacatct cagcatggcc ggacagcctg	180	
cctgacctca gcgcttcca gaacctgcaa gtaatccggg gacgaattct gcacaatggc	240	
gcctactcgc tgaccctgca agggctggc atcagctggc tggggctgct ctcactgagg	300	
gaactggca gtggactggc cctcatccac cataacaccc acctctgctt cgtgcacacg	360	
gtgccctggg accagcttt tcggaaacccg caccaagctc tgctccacac tgccaaacgg	420	
ccagaggacg agtgtgtggg cgagggcctg gcctgccacc agctgtgcgc ccgaggg		477
<210> 52		
<211> 391		

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

cagcagaaga tccgaagta cacgatgcgg agactgctgc aggaaacgga gctggtgag	60
ccgctgacac ctagcgagc gatgccaaac caggcgcaga tgccgttgc gaaagagacg	120
gagctgagga aggtgaaggt gcttggatct ggccgttttgc acagtcttca caagggcatc	180
tggatccctg atggggagaa tgtaaaatt ccagtggcca tcaaagtgtt gaggaaac	240
acatccccca aagccaacaa agaaatctt aacgaagcat acgtgtatggc tgggtgtggc	300

tccccatatg tcctccgcct tctggcattc tgcctgacat ccacggtgca gctggtgaca	360
cagcttatgc cctatggctg cctcttagac t	391

<210> 53

<211> 7075

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pAdv164 sequence

<400> 53

cgaggttat actggcttac tatgttggca ctgtatgggg tgcgtgttgc gtcgttcatg	60
tggcaggaga aaaaaggctg caccgggtcg tcagcagaat atgtgataca ggtatatttc	120
cgcttcctcg ctactgact cgctacgctc ggtcggtcg ctgcggcgag cgaaatggc	180
ttacgaacgg ggcggagatt tccttggaa tggccaggaat atacttaaca ggaaatgttgc	240

aggccgcgg caaagccgtt tttccatagg ctccgcggcc ctgacaagca tcacgaaatc	300
tgacgctcaa atcgtgggt gcgaaaccccg acaggactat aaagataccg ggcgttccc	360
cctggcggtt ccctcggtcg ctctcctgtt cctgccttc ggttaccgg tgcattccg	420
ctgttatggc cggtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcaatgtcg	480
ctccaaatgt gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtc gaccgtcgcc cttatccgg	540
taactatcgt ctgttgttcca accccggaaat acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac	600
tggtaattga tttagaggag tttagtcttgc agtcatgcgc cggtaaggc taaactgaaa	660

ggacaagttt tgggtactgc gtcctccaa gccagttacc tgggttcaaa gagttggtag	720
ctcagagaac ctgcggaaaa ccgcctgca aggccgtttt ttcgtttca gagcaagaga	780
ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag atcatctttaatcagata aaatattct	840
agccctcctt tgatttagtat attccttatct taaagttact tttatgtgga ggcattaaaca	900
tttggtaatg acgtcaaaaag gatagcaaga ctagaataaa gctataaagc aagcatataaa	960

tattgcgtt catctttaga agcgaatttc gccaatatta taattatcaa aagagagggg	1020
tggcaaacgg tatttggcat tattaggtta aaaaatgtag aaggagagtg aaacccatga	1080
aaaaaataat gctagtttt attacactta tattagttag tctaccaatt gcgcaacaaa	1140
ctgaagcaaa ggatgcacatc gcattcaata aagaaaattc aatttcatcc atggcaccac	1200
cagcatctcc gcctgcaagt cctaagacgc caatcgaaaa gaaacacgacg gatgaaatcg	1260
ataagtataat acaaggattg gattacaata aaaacaatgt attagtatac cacggagatg	1320
cagtgacaaa tgtgcccca agaaaaggtt acaaagatgg aatgaatat attgttgtgg	1380
agaaaaagaa gaaatccatc aatcaaata atgcagacat tcaagttgtg aatgcaattt	1440
cgaggctaac ctatccaggc gctctcgtaa aagcgaattc ggaattagta gaaaatcaac	1500
cagatgttct ccctgtaaaa cgtgattcat taacactcag cattgatttgc caggtatga	1560
ctaatacaaga caataaaata gttgtaaaaa atgccactaa atcaaacgtt aacaacgcag	1620
taaatacatt agtggaaaga tggaaatgaaa aatatgctca agcttatcca aatgttaatgt	1680
caaaaattga ttatgtgac gaaatggctt acagtgaatc acaattaatt gcgaaatttgc	1740
gtacagcatt taaagctgta aataatagct tgaatgtaaa cttcggcgca atcagtgaag	1800
ggaaaatgca agaagaagtc attagttta aacaatttca ctataacgtg aatgttaatgt	1860
aacctacaag accttccaga ttttcggca aagctgttac taaagagcag ttgcaagcgc	1920
ttggagtgaa tgcagaaaaat cctccgtcat atatctcaag tgtggcgtat ggccgtcaag	1980
tttatttgaa attatcaact aattccata gtactaaagt aaaagctgct tttgtatgcgt	2040
ccgtaagcgg aaaatctgtc tcaggtgatg tagaactaac aatatcatc aaaaattctt	2100
ccttcaaagc cgtaatttac ggaggttccg caaaaatgtg agttcaatc atcgacggca	2160
acctcggaga cttacgcgt attttggaaa aaggcgctac tttatcgaa gaaacaccag	2220
gagttccat tgcttataca acaaacttcc taaaagacaa tgaatttagct gttattaaaa	2280
acaactcaga atatattgaa acaacttcaa aagcttatac agatggaaaa attaacatcg	2340
atcactctgg aggatacgtt gctcaattca acatttcttgc ggttgaagta aattatgtac	2400
tgcgagacca cctggacatc ctccggcacc tctaccaggc ctggcagggt gtgcaggaa	2460
acctggaact cacctacactg cccaccaatg ccagcctgtc cttcctgcag gatatccagg	2520
aggtgcaggc ctacgtgctc atcgtcaca accaagttag gtcaggatcc ctgcagaggc	2580
tgcggattgt gcgaggcacc cagcttttgc aggacaacta tgccctggcc gtgctagaca	2640
atggagaccc gctgaacaat accaccctgc tcacagggc ctcccccaggaa ggcctgcggg	2700

agctgcagct tcgaagcctc acagagatct tgaaaggagg ggtcttgatc cagcggacc	2760
cccagctctg ctaccaggac acgatttgtt ggaagaatat ccaggagtt gctggctgca	2820
agaagatctt tgggagcctg gcatttctgc cggagagctt tcatggggac ccagcctcca	2880
acactgcccc gctccagcca gaggagctcc aagtgttga gactctggaa gagatcacag	2940
gttacctata catctcagca tggccggaca gcctgcctga cctcagcgtc ttccagaacc	3000
tgcaagtaat ccggggacga attctgcaca atggcgctt ctcgctgacc ctgcaaggc	3060
tgggcatcag ctggctgggg ctgcgctcac tgagggact gggcagtggc ctggccctca	3120
tccaccataa caccaccc tcgttcgtgc acacggtgcc ctgggaccag ctcttcgga	3180
acccgcacca agctctgctc cacactgcca accggccaga ggacgagtgt gtggcgagg	3240
gcctggcctg ccaccagctg tgcgcgcgag ggcagcagaa gatccggaa tacacgtgc	3300
ggagactgct gcaggaaacg gagctggtgg agccgctgac acctagcggc gcgatgccca	3360
accaggcgca gatgcggatc ctgaaagaga cggagctgag gaaggtgaag gtgcttgat	3420
ctggcgctt tggcacagtc tacaaggca tctggatccc tcatggggag aatgtgaaaa	3480
ttccagtggc catcaaagtg ttgagggaaa acacatcccc caaagccaac aaagaatct	3540
tagacgaagc atacgtgatg gctgggtgtgg gctccccata tgtctccgc cttctggca	3600
tctgcctgac atccacggtg cagctggta cacagcttat gccctatggc tgccttttag	3660
actaatctag acccggcca ctaactcaac gctagtagt gatttatcc caaatgagcc	3720
aacagaacca gaaccagaaa cagaacaagt aacattggag ttagaaatgg aagaagaaaa	3780
aagcaatgat ttctgtgaa taatgcacga aatcattgtct ttttttttta aaaagcgata	3840
tactagat aacgaaacaa cgaactgaat aaagaataca aaaaaagagc cacgaccagt	3900
taaaggctga gaaactttaa ctgcgagct taattgatta ccaccaatca attaaagaag	3960
tcgagaccca aaatttggta aagtatttaa ttactttatt aatcagatac ttaaatatct	4020
gtaaacccat tatatcggtt ttttggggg atttcaagtc tttaagaaga taccaggca	4080
tcaattaaga aaaacttagt tgattgcctt ttttgggtt atcaacttt gatctgtact	4140
tctaactaat taatttcgta aagaaaggag aacagctgaa tgaatatccc ttttgggtta	4200
gaaactgtgc ttcatgacgg ctgtttaaag tacaaattta aaaaatgtaa aattcgctca	4260
atcactacca agccaggtaa aagtaaaggg gctattttg cgtatcgctc aaaaaaaagc	4320
atgattggcg gacgtggcgt tggctgtact tccgaagaag cgattcacga aaatcaagat	4380
acatttacgc attggacacc aaacgtttat cgttatggta cgtatgcaga cgaaaaccgt	4440

tcatacacta aaggacattc tgaaaacaat ttaagacaaa tcaatacctt ctttatttat	4500
tttgatattc acacggaaaa agaaaactatt tcagcaagcg atatttaac aacagctatt	4560
gatttagtt ttatgcctac gttattatc aaatctgata aaggatctca agcatattt	4620
gttttagaaa cgcgcgtctt tttgactica aaatcagaat tttaaatctgt caaaggcgg	4680
aaaataatct cgccaaatctt ccgagaatattt tttggaaagt cttgcgcgt tgatctaacc	4740
tgcaatcatt ttggattgc tcgtatcca agaacggaca atgtagaatt ttttgatccc	4800
aattaccgtt attcttcaa agaatggcaa gattggctt tcaaacaac agataataag	4860
ggctttactc gtcaagtct aacgggttta agcggtagac aaggcaaaaa acaagtagat	4920
gaaccctgggt ttaatcttattgcacgaa acgaaatttt caggagaaaa gggttttagta	4980
gggcgcata ggcgttatgtt taccctctt ttagcctact ttagttcagg ctattcaatc	5040
gaaacgtgcg aatataatattt gtttgagttt aataatcgat tagatcaacc ctttagaagaa	5100
aaagaagtaa tcaaaattgt tagaagtgcc tattcagaaa actatcaagg ggctaatagg	5160
gaatacatta ccatttttgc caaagcttgg gtatcaagtg atttaaccag taaagattta	5220
tttgcgtc aagggtgggt taaattcaag aaaaaaagaa gcgaacgtca acgtgttcat	5280
ttgtcagaat gggaaagaaga ttaatggct tatattagcg aaaaagcga tgtatacaag	5340
ccttatttag cgacgaccaa aaaagagatt agagaagtgc taggcattcc tgaacggaca	5400
ttagataaat tgcgttaggt actgaaggcg aatcaggaaa tttctttaa gattaaacca	5460
ggaagaaatg gtggcattca acttgctagt gttaaatcat tgcgtatc gatcattaa	5520
ttaaaaaaag aagaacgaga aagctatata aaggcgctga cagttcgta taaatttagaa	5580
cgtacattta ttcaagaacac tctaaacaaa ttggcagaac gccccaaac ggacccacaa	5640
ctcgatttgt ttagctacga tacaggctga aaataaaacc cgcactatgc cattacattt	5700
atatctatga tacgtgtttt ttttcttgc ctggctagct taattgctt tatttacctg	5760
caataaaagga ttcttactt ccattatact cccatccaaa aaaaacatac gggaaacacg	5820
ggaactattt gtacaggcca cctcatagtt aatggttcg agccttcgtt caatctcatc	5880
catgaaata tattcatccc cctggcgcc tattatgtc acttttgtc cggcgata	5940
ttcctgatcc agtccacca taaattggtc catgcaattt cggccggcaaa ttttcaggcg	6000
tttcccttc acaaggatgt cggccctt caatttcgg agccagccgt ccgcataagcc	6060
tacaggcacc gtcccgatcc atgtgtctt ttccgctgt tactcggtc cgtagctgac	6120
gctctcgcc ttctgtatca gtttgacatg tgacagtgc gaatgcaggg taaatgccgg	6180
acgcagctga aacggtatct cgtccgacat gtcagcagac gggcgaaggc catacatgcc	6240
gatgccaat ctgactgcat taaaaaagcc tttttcagc cggagtcac cggcgctgtt	6300

cgccgcagtgg accattagat tcttaacgg cagcggagca atcagcttt taaagcgctc	6360
aaactgcatt aagaatagc ctcttcctt ttcatccgt gtcgaaaat gggtaaatac	6420
cccttgcac tttaaacgag gggtgcggc aagaattgcc atcacgttct gaacttctc	6480
ctctgtttt acaccaagtc tttcatccc cgtatcgacc ttcatgtaa aatgaagaga	6540
accttttc gtgtggcggg ctgcctcctg aagccattca acagaataac ctgttaaggt	6600
cacgtcatac tcagcagcga ttgccacata ctccggggaa accgcgcca gcaccaat	6660
aggcgcccttc aatccctttt tgccgcgtga aatcgcttca tccaaaatgg ccacggccaa	6720
gcatgaagca cctgcgtcaa gagcagcctt tgctgttct gcatcaccat gcccgtaggc	6780
tttgctttc acaactgcca tcaagtggac atgttacccg atatgtttt tcataattgt	6840
gacatttcc ttatcgccg acaagtcaat ttccgcccac gtatctctgt aaaaaggttt	6900
tgtgctcatg gaaaactcct ctcttttc agaaaatccc agtacgtaat taagtattt	6960
agaattaatt ttatattgt taataactaag ttacccagt ttacccaa aaaacaaatg	7020
atgagataat agctccaaag gctaaagagg actataccaa ctattttta attaa	7075
<210> 54	
<211> 921	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 54	
gccgcgcgca cccaaatgtg caccggcaca gacatgaagc tgccgcgtccc tgccgcgtccc	60
gagacccacc tggacatgtc cccgcaccc taccagggtt gcccgggtt gcaggaaac	120
ctggaaactca cctacctgcc caccaatgcc agcgtgttctt tcctgcagga tatccaggag	180
gtgcagggtt acgtgtcat cgctcacaac caagtggagc aggtccact gcaggaggctg	240
cggatttgtc gaggcaccca gctcttttag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat	300
ggagacccgc tgaacaatac cacccctgtc acaggggcct ccccaggagg cctgcgggag	360
ctgcagcttc gaagcctcac agagatctt aaaggagggg tcttgatcca gggaaacccc	420
cagctctgtt accaggacac gattttgtt aaggacatct tccacaagaa caaccagctg	480
gctctcacac tggatagacac caaccgcctt cgggcctgcc acccctgttcc tccgtatgtt	540
aagggtccc gctgctgggg agagagttctt gaggattgtc aggcctgac ggcactgtc	600
tgtgccgtt gctgtgcccgtt gcaaggggg ccactgccc ctgactgtt ccatgagcag	660
tgtgctgccc gctgcacggg ccccaagcac tctgactgcc tggcctgcctt ccacttcaac	720
cacagtggca tctgtgagct gcaactgccc gcccgttca cctacaacac agacacgttt	780

gagtccatgc ccaatccgaa gggccggat acattcgccg ccagctgtgt gactgcctgt	840
ccctacaact acctttctac ggacgtggaa tcctgcaccc tcgtctgccc cctgcacaac	900
caagaggta cagcagagga t	921
<210> 55	
<211> 597	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 55	
taccttcta cggacgtggg atcctgcacc ctgcgtcgcc ccctgcacaa ccaagaggta	60
acagcagagg atgaaacaca gcgggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc ccgagtggtgc	120
tatggctctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc caatatccag	180
gagtttgcgt gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgcggaa gagctttgat	240
ggggaccacag cctccaaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt gtttgagact	300
ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct gcctgaccc	360
agcgctttcc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgccacaatgg cgcctactcg	420
ctgaccctgc aaggctggg catcagctgg ctggggctgc gtcactgag ggaactggc	480
agtggactgg ccctcatcca ccataaacacc cacctctgct tcgtgcacac ggtgccctgg	540
gaccagctct ttggaaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg gccagag	597
<210> 56	
<211> 1209	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 56	
cagcagaaga tccggaagta cacgatgcgg agactgctgc agaaacggg gctgggtggag	60
ccgctgacac ctagcggagc gatgccaaac caggcgcaga tgccggatct gaaagagacg	120
gagctgagga aggtgaaggt gttggatct ggccgttttgc acagatcta caagggcatc	180
tggatccctg atggggagaa tgtgaaaatt ccagtggcca tcaaagtgtt gaggaaac	240
acatccccca aagccaacaa agaaatctt aacgaaagcat acgtgtggc tggtgtggc	300
tcccccataatg tctcccgct tctggcgtc tgcctgacat ccacgggtca gctgggtaca	360
cagcttatgc cctatggctg ccttttagac catgtccggg aaaaccggg acgcctggc	420
tcccaggacc tgcgtgaactg gtgtatgcag attgccaagg ggatgagcta cctggaggat	480
gtgcggctcg tacacaggta cttggccgtt cggaaacgtgc tggtaagag tcccaaccat	540

gtcaaaat	cagacttcgg	gctggctcg	ctgctggaca	ttgacgagac	agagtaaccat	600
gcagatggg	gcaaggtgcc	catcaagtgg	atggcgctgg	agtccattct	ccgccggcgg	660
tacccacc	agagtgtat	gtggagttat	ggtgtgactg	tgtggagct	gatgacttt	720
ggggccaaac	cttacgtatgg	gatcccagcc	cgggagatcc	ctgacactgct	ggaaaagggg	780
gagcggctgc	cccagcccc	catctgcacc	attgtatgtct	acatgatcat	ggtcaaatgt	840
tggatgat	tgatgtatgt	tcggccaaga	ttccggaggt	tggtgtatgt	attctccgc	900
atggccagg	acccccagcg	cttgggtc	atccagaatg	aggacttggg	cccagccagt	960
cccttggaca	gcacccatcta	ccgctactg	ctggaggacg	atgacatggg	ggacactgg	1020
gatgctgagg	agtatctgg	accccagcag	ggcttcttct	gtccagaccc	tgccccggc	1080
gctggggca	tggccacca	caggcaccgc	agctcatcta	ccaggagtgg	cggtggggac	1140
ctgacactag	ggctggagcc	ctctgaagag	gaggccccca	ggtctccact	ggcacccctcc	1200
gaaggggc	t					1209
<210>	57					
<211>	28					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	HER2-Chimera (F)					
<400>	57					
tatctcgag	acccacactgg	acatgttc				28
<210>	58					
<211>	49					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	HerEC1-EC2F (Junction)					
<400>	58					
ctaccaggac	acgatttgt	ggaagaatat	ccaggagttt	gctggctgc		49
<210>	59					
<211>	49					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	HerEC1-EC2R (Junction)					
<400>	59					

gcagccagca aactcctgga tattttcca caaaatctgt tcctggtag	49
<210> 60	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HerEC2-ICIF (Junction)	
<400> 60	
ctgcaccagg ctgtgcgcgg gagggcagca gaagatccgg aagtacacga	50
<210> 61	
<211> 50	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<220><223> HerEC2-ICIR (Junction)	
<400> 61	
tcgtgtactt ccggatcttc tgctgccctc gggcgacag ctggtggcag	50
<210> 62	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HER2-Chimera (R)	
<400> 62	
gtggccggg tctagattag tctaagaggc agccatagg	39
<210> 63	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HER2-EC1(F)	
<400> 63	
ccgcctcgag gccgcgagca cccaaatgt	28
<210> 64	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> HER2-EC1 (R)	
<400> 64	
cgcgactagt ttaatccct gctgtcacct c	31
<210> 65	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HER2-EC2 (F)	
<400> 65	
ccgcctcgag taccttcta cggacgtg	28
<210> 66	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Her- 2- EC2 (R)	
<400> 66	
cgcgactagt ttactctggc cggttggcag	30
<210> 67	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HER2-HER2-IC1(F)	
<400> 67	
ccgcctcgag cagcagaaga tccggaagta c	31
<210> 68	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HER2-IC1 (R)	
<400> 68	
cgcgactagt ttaagccct tcggagggtg	30
<210> 69	
<211> 131	
<212> PRT	

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu

1 5 10 15

Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile

20 25 30

Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu

100 105 110

Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro

115 120 125

Met Cys Lys

130

<210> 70

<211> 131

<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 70

Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu

1 5 10 15

Ile Ala His Ser Gln Val Arg Gln Ile Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile

20 25 30

Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu

35 40 45

Asp Asn Gly Asp Pro Leu Glu Gly Gly Ile Pro Ala Pro Gly Ala Ala

50	55	60	
Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu			
65	70	75	80
Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Ser Pro Gln Leu Cys His Gln Asp			
85	90	95	
Thr Ile Leu Trp Lys Asp Val Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu			
100	105	110	
Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys Pro Pro Cys Ser Pro			
115	120	125	
Ala Cys Lys			
130			
<210> 71			
<211> 75			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 71			
Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu			
1	5	10	15
Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro			
20	25	30	
Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu			
35	40	45	
His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp			
50	55	60	
Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser			
65	70	75	
<210> 72			
<211> 75			
<212> PRT			
<213> Canis lupus			
<400> 72			
Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Arg Val Phe Glu Ala Leu Glu			

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

His Asp Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp			
50	55	60	

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser			
65	70	75	

<210> 73

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val			
1	5	10	15

Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp			
20	25	30	

Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu			
35	40	45	

Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala			
50	55	60	

Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly			
65	70	75	80

Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr			
85	90	95	

Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser			
100	105	110	

Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr			
115	120	125	

Leu Glu Asp

130

<210> 74

<211> 131

<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 74

Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val

1 5 10 15

Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp

20 25 30

Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu

35 40 45

Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala

50 55 60

Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser

100 105 110

Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr

115 120 125

Leu Glu Asp

130