



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월30일
(11) 등록번호 10-0848973
(24) 등록일자 2008년07월22일

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7010961

(22) 출원일자 2002년08월22일

심사청구일자 2006년02월16일

번역문제출일자 2002년08월22일

(65) 공개번호 10-2002-0079887

(43) 공개일자 2002년10월19일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/001779

국제출원일자 2001년02월16일

(87) 국제공개번호 WO 2001/62778

국제공개일자 2001년08월30일

(30) 우선권주장

0004269.7 2000년02월23일 영국(GB)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO 93/15763 A

전체 청구항 수 : 총 31 항

심사관 : 박정웅

(54) 종양 특이적 동물 단백질

(57) 요약

본 발명은 CASB7439 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드, 이들을 포함하는 면역원성 조성물, 및 재조합 기술에 의해 이러한 폴리펩티드를 생성시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 CASB7439 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 진단학에 사용하는 방법, 및 암, 특히 결장직장암, 자가면역 질병 및 관련 질환의 예방용 및 치료용 백신에 관한 것이다.

(72) 발명자

코케, 티에리

벨기에릭센사르트(비-1330)루드윈스티튜트89스미스
클라인비이참바이오로지칼즈에스.에이.

가울리스,스완,로만,진-토마스

벨기에릭센사르트(비-1330)루드윈스티튜트89스미스
클라인비이참바이오로지칼즈에스.에이.

비날스와이데바술스,카를로타

벨기에릭센사르트(비-1330)루드윈스티튜트89스미스
클라인비이참바이오로지칼즈에스.에이.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 탄자니아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

(30) 우선권주장

0009905.1 2000년04월20일 영국(GB)

0021080.7 2000년08월25일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열로 이루어진 안전하고 유효한 양의 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

SEQ ID NO:16 내지 SEQ ID NO:33 중 하나 이상의 서열로 이루어진 펩티드를 포함하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

안전하고 유효한 양의 제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, TH-1 유도성 애쥬번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, TH-1 유도성 애쥬번트가 3D-MPL, QS21, QS21과 콜레스테롤의 혼합물, 및 CpG 올리고뉴클레오티드 또는 이들 애쥬번트 중 둘 이상의 혼합물을 포함하는 애쥬번트의 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1항에 규정된 폴리펩티드로 시험관내 로딩시킴으로써 변형되거나 상기 폴리펩티드를 발현시키도록 유전학적으로 시험관내 변형된 유효량의 항원제시세포 및 약제학적으로 유효한 담체를 포함하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

SEQ ID NO:10의 단리된 폴리펩티드.

청구항 12

SEQ ID NO:10의 폴리펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 재조합 생(生)미생물.

청구항 14

제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 제 12항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 15

제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드 또는 제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적합한 애주번트, 희석제 또는 그 밖의 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합시키는 것을 포함하여 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 16

폴리펩티드를 생성시키기에 충분한 조건하에서 제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 제 12항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 배지로부터 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하여, 제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 생성시키는 방법.

청구항 17

제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드 또는 제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 암중에 걸려있거나 걸리기 쉬운 환자의 면역요법적 치료용 백신.

청구항 18

제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드 또는 제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 결장암 또는 그 밖의 결장 관련 종양 또는 질병에 걸려있거나 걸리기 쉬운 환자의 면역요법적 치료용 백신.

청구항 19

제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드 또는 제 1항 또는 제 11항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포유동물의 면역계로부터의 세포와 시험관내 인큐베이션시킴으로써 생성된 활성화된 면역 세포를 포함하는, 면역예방 또는 치료에 의해 피검자를 치료하기 위한 약제 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 결장직장암의 치료를 위해 사용됨을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 21

제 1항에 규정된 폴리펩티드에 대해 면역특이적인 항체.

청구항 22

제 1항에 규정된 폴리펩티드에 대한 효능제 또는 길항제.

청구항 23

(a) 제 1항에 규정된 폴리펩티드에 대한 효능제 또는 길항제;

(b) 제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드; 또는

(c) 제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 핵산 분자인 치료용 화합물.

청구항 24

제 1항에 규정된 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하는, 피검자에서 제 1항에 규정된 폴리펩티드의 발현 또는 활성과 관련된 피검자의 질병 또는 질병에 대한 감수성을 진단하기 위한 진단 키트.

청구항 25

제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열에 상보적인 서열을 지닌 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 피검자에서 제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성과 관련된 피검자의 질병 또는 질병에 대한 감수성을 진단하기 위한 진단 키트.

청구항 26

제 1항에 규정된 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하는, 피검자에서 제 1항에 규정된 폴리펩티드의 발현 또는 활성과 관련된 피검자의 결장직장암의 존재 또는 결장직장암에 대한 감수성을 진단하기 위한 진단 키트.

청구항 27

제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열에 상보적인 서열을 지닌 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 피검자에서 제 1항에 규정된 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성과 관련된 피검자의 결장직장암의 존재 또는 결장직장암에 대한 감수성을 진단하기 위한 진단 키트.

청구항 28

안전하고 유효한 양의 제 4항에 규정된 펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암치료용 면역원성 조성물.

청구항 29

제 4항에 규정된 펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 재조합 생(生)미생물.

청구항 30

제 4항에 규정된 펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 31

제 4항에 규정된 펩티드를 적합한 애주번트, 희석제 또는 그 밖의 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합시키는 것을 포함하여 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 32

폴리펩티드를 생성시키기에 충분한 조건하에서 제 4항에 규정된 펩티드를 엔코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 배지로부터 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하여, 제 4항에 규정된 펩티드를 생성시키는 방법.

청구항 33

제 4항에 규정된 펩티드를 포함하는, 암종에 걸려있거나 걸리기 쉬운 환자의 면역요법적 치료용 백신.

청구항 34

제 4항에 규정된 펩티드를 포함하는, 결장암 또는 그 밖의 결장 관련 종양 또는 질병에 걸려있거나 걸리기 쉬운 환자의 면역요법적 치료용 백신.

청구항 35

제 4항에 규정된 펩티드에 대해 면역특이적인 항체.

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 종양 관련 항원에 대한 면역 반응을 유도시키기 위한 약제학적 조성물 및 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 본원에서 CASB7439 폴리뉴클레오티드로 일컬어지는 폴리뉴클레오티드, 이에 의해 엔코딩된 폴리펩티드(본원에서 CASB7439 폴리펩티드로서 일컬어짐), 재조합 물질 및 이들을 생성시키는 방법에 관한 것이다. 또 다른 일면에서, 본 발명은 암, 더욱 특히 결장직장암, 및 자가면역 질병 및 그 밖의 관련 질환의 치료를 포함하는, 상기 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 일면에서, 본 발명은 CASB7439 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약제학적 조성물, 이러한 조성물을 제조하는 방법 및 의학 분야에서의 이들의 용도에 관한 것이다. 또 다른 일면에서, 본 발명은 본 발명에 의해 제공된 물질을 사용하여 효능제 및 길항제/억제제를 동정하고, 동정된 화합물을 사용하여 CASB7439 폴리펩티드 불균형과 관련된 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 추가의 일면에서, 본 발명은 부적절한 CASB7439 폴리펩티드 활성 또는 레벨과 관련된 질병을 검출하기 위한 진단 검정에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 종양에 대한 특이적인 예방적 또는 치료적 면역화를 위해 중요한 면역원인데, 이는 이들이 정상 세포에 비해 종양에서 특이적으로 발현되거나 고도로 과잉-발현되어서 종양 세포의 파괴를 초래하는 항원-특이적 면역 메커니즘에 의해 표적화될 수 있기 때문이다. 이들 물질은 종양 세포의 발생을 진단하는 데에도 사용될 수 있다. 또한, 특정 환경에서의 이들의 부적절한 발현은 자가면역, 부적절한 면역 반응을 유도시킬 수 있으며, 이들은 동일한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 사용하는 적절한 백신접종을 통해 바로잡을 수 있다. 이와 관련하여, 이를 위해 가장 중요한 생물학적 활성은 본 발명의 폴리펩티드의 항원성 및 면역원성 활성이다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 CASB7439 폴리펩티드의 하나 이상의 다른 생물학적 활성을 나타낼 수 있고, 이는 면역반응과 연관된 표적과는 상이한 치료적 또는 예방적 개입을 위한 표적으로서 이를 적합하게 해줄 수 있다.

발명의 상세한 설명

- <3> 첫 번째 일면에서, 본 발명은 CASB7439 폴리펩티드에 관한 것이다. 상기 펩티드는 각각 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함하며, 단, 상기 단리된 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14가 아니다. 상기 폴리펩티드로는 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 있다.
- <4> 본 발명의 추가 펩티드는 아미노산 서열이 각각 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 단리된 폴리펩티드를 포함하며, 단, 상기 단리된 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14가 아니다. 이러한 폴리펩티드로는 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11의 폴리펩티드가 있다.
- <5> 바람직하게는, 상기 언급된 폴리펩티드는 재조합적으로 생성된다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 정제되어, 임의의 그 밖의 단백질 또는 숙주 유래 오염 물질이 실질적으로 없다.
- <6> 본 발명의 추가 펩티드는 SEQ ID NO:1에 함유된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 단리된 폴

리펩티드를 포함한다.

- <7> 또한, 본 발명은 CASB7439 폴리펩티드의 면역원성 단편, 즉, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드와 동일하거나 유사한 면역원성 특성을 지닌 CASB7439 폴리펩티드의 연속적 부분을 제공한다. 즉, 상기 단편(필요시에, 담체와 커플링된 경우 또는 거대 용합 단백질의 일부로서)은 CASB7439 폴리펩티드를 인식하는 면역 반응을 일으킬 수 있다. 이러한 면역원성 단편으로는 예컨대, N-말단 선도 서열이 결핍된 CASB7439 폴리펩티드, 트랜스멤브레인 도메인 또는 C-말단 앵커 도메인이 있을 수 있다. 한 가지 바람직한 일면에서, 본 발명에 따른 CASB7439의 면역원성 단편은 각각 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 폴리펩티드와 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 폴리펩티드의 실질적으로 모든 세포의 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 면역원성 단편은 하나 이상의 에피토프를 포함한다.
- <8> CASB7439의 에피토프를 혼입하고 있는 펩티드 단편들은 전형적으로 SEQ ID NO:2로부터 7개 이상, 바람직하게는 9개 또는 10개의 연속 아미노산을 포함할 것이다. 바람직한 에피토프는 SEQ ID NO:16 내지 SEQ ID NO:33에 제시되어 있다.
- <9> 상기 에피토프를 혼입하고 있는 펩티드들은 본 발명의 바람직한 일면을 이룬다. 상기 에피토프와 동일한 특징을 가진 미모토프(mimotope), 및 CASB7439 분자와 관련하여 에피토프와 교차반응하는 면역 반응을 생성시키는 상기 미모토프를 포함하는 면역원은 또한 본 발명의 일부분을 이룬다.
- <10> 그러므로, 본 발명은 이들 에피토프 자체를 포함하는 단리된 펩티드, 및 이들의 임의의 미모토프를 포함한다. 미모토프의 의미는 본래의 분자를 인식하는 항체에 의해 인식될 수 있도록 본래의 CASB7439 에피토프와 충분히 유사한 물질로서 정의되거나; (Gheysen, H.M., et al., 1986, Synthetic peptides as antigens. Wiley, Chichester, Ciba foundation symposium 119, p130-149; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23,7,709-715); 적합한 담체에 커플링된 경우, 본래의 분자와 교차반응하는 항체를 생성시킬 수 있는 물질로서 정의된다.
- <11> 상기 확인된 에피토프의 펩티드 미모토프는 선택된 아미노산의 첨가, 결실 또는 치환에 의해 특정 목적을 위해 디자인될 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 단백질 담체와의 용이한 컨쥬게이션을 위해 변형될 수 있다. 예컨대, 에피토프에 말단 시스테인을 포함시키는 것이 일부 화학적 컨쥬게이션 방법을 위해 바람직할 수 있다. 또한, 펩티드의 컨쥬게이션되지 않은 유리 말단이 담체 단백질의 표면과 결합된 상태로 있게 되도록 펩티드의 컨쥬게이션된 말단으로부터 원위에 소수성 말단을 포함시키는 것이 단백질 담체에 컨쥬게이션된 펩티드를 위해 바람직할 수 있다. 이것은 펩티드의 형태적 자유도를 감소시킴으로써, 펩티드가 온전한 분자와 관련하여 발견되는 펩티드의 형태와 가장 비슷한 형태로 제공되게 할 가능성을 증가시킨다. 예컨대, 펩티드는 N-말단 시스테인 및 C-말단 소수성 아미드화된 테일을 가지도록 변화될 수 있다. 또한, 하나 이상의 아미노산의 D-입체이성질체를 첨가하거나 치환하는 것이 유익한 유도체를 생성시키기 위해, 예컨대 펩티드의 안정성을 향상시키기 위해 수행될 수 있다. 당업자는 이러한 변형된 펩티드, 또는 미모토프가 구성 잔기가 반드시 20개 천연 아미노산으로 한정되지 않은 전체적 또는 부분적으로 비펩티드성 미모토프일 수 있음을 인식할 것이다. 또한, 이들은 펩티드 서열이 온전한 분자와 관련되는 경우 이의 모양과 매우 유사한 형태로 펩티드를 제약하도록 당분야에 공지된 기술에 의해 환형화될 수 있다. 펩티드를 환형화시키는 바람직한 방법은 디설파이드 결합이 형성될 수 있도록 한 쌍의 시스테인 잔기를 첨가하는 것을 포함한다.
- <12> 또한, 당업자는 본 발명의 미모토프 또는 면역원이 상기 확인된 에피토프보다 클 수 있고, 그 자체로 본원에 기술된 서열을 포함할 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명의 미모토프는 한쪽 또는 양쪽 말단에 다수의 다른 천연 잔기들의 N 및/또는 C 말단 신장부를 첨가하는 것으로 이루어질 수 있다. 또한, 펩티드 미모토프들은 서열 배향이 반대라는 점에서 천연 서열의 레트로(retro) 서열이거나; 대안적으로, 상기 서열은 전체적으로 또는 적어도 부분적으로 D-입체이성질체 아미노산(인베르소(inverso) 서열)로 구성될 수 있다. 또한, 펩티드 서열은 서열 방향이 반대이고 아미노산이 D-입체이성질체 형태라는 점에서 특징상 레트로-인베르소일 수 있다. 이러한 레트로 또는 레트로-인베르소 펩티드는 비자기(non-self)라는 장점을 가지고 있으며, 그 자체로 면역계에서 자기-내성의 문제점을 극복할 수 있다.
- <13> 또한, 펩티드 미모토프는 파아지 디스플레이 기술 (EP 0 552 267 B1호)과 같은 기술을 사용하여 본 발명의 에피

토프에 그 자체로 결합할 수 있는 항체를 사용하여 확인될 수 있다. 상기 기술은 본래의 펩티드의 구조를 모방하므로 안티-네이티브(anti-native) 펩티드 항체에 결합할 수 있는 다수의 펩티드 서열을 생성시키지만, 이들 서열 자체가 본래의 펩티드와 상당한 서열 상동성을 반드시 공유할 수 있는 것은 아니다. 이러한 방법은 향상된 면역원성 특성을 가진 펩티드를 동정하는 것을 가능하게 함으로써 현저한 장점을 가질 수 있거나, 본래의 펩티드 서열의 사용과 관련될 수 있는 임의의 잠재적인 자기-항원 내성 문제점을 극복할 수 있다. 또한 이 기술은 인식된 미토프 서열 중에서 이의 공유된 화학적 특성의 견지에서 각각의 본래의 펩티드에 대한 인식 패턴을 확인할 수 있게 해준다.

<14> 면역원성 담체에 대한 펩티드의 공유적 커플링은 당 분야에 널리 공지된 방법으로 수행될 수 있다. 따라서, 예컨대, 직접적인 공유적 커플링을 위해, CDAP 및 SPDP와 같은 통상의 시판되는 헤테로2기능성(heterobifunctional) 링커를 사용하여 (제조업체 설명서 이용) 카보디이미드, 글루타르알데히드 또는 (N-[γ -말레이미도부틸옥시]숙신이미드 에스테르를 사용할 수 있다. 커플링 반응 후에, 면역원은 투석 방법, 겔 여과 방법, 분별 방법 등에 의해 쉽게 분리되고 정제될 수 있다.

<15> 본 발명의 면역원에 사용된 담체의 타입은 당업자가 쉽게 알 수 있을 것이다. 담체의 기능은 펩티드에 대한 면역 반응을 유도시키는 것을 돕기 위해 사이토카인 헬프(help)를 제공하는 데에 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 담체의 목록에는 키홀 림펫 해모시아닌(Keyhole limpet Haemocyanin(KLH)), 우혈청 알부민(BSA)과 같은 혈청 알부민, 과산화물 또는 디프테리아 독소(TT 및 DT)와 같은 불활성화된 세균 독소, 또는 이들의 제조합 단편(예컨대, TT의 단편 C의 도메인 1, 또는 DT의 전좌 도메인), 또는 튜버쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 미토프 또는 에피토프는 리포솜 담체에 직접적으로 컨쥬게이션될 수 있으며, 이는 헬퍼 T-세포를 제공할 수 있는 면역원을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 미토프 대 담체의 비는 약 1:1 내지 20:1이고, 바람직하게는 각 담체는 3개 내지 15개의 펩티드를 운반해야 한다.

<16> 본 발명의 구체예에서, 한 가지 바람직한 담체는 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)로부터의 단백질 D이다 (EP 0 594 610 B1호). 단백질 D는 헤모필러스 인플루엔자로부터의 IgD-결합 단백질이고 포르스그렌(Forsgren)에게 특허되었다 (WO 91/18926, 특허 EP 0 594 610 B1). 일부 경우, 예컨대 제조합 면역원 발현 시스템에 있어서, 단백질 D의 단편, 예컨대 단백질 D 1/3rd(단백질 D의 N-말단 100-110 아미노산을 포함(GB 9717953.5))을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

<17> 본 발명의 펩티드를 제공하는 또 다른 바람직한 방법은 제조합 융합 분자와 관련되어 있다. 예컨대, EP 0 421 635 B호에는 외래 펩티드 서열을 바이러스-유사 입자에 함유된 형태로 제공하기 위한 키메라 헤파드나바이러스 코어 항원 입자의 용도가 기술되어 있다. 이와 같이, 본 발명의 면역원은 B형 간염 코어 항원으로 구성된 키메라 입자내에 제공된 펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 제조합 융합 단백질은 본 발명의 미토프 및 인플루엔자 바이러스의 NS1과 같은 담체 단백질을 포함할 수 있다. 본 발명의 일부분을 이루는 임의의 제조합적으로 발현된 단백질의 경우, 면역원을 엔코딩하는 핵산은 본 발명의 일면을 또한 이룬다.

<18> 본 발명에 사용되는 펩티드는 당분야에 널리 공지된 고상 방법에 의해 쉽게 합성될 수 있다. 적합한 합성은 "T-boc" 또는 "F-moc" 방법에 의해 수행될 수 있다. 환형 펩티드는 완전 자동화된 장치내에서 널리 공지된 "F-moc" 방법 및 폴리아미드 수지를 사용하는 고상 방법에 의해 합성될 수 있다. 또한, 당업자는 수작업으로 상기 방법을 수행하기 위한 필수적인 실험실 방법들을 알 것이다. 고상 합성을 위한 기술 및 방법은 문헌['Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach' by E. Atherton and R.C. Sheppard, Published by IRL at Oxford University Press(1989)]에 기술되어 있다. 또한, 펩티드는 세균 또는 포유류 세포주내에서 미토프를 엔코딩하는 핵산 분자를 발현시킨 다음 발현된 미토프를 정제하는 것을 포함하는 제조합 방법에 의해 생성될 수 있다. 펩티드 및 단백질의 제조합 발현을 위한 기술은 당분야에 공지되어 있으며, 문헌[Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)]에 기술되어 있다.

<19> 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 본원에 기술된 폴리펩티드를 생성시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 방법은 마니아티스(Maniatis) 등의 문헌[Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982-1989]에 기술된 것과 같은 통상의 제조합 기술에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩티드를 생성시키기에 충분한 조건하에서 숙주 세포를 배양하고, 배지로부터 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하여 폴리펩티드를 생성시키는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명의 방법은 바람직하게는,

<20> i) 단백질 또는 이의 면역원성 유도체를 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 중합체를 숙주 세포에

서 발현시킬 수 있는 복제성 또는 통합형(integrating) 발현 벡터를 준비하는 단계;

- <21> ii) 상기 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;
- <22> iii) 상기 DNA 중합체를 발현시켜서 상기 단백질을 생성시킬 수 있게 하는 조건하에서 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계;
- <23> iv) 상기 단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- <24> 본 발명의 폴리펩티드 또는 면역원성 단편은 "성숙한" 단백질의 형태일 수 있거나 전구체 또는 융합 단백질과 같은 거대한 단백질의 일부분일 수 있다. 분비 또는 선도 서열, 프로(pro)-서열, 다중 히스티딘 잔기와 같은 정제에 도움을 주는 서열, 또는 제조합체 생성 동안의 안정성을 위한 추가의 서열을 함유하는 추가의 아미노산 서열을 포함시키는 것이 종종 유리하다. 또한, 최종 분자의 면역원성 잠재력을 증가시키기 위해 외인성 폴리펩티드 또는 지질 테일 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 첨가가 고려된다.
- <25> 한 가지 일면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편, 및 다양한 서브클래스(IgG, IgM, IgA, IgE)의 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 다양한 부분을 포함하는 유전공학처리된 가용성 융합 단백질에 관한 것이다. 면역글로불린으로서 사람 IgG, 특히 IgG1의 중쇄의 불변 부분이 바람직하며, 여기서 융합은 힌지 영역에서 일어난다. 특정 구체예에서, Fc 부분은 혈액 응고 인자 Xa를 사용하여 절단될 수 있는 절단 서열의 혼입에 의해 간단하게 제거될 수 있다. 또한, 본 발명은 유전공학에 의해 이러한 융합 단백질을 제조하는 방법, 및 약물 스크리닝, 진단 및 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 특히 바람직한 일면은 암종, 특히 결장암 또는 그 밖의 결장 관련된 종양 또는 질병에 걸려 있거나 걸리기 쉬운 환자를 면역요법적으로 치료하기 위한 백신의 제조에서 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명의 추가적인 일면은 상기 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 융합 단백질 기술의 예는 국제 특허 출원 W094/29458호 및 W094/22914호에서 찾아볼 수 있다.
- <26> 본 발명의 단백질은 화학적으로 컨쥬게이션되거나, 융합되지 않은 단백질에 비해 발현 시스템에서 생성되는 레벨이 증가하도록 해주는 재조합 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 융합 파트너는 T 헬퍼 에피토프(면역학적 융합 파트너), 바람직하게는 사람에게 의해 인식되는 T 헬퍼 에피토프를 제공하는데 도움을 주거나, 본래의 재조합 단백질보다 높은 수율로 단백질을 발현시키는데 도움을 줄 수 있다 (발현 인핸서). 바람직하게는 융합 파트너는 면역학적 융합 파트너 및 발현 인핸싱 파트너 둘 모두 일 것이다.
- <27> 융합 파트너에는 헤모필러스 인플루엔자 B로부터의 단백질 D 및 인플루엔자 바이러스로부터의 비구조적 단백질인 NS1 (헤마글루티닌)이 포함된다. 또 다른 면역학적 융합 파트너는 LYTA로서 공지된 단백질이다. 바람직하게는, 분자의 C 말단 부분이 사용된다. Lyta는 N-아세틸-L-알라닌 아미다제, 펩티도글리칸 골격의 특정 결합을 특이적으로 분해시키는 자가분해효소인 아미다제 LYTA[lytA 유전자에 의해 코딩됨(참조: Gene, 43 (1986) page 265-272)]를 합성하는 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)로부터 유도된다. LYTA 단백질의 C-말단 도메인은 콜린, 또는 DEAE와 같은 일부 콜린 유사체와의 친화도를 담당한다. 이러한 특성은 융합 단백질의 발현을 위해 유용한 플라스미드를 발현시키는 *E.coli* C-LYTA의 개발을 위해 이용되고 있다. 아미노 말단에 C-LYTA 단편을 함유하는 하이브리드 단백질의 정제는 문헌[참조: Biotechnology: 10, (1992) page 795-798]에 기술되어 있다. 잔기 178에서 시작하는 C 말단에서 발견되는 Lyta 분자의 반복 부분, 예컨대 잔기 188 내지 305를 사용할 수 있다.
- <28> 또한, 본 발명은 상기 언급된 폴리펩티드의 이종(xenogeneic) 형태 (오르톨로그(ortholog) 형태로도 일컬어짐)를 포함하며, 상기 이종 형태는 기준 항원으로서 작용하지만 상이한 사람 이외의 종으로부터 유래된 사람 항원과 상당한 서열 동일성을 지닌 항원 (자가유래(autologous) 항원으로도 일컬어짐)을 의미한다. 이와 관련하여, 상당한 동일성은, 서열이 당 분야에 공지된 다수의 서열 정렬 단백질 중의 어느 하나에서 최적 정렬로 배열된 경우, 하나의 아미노산 서열과 또 다른 아미노산 서열의 일치 또는 하나의 폴리뉴클레오티드 서열과 또 다른 폴리뉴클레오티드 서열과의 일치를 의미한다. 상당한 동일성은 70 내지 95% 이상, 바람직하게는 85 내지 95% 이상, 가장 바람직하게는 90 내지 95% 이상의 비교된 서열 사이의 서열 동일성을 의미한다. 따라서, 본 발명에 따르면, 이종 CASB7439 폴리펩티드는 사람 CASB7439와 관련하여 이종인, 즉, 사람 이외의 종으로부터 단리된 CASB7439 일 것이다. 한 가지 바람직한 구체예에 있어서, 폴리펩티드는 마우스, 래트, 돼지 또는 붉은털원숭이로부터 단리되며, 가장 바람직하게는 마우스 또는 래트로부터 단리된다. 따라서, 본 발명은 피검자에게 본원에 기술된 사람 CASB7439의 이종 형태를 포함하는 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함하여, 서열 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 지

닌 사람 CASB7439에 대한 면역 반응을 사람에게서 유도시키는 방법을 또한 제공한다. 한 가지 바람직한 구체예는 마우스, 래트, 돼지 또는 붉은털원숭이로부터 단리된 이중 CASB7439를 사용하여 사람 CASB7439에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법이다. 본 발명에 따른 면역반응을 유도시키는 또 다른 바람직한 방법은 상기 이중 항원을 발현시키는 생(生) 바이러스 발현 시스템을 포함하는 항원 조성물을 사용하는 것이다. 바람직한 이중 CASB7439 폴리펩티드는 SEQ ID NO:12 (마우스) 또는 SEQ ID NO:14 (래트)에 기재된 서열을 지닌다.

<29> 단리된 이중 CASB7439 폴리펩티드는 일반적으로 상당한 서열 유사성을 공유하며, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 97 내지 99% 이상의 동일성을 지닌 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 이중 폴리펩티드는 면역원성 단편의 면역원성 활성이 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 폴리펩티드와 실질적으로 동일한, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 폴리펩티드의 면역원성 단편을 포함할 것이다. 또한, 이중 CASB7439 폴리펩티드는 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14에 기재된 아미노산 서열로부터 선택된 약 20개 이상, 바람직하게는 약 30개, 더욱 바람직하게는 약 50개, 더욱 더 바람직하게는 약 100개, 가장 바람직하게는 약 150개의 연속 아미노산의 단편일 수 있다. 더욱 특히, 이중 CASB7439 단편은 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14에 기재된 거대분자의 몇몇 작용적 특성, 바람직하게는 면역학적 활성을 보유하며, 본원에 기술된 방법에서 유용하다 (예컨대, 약제학적 및 백신 조성물, 진단학 등에서). 특히, 상기 단편은 사람 대응부에 대한 면역반응을 발생시킬 수 있는데, 예컨대 SEQ ID NO:2 중 어느 하나에 기재된 CASB7439의 오토로거스(autologous) 사람 형태와 반응하는 교차반응성 항체를 생성시킬 수 있다. 하나의 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 이중 폴리펩티드는 이중 CASB7439 폴리펩티드 또는 이의 단편 및 상기 기술된 융합 파트너로서 작용하는 이중(heterologous) 단백질 또는 단백질의 일부를 포함하는, 거대 융합체의 일부일 수 있다.

<30> 또한, 본 발명은 앞서 언급한 폴리펩티드의 변이체, 즉 보존적 아미노산 치환(이로써 잔기는 유사한 특징을 가진 또 다른 잔기에 의해 치환된다)에 의해 지시물(referent)과 달라지는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 전형적인 치환체는 Ala, Val, Leu 및 Ile중의 하나; Ser 및 Thr중의 하나; 산성 잔기 Asp 및 Glu중의 하나; Asn 및 Gln중의 하나; 및 염기성 잔기 Lys 및 Arg중의 하나; 또는 방향족 잔기 Phe 및 Tyr중의 하나이다. 수 개, 5 내지 10개, 1개 내지 5개, 1개 내지 3개, 1개 내지 2개 또는 1개의 아미노산이 임의의 조합으로 치환, 결실 또는 첨가되는 것이 특히 바람직하다.

<31> 본 발명의 폴리펩티드는 임의의 적절한 방법으로 제조될 수 있다. 이러한 폴리펩티드에는 단리된 천연 발생 폴리펩티드, 재조합적으로 생성된 폴리펩티드, 합성적으로 생성된 폴리펩티드 또는 이들 방법의 조합에 의해 생성된 폴리펩티드가 포함된다. 상기 폴리펩티드들을 제조하는 수단은 당 분야에 널리 알려져 있다.

<32> 추가의 일면에서, 본 발명은 CASB7439 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드에는 각각 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 지닌 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이와 관련하여, 97% 이상의 동일성을 가진 엔코딩된 폴리펩티드가 매우 바람직하지만, 98% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 엔코딩된 폴리펩티드가 더욱 바람직하며, 99% 이상의 동일성을 가진 엔코딩된 폴리펩티드가 가장 바람직하다.

<33> 본 발명의 추가의 폴리뉴클레오티드로는 전체 코딩 영역에 걸쳐서 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 지닌 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 있다. 이와 관련하여, 97% 이상의 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드가 매우 바람직하지만, 98% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드가 더욱 더 바람직하며, 99% 이상의 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드가 가장 바람직하다.

<34> 본 발명의 추가의 폴리뉴클레오티드로는 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9, 또는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9의 코딩 서열의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9의 코딩 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 지닌 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 있다. 이와 관련하여, 97% 이상의 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드가 매우 바람직하지만,

98% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드가 더욱 바람직하며, 99% 이상의 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드가 가장 바람직하다. 이러한 폴리뉴클레오티드로는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9의 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9의 폴리뉴클레오티드 또는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9의 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 있다.

<35> 또한, 본 발명은 상기 언급된 본 발명의 이중 단백질을 엔코딩하는 핵산 및 의학에서의 이들의 용도를 제공한다. 한 가지 바람직한 구체예에 있어서, 약제학적 조성물에 사용되는 이중 CASB7439 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:13 (마우스) 또는 SEQ ID NO:15 (랫)에 기재된 서열을 지닌다. 본 발명에 따른 단리된 이중 CASB7439 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 (코딩 또는 안티센스)이거나 이중 가닥일 수 있으며, DNA (지놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. 추가의 코딩 또는 비코딩 서열이 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 존재할 수 있지만, 반드시 그러한 것은 아니다. 그 밖의 관련 구체예에 있어서, 본 발명은 본원의 SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:15에 기재된 서열과 상당한 동일성을 지닌 폴리뉴클레오티드 변이체, 예컨대 본원에 기술된 방법 (예컨대, 표준 파라미터를 사용하는 BLAST 분석)을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여 70% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 가지 관련 구체예에 있어서, 본 발명의 단리된 이중 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 지닌 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 상기 단리된 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 것이다.

<36> 또한, 본 발명은 상기 기술된 모든 폴리뉴클레오티드와 상보적인 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<37> 상기 폴리뉴클레오티드는 적절한 플라스미드, 재조합 미생물 벡터 또는 재조합 생 미생물내에 삽입되어 번역화를 위해 사용될 수 있다[참조: Wolff et. al., Science 247:1465-1468 (1990); Corr et. al., J. Exp. Med. 184: 1555-1560 (1996); Doe et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8578-8583 (1996)]. 따라서, 상기 규정된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 재조합 생 미생물이 본 발명에서 제공된다.

<38> 또한, 본 발명은 피검자에게 투여되는 경우 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드와 동일한 면역원성 특성을 가진 CASB7439 폴리뉴클레오티드의 단편을 제공한다.

<39> 또한, 본 발명은 상기 규정된 CASB7439 폴리펩티드의 면역학적 단편을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<40> 상기 단편들은 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14에 기재된 폴리펩티드 서열 또는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:15에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열의 면역원성 활성 레벨의 약 50% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상의 면역원성 활성 레벨을 지닌다.

<41> 본 발명에 따른 폴리펩티드 단편은 본원에 기재된 폴리펩티드 조성물, 예컨대 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14에 기재된 폴리펩티드, 또는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:15의 서열에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 엔코딩된 폴리펩티드의 모든 중간 길이를 포함하는, 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 50개 또는 100개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 것이 바람직하다.

<42> SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:2의 폴리펩티드인 193개 아미노산의 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리펩티드 엔코딩 서열 (뉴클레오티드 545 내지 1126)을 포함하는 cDNA 서열이다. SEQ ID NO:2의 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:1에 함유된 폴리펩티드 엔코딩 서열과 동일할 수 있거나, 이것은 유전 코드의 리던던시(redundancy)(축중)의 결과로써 SEQ ID NO:2의 폴리펩티드를 또한 엔코딩하는, SEQ ID NO:1에 함유된 서열과는 다른 서열일 수 있다. SEQ ID NO:2의 폴리펩티드는 아카트 스큐트(achaete scute) 패밀리의 기타 단백질과 구조적으로 관련되며, "사람 아카트 스큐트 동족체 2" (HASH2) (수탁 번호 NP_005161 및 AAB86993)으로도 일컬어진다.

<43> 공식적으로는 사람 ASCL2 (아카트 스큐트 복합체 유사 2)로 명명되는 사람 아카트 스큐트 동족체 2 (HASH2) 유전자는 드로소필라 아카트 및 스큐트 유전자의 동족체이다. 사람 ASCL2는 발생중인 태반의 엑스트라빌루스

(extravillus) 영양막에서만 발현되고, IGF2 및 H19에 가까운 염색체 11p15에서 맵핑된다. 마우스 아캐트-스큐트 동족체-2 유전자 (MASH2)는 영양막의 발생에 있어서 어떤 역할을 하는 전사 인자를 엔코딩한다. Mash2 유전자는 마우스에서 부계 각인(paternal imprint)되며, 비악성 포충상(hydatidiform) (androgonetic) 몰(mole)에서의 사람 ASCL2 발현의 결여는 사람 Asc12가 또한 남자에게 각인됨을 나타내준다.

- <44> Asc12 유전자는 전사 인자의 기본 헬릭스-루프-헬릭스 (BHLH) 패밀리의 일원이다. 이들은 E box (5'-CANNTG-3')에 결합함으로써 전사를 활성화시킨다. 다른 BHLH 단백질을 사용한 이량체화는 효율적인 DNA 결합을 위해 필요하다. 이들은 드로소필라 멜라노게스터(melanogaster) 및 아마도 또한 포유동물의 말초 신경계 및 중추 신경계에서 신경원 전구체의 결정에 관여한다.
- <45> SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드 서열의 상보적 가닥은 SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 이 가닥은 또한 2개의 다른 폴리펩티드 엔코딩 서열을 포함한다. 첫 번째 폴리펩티드 엔코딩 서열 (SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드 1184 내지 399, SEQ ID NO:6의 뉴클레오타이드 608 내지 1393)은 SEQ ID NO:3의 폴리펩티드인 262개의 아미노산의 폴리펩티드를 엔코딩한다. 두 번째 폴리펩티드 엔코딩 서열 (SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드 840 내지 262, SEQ ID NO:6의 뉴클레오타이드 952 내지 1530)은 SEQ ID NO:11의 폴리펩티드인 193개의 아미노산의 폴리펩티드를 엔코딩한다. SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:11의 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:6에 함유된 폴리펩티드 엔코딩 서열과 동일할 수 있거나, 이것은 유전 코드의 리던던시(충중)의 결과로써 SEQ ID NO:3 및 11의 폴리펩티드를 또한 엔코딩하는 SEQ ID NO:6에 함유된 서열과는 다른 서열일 수 있다. SEQ ID NO:3의 폴리펩티드는 호모 사피엔스 스플라이싱 코액티베이터(coactivator) 서브유닛 srm300 (genbank accession AAF21439)과 상동성 및/또는 구조적 유사성을 지닌 스플라이싱 코액티베이터 단백질 패밀리의 다른 단백질과 구조적으로 관련된다. SEQ ID NO:11의 폴리펩티드는 임의의 공지된 단백질과 관련이 없다. SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:11에 기재된 폴리펩티드 서열, 및 SEQ ID NO:6에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열은 신규하며, 본 발명의 일부를 구성한다.
- <46> 본 발명의 바람직한 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오타이드는 특히 이들의 상동 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오타이드와 유사한 생물학적 기능/특성을 가질 것으로 생각된다. 또한, 본 발명의 바람직한 폴리펩티드, 번역학적 단편 및 폴리뉴클레오타이드는 적합하다면 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:11 중 하나 이상의 활성을 가진다.
- <47> 또한, 본 발명은 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:11의 상응하는 전장 서열의 결정 이전에 최초로 확인된 부분적이거나 그 밖의 불완전한 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드에 관한 것이다.
- <48> 따라서, 추가의 일면에서, 본 발명은
- <49> (a) SEQ ID NO:4 및 5의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:4 및 5와 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 뉴클레오타이드 서열을 포함하고;
- <50> (b) 각각 SEQ ID NO:4 및 SEQ ID NO:5의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:6과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 뉴클레오타이드 서열을 가지고;
- <51> (c) SEQ ID NO:4 및 SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오타이드이거나;
- <52> (d) 각각 SEQ ID NO:2 및 7의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2 및 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 뿐만 아니라 SEQ ID NO:4 및 5의 폴리뉴클레오타이드인 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- <53> 또한, 본 발명은,
- <54> (a) SEQ ID NO:2 또는 7의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2 및 7의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고;
- <55> (b) 각각 SEQ ID NO:2 또는 7의 전장에 걸쳐서 SEQ ID NO:2 또는 7의 아미노산 서열과 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 80% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상의 동일

성, 가장 바람직하게는 97% 내지 99% 이상의 동일성이 있는 아미노산 서열을 가지고;

- <56> (c) SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:7의 아미노산을 포함하고;
- <57> (d) SEQ ID NO:7의 폴리펩티드 뿐만 아니라 SEQ ID NO:4 및 5에 함유된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드인 폴리펩티드를 제공한다.
- <58> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 사람 결장암의 세포내의 mRNA로부터 유도된 cDNA 라이브러리로부터 표준 클로닝 및 스크리닝 기술을 사용하여 취득될 수 있다(참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y. (1989)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 지놈 DNA 라이브러리와 같은 천연 공급원으로부터 취득될 수 있거나 널리 공지되고 상업적으로 입수가능한 기술을 사용하여 합성될 수 있다.
- <59> 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 폴리펩티드의 재조합적 생성을 위해 사용되는 경우, 폴리뉴클레오티드는 단독으로 성숙한 폴리펩티드를 위한 코딩 서열; 또는 리딩 프레임 내에 성숙한 폴리펩티드를 위한 서열과 함께 기타 코딩 서열, 예를들어 선도 또는 분비 서열을 엔코딩하는 서열, 프레(pre), 또는 프로(pro) 또는 프레프로- 단백질 서열, 또는 기타 융합 단백질 펩티드 부분을 포함할 수 있다. 예컨대, 융합된 폴리펩티드의 정제를 용이하게 해주는 마커 서열이 엔코딩될 수 있다. 본 발명의 이러한 일면의 특정한 바람직한 구체예에서, 마커 서열은 pQE 벡터(Qiagen, Inc)내에 제공되고 문헌[Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821-824]에 기술된 핵사-히스티딘 펩티드이거나, HA 태그이다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 전사되어 번역되지 않는 서열과 같은 비코딩 5' 및 3' 서열인, 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그널, 리보솜 결합 부위 및 mRNA를 안정화시키는 서열을 함유할 수 있다.
- <60> 본 발명의 추가 구체예는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 포함하고, 수 개, 예컨대, 5개 내지 10개, 1개 내지 5개, 1개 내지 3개, 1개 내지 2개 또는 1개의 아미노산 잔기가 임의의 조합으로 치환, 결실 또는 첨가된, 폴리펩티드 변이체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- <61> SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:6에 함유되어 있는 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 충분히 동일한 폴리뉴클레오티드를 cDNA 및 지놈 DNA를 위한 하이브리드화 프로브로서 또는 핵산 증폭(PCR) 반응을 위한 프라이머로서 사용하여, 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 지놈 클론 및 전장 cDNA를 단리시키고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:6과 높은 서열 유사성을 가진 다른 유전자(사람 공급원으로부터의 파라로그(paralog) 및 사람 이외의 종으로부터의 오르토로그 및 파라로그를 엔코딩하는 유전자를 포함함)의 지놈 클론 및 cDNA를 단리시킬 수 있다. 전형적으로 이들 뉴클레오티드 서열은 지시물의 뉴클레오티드와 70%, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95% 동일하다. 프로브 또는 프라이머는 일반적으로 15개 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 30개 이상의 뉴클레오티드를 포함하며 50개 이상의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 특히 바람직한 프로브는 30 내지 50개의 뉴클레오티드를 가질 것이다. 특히 바람직한 프라이머는 20 내지 25개의 뉴클레오티드를 가질 것이다. 특히, 동종 기원의 동물로부터의 서열로부터 유래된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 사람 유전자에 대한 교차반응성 면역반응을 획득하기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다.
- <62> 사람 이외의 종으로부터의 동족체를 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 엄격한 하이브리드화 조건하에서 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 단편을 가진 표지된 프로브를 사용하여 적절한 라이브러리를 스크리닝하는 단계; 및 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 지놈 클론 및 전장 cDNA를 단리시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 취득될 수 있다. 이러한 하이브리드화 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 바람직한 엄격한 하이브리드화 조건은 50% 포름아미드, 5xSSC(150mM NaCl, 15mM 트리소듐 시트레이트), 50 mM 소듐 포스페이트(pH7.6), 5x덴하르트 용액, 10% 텍스트란 설페이트 및 20 µg/ml 변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액중에 42°C에서 밤새 인큐베이션시킨 다음 약 65°C에서 0.1x SSC중에 필터를 세척하는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명은 엄격한 하이브리드화 조건하에서 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 단편을 가진 표지된 프로브를 사용하여 적절한 라이브러리를 스크리닝함으로써 취득될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- <63> 많은 경우에 있어서, 당업자는 단리된 cDNA 서열이, 폴리펩티드를 코딩하는 영역이 cDNA의 5' 말단에서 짧다는 점에서, 불완전하다는 것을 인식할 것이다.
- <64> 전장 cDNA를 취득하거나, 짧은 cDNA를 신장시키는 다수의 방법이 당업자에게 잘 알려져있고 이용할 수 있으며, 예컨대 cDNA 말단의 빠른 증폭(RACE)(참조: Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1988)의 방법에 기초한

몇가지 방법들이 있다. 마라톤 테크놀로지(MarathonTM technology)(Clontech Laboratories Inc.)에 의해 예증된 이 기술의 최근의 변형법은 더 긴 cDNA를 위한 검색을 현저하게 단순화시켰다. 마라톤 테크놀로지에서는, cDNA는 선택된 조직으로부터 추출된 mRNA로부터 제조되며 '어댑터' 서열이 각 말단에 라이게이션된다. 그런 다음, 유전자 특이적이고 어댑터 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 조합을 사용하여 cDNA의 '결손(missing)' 5' 말단을 증폭시키기 위해 핵산 증폭(PCR)을 수행한다. 그런 다음 PCR 반응을 '네스티드(nested)' 프라이머, 즉, 증폭된 생성물내에서 어닐링하도록 디자인된 프라이머(전형적으로 어댑터 서열내의 추가적인 3'를 어닐링시키는 어댑터 특이적인 프라이머 및 공지된 유전자 서열내의 추가적인 5'를 어닐링시키는 유전자 특이적인 프라이머)를 사용하여 반복한다. 그런 다음, 상기 반응의 생성물은 DNA 서열분석에 의해 분석될 수 있고, 전장 cDNA는 기존의 cDNA에 상기 생성물을 직접 결합시켜 완전한 서열을 생성시키거나 5' 프라이머의 디자인을 위한 새로운 서열 정보를 사용하여 개별적 전장 PCR을 수행함으로써 구성된다.

<65> 본 발명의 재조합 폴리펩티드는 발현 시스템을 포함하는 유전공학처리된 숙주 세포로부터 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 추가의 일면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 시스템, 상기 발현 시스템으로 유전공학처리된 숙주 세포 및 재조합 기술에 의해 본 발명의 폴리펩티드를 생성시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 무세포 번역 시스템을 이용하여 본 발명의 DNA 작제물로부터 유래된 RNA를 사용하여 상기 단백질을 생성시킬 수 있다.

<66> 재조합 생성을 위해, 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 위한 발현 시스템 또는 이들의 일부를 혼입하도록 유전공학처리될 수 있다. 숙주 세포내로의 폴리뉴클레오타이드의 도입은 문헌[참조: Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]과 같은 많은 표준 실험실 매뉴얼에 기술된 방법에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 이러한 방법에는, 예컨대 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, DEAE-텍스트란 매개된 트랜스펙션, 트랜스펙션(transfection), 미세주입, 양이온 지질-매개된 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 형질도입, 스크레입 로딩(scrape loading), 탄도 도입 또는 감염이 포함된다.

<67> 바람직하게는, 본 발명의 단백질은 트랜스 형태의 티오레독신(TIT)과 함께 동시발현된다. 트랜스 형태 대 시스템 형태의 티오레독신의 동시발현이 프로테아제의 필요없이 티오레독신을 항원없이 유지시키는 데에 바람직하다. 티오레독신 동시발현은 본 발명의 단백질의 용해화를 쉽게 해준다. 또한 티오레독신 동시발현은 단백질 정제 수율, 정제된 단백질 용해도 및 특성에 현저한 영향을 미친다.

<68> 적합한 숙주의 대표적인 예에는 스트렙토코쿠스(*Streptococci*), 스태필로코쿠스(*Staphylococci*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 세포와 같은 세균 세포; 효모 세포 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 세포와 같은 진균 세포; 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포도테라(*Spodoptera*) Sf9 세포와 같은 곤충 세포; CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 및 보웬스(Bowes) 흑색종 세포와 같은 동물 세포; 및 식물 세포가 포함된다.

<69> 매우 다양한 발현 시스템, 예컨대, 염색체, 에피솜 및 바이러스-유도된 시스템, 예컨대, 세균 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포손, 효모 에피솜, 삽입 엘리먼트, 효모 염색체 엘리먼트, 바칼로바이러스, SV40과 같은 파포바 바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 파울 폭스 바이러스, 슈도라비에스 바이러스 및 레트로바이러스와 같은 바이러스로부터 유도된 벡터, 및 플라스미드, 및 코스미드 및 파아지미드와 같은 박테리오파지 유전학적 엘리먼트로부터 유도된 벡터와 같은 이들의 조합으로부터 유도된 벡터가 사용할 수 있다. 발현 시스템은 발현을 조절할 뿐만 아니라 일으키기도 하는 제어 영역을 함유할 수 있다. 일반적으로, 숙주내에서 폴리뉴클레오타이드를 유지시키거나 증식시키거나 발현시켜 폴리펩티드를 생성시킬 수 있는 임의의 시스템 또는 벡터가 사용될 수 있다. 적절한 뉴클레오타이드 서열은, 예컨대 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (supra)]에 설명된 기술과 같은 임의의 다양한 널리 공지되고 보편적인 기술에 의해 발현 시스템내로 삽입될 수 있다. 적절한 분비 시그널은 요망되는 폴리펩티드내로 혼입되어, 번역된 단백질을 소포체의 루멘, 원형질막 주위공간 또는 세포외 환경으로 분비시킬 수 있다. 이러한 시그널은 폴리펩티드에 대해 내인성일 수 있거나 이들은 이종 시그널일 수 있다.

<70> 또한, 발현 시스템은 바이러스 또는 세균과 같은 살아있는 재조합 미생물일 수 있다. 관심있는 유전자는 살아있는 재조합 바이러스 또는 세균의 지놈내로 삽입될 수 있다. 이러한 생벡터를 사용하는 접종 및 생체내 감염은 항원을 생체내 발현시키고 면역 반응을 유도시킬 것이다.

<71> 따라서, 몇몇 구체예에 있어서, 본 발명의 면역원성 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 다수의 공지된 바이러스 기제 시스템 중 어느 하나를 사용하여 적합한 포유동물 숙주세포내로 도입되어 발현된다. 한 가지

예시적 구체예에 있어서, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리하고 효율적인 플랫폼(platform)을 제공해준다. 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 선택된 뉴클레오티드 서열은 벡터내로 삽입되고 당 분야에 공지된 기술을 사용하여 레트로바이러스 입자내에 패키징될 수 있다. 그 후, 재조합 바이러스는 단리되어 피검자에게 전달될 수 있다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템이 공지되었다 (예컨대, U.S. Pat. No. 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A.D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109).

<72> 또한, 다수의 예시적 아데노바이러스 기재 시스템이 공지되었다. 숙주 지놈내로 통합되는 레트로바이러스와는 달리, 아데노바이러스는 염색체외적으로 잔존함으로써 삽입 돌연변이유발과 관련된 위험을 최소화시킨다 (Haj-Ahmad and Graham (1986) J. Virol. 57:267-274; Bett et al. (1993) J. Virol. 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) Human Gene Therapy 5:717-729; Seth et al. (1994) J. Virol. 68:933-940; Barr et al. (1994) Gene Therapy 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629; and Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4:461-476).

<73> 다양한 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터 시스템이 또한 폴리뉴클레오티드 전달을 위해 개발되어 왔다. AAV 벡터는 당 분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 용이하게 작제될 수 있다 (참조: U.S. Pat Nos. 5,173,414 and 5,139,941; International Publication Nos. WO 92/01070 and WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169; and Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875).

<74> 유전자 전달에 의해 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자를 전달하기 위해 유용한 추가의 바이러스 벡터로는 백시니아 바이러스 및 조류 폭스바이러스와 같은 폭스 바이러스 패밀리로부터 유래된 벡터가 있다. 예로서, 신규한 분자를 발현시키는 백시니아 바이러스 재조합체는 다음과 같이 작제될 수 있다. 백시니아 프로모터 및 플랭킹 백시니아 DNA 서열, 예컨대 티미딘 키나제(TK)를 엔코딩하는 서열에 인접하게 되도록 먼저 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA가 적합한 벡터내로 삽입된다. 그 후, 이 벡터는 백시니아로 동시에 감염된 세포를 트랜스펙션시키기 위해 사용된다. 상동 재조합은 백시니아 프로모터와 관심의 폴리펩티드를 엔코딩하는 유전자를 바이러스 지놈내로 삽입시켜주는 작용을 한다. 생성된 T.K.usp.(-) 재조합체는 5-브로모데옥시우리딘의 존재하에서 세포를 배양하고 이에 내성인 바이러스 플라스미드를 골라냄으로써 선택될 수 있다.

<75> 백시니아 기재 감염/트랜스펙션 시스템은 생물체의 숙주 세포내에서 본원에 기술된 1종 이상의 폴리펩티드의 유도성, 일시적 발현 또는 동시발현을 제공하기 위해 편리하게 사용될 수 있다. 이러한 특정 시스템에 있어서, 세포는 박테리오파지 T7 RNA 중합효소를 엔코딩하는 백시니아 바이러스 재조합체로 먼저 시험관내 감염된다. 이러한 중합효소는 이것이 T7 프로모터를 함유하는 주형을 전사시킬 뿐이라는 점에서 정교한 특이성을 나타낸다. 감염 후, 세포는 T7 프로모터에 의해 유도되는 관심의 폴리뉴클레오티드(들)로 트랜스펙션된다. 백시니아 바이러스 재조합체로부터의 세포질에서 발현되는 중합효소는 트랜스펙션된 DNA를 RNA로 전사시키며, 이후 숙주 번역 기작에 의해 폴리펩티드로 번역된다. 상기 방법은 대량의 RNA의 고수준의 잠재성의 세포질 생성 및 이의 번역 생성물을 제공한다 (참조: Elroy-Stein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126).

<76> 대안적으로, 아비폭스바이러스(avipoxvirus), 예컨대 파울폭스 및 카나리폭스 바이러스를 사용하여 관심의 코딩 서열을 전달할 수도 있다. 포유동물 병원체로부터의 면역원을 발현시키는 재조합 아비폭스 바이러스는 조류 이외의 종에게 투여되는 경우 방어 면역을 부여해주는 것으로 알려져있다. 아비폭스 벡터를 사용하는 것은 사람 및 그 밖의 포유동물종의 경우 특히 바람직한데, 이는 아비폭스속의 일원들이 민감한 조류종에서만 풍부하게 복제될 수 있으므로 포유동물 세포에서는 감염성이 아니기 때문이다. 재조합 아비폭스바이러스를 생성시키는 방법은 당 분야에 공지되어 있으며 백시니아 바이러스의 생성과 관련하여 상기 기술된 유전자 재조합을 사용한다 (참조: WO 91/12882; WO 89/03429; 및 WO 92/03545).

<77> 미국 특허 제 5,843,723호; 제 6,015,686호; 제 6,008,035호 및 제 6,015,694호에 기술된 벡터와 같은 다수의 알파바이러스 벡터 중 어느 하나를 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드 조성물을 전달할 수도 있다. 베네주엘라 에퀀 엔세팔라티스 (Venezuelan Equine Encephalitis; VEE)를 기재로 한 특정 벡터가 또한 사용될 수 있으며, 이들의 예시적 예들은 미국 특허 제 5,505,947호 및 제 5,643,576호에서 찾아볼 수 있다.

- <78> 더욱이, 문헌[Micheal et al. J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869] 및 문헌[Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103]에 기술된 아테노바이러스 키메라 백터와 같은 분자 컨주게이트 백터가 본 발명하에서 유전자 전달을 위해 또한 사용될 수 있다.
- <79> 상기 및 그 밖의 공지된 바이러스 기재 전달 시스템에 대한 추가의 예시적 정보를 하기 문헌들에서 찾아볼 수 있다 [참조: Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:317-321, 1989; Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103, 1989; Flexner et al., *Vaccine* 8:17-21, 1990; U.S. Patent Nos. 4,603,112, 4,769,330, and 5,017,487; WO 89/01973; U.S. Patent No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434, 1991; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11498-11502, 1993; Guzman et al., *Circulation* 88:2838-2848, 1993; and Guzman et al., *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993].
- <80> 상기 기술된 재조합 생미생물은 유독하거나, 생백신을 수득하기 위해 다양한 방법으로 약독될 수 있다. 이러한 생백신은 또한 본 발명의 일부를 구성한다.
- <81> 특정한 구체예에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 표적 세포의 지놈내로 삽입될 수 있다. 이러한 삽입은 상동 재조합을 통해 특정 위치 및 배향에서 이루어질 수 있거나 (유전자 교환) 이는 무작위의 비특이적 위치에서 삽입될 수 있다 (유전자 보강). 또 다른 구체예에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 DNA의 별개의 에피솜 세그먼트로서 세포에서 안정하게 유지될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드 세그먼트 또는 "에피솜"은 숙주 세포주기와 독립적 이거나 이와 일치하는 방식으로 유지 및 복제를 가능케하기에 충분한 서열을 엔코딩한다. 발현 작제물이 세포에 전달되고 세포에서 뉴클레오티드가 존재하는 방식은 사용되는 발현 작제물의 타입에 의존적이다.
- <82> 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 문헌[Ulmer et al. *Science* 259:1745-1749, 1993]에 기재되고 문헌[Cohen et al. *Science* 259:1691-1692, 1993]에 제검토된 바와 같이 "네이키드(naked)" DNA로서 투여/전달된다. 네이키드 DNA의 흡수는 세포내로 효율적으로 전달되는 생분해성 비드에 DNA를 코팅시킴으로써 증가될 수 있다.
- <83> 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 조성물은 입자 밤바드먼트(bombardment) 방법을 통해 전달될 수 있으며, 이들 방법 중 다수의 방법이 공지되었다. 한 가지 예시적 예에 있어서, 가스 유도된 입자 가속은 파우더젝트 파마슈티컬스 (Powderject Pharmaceuticals) PLC (Oxford, UK) 및 파우더젝트 백신즈 인크. (Powderject Vaccines Inc.) (Madison, WI)의 제품과 같은 장치로 수행될 수 있으며, 이들 중 몇몇 예는 미국 특허 제 5,846,796호; 제 6,010,478호; 제 5,865,796호; 제 5,584,807호; 및 유럽 특허 제 0500 799호에 기재되어 있다. 이러한 방법은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 입자와 같은 미세 입자의 건조 분말 포물레이션을 핸드 헬드(hand held) 장치에 의해 생성된 헬륨 가스 제트내에서 고속으로 가속시켜 입자를 관심 표적 조직내로 추진시켜주는 니들 비함유 전달 방법을 제공해준다.
- <84> 한 가지 관련된 구체예에 있어서, 본 발명의 조성물의 가스 유도된 니들 비함유 주입에 유용할 수 있는 그 밖의 장치 및 방법으로는 바이오젝트, 인크. (Bioject, Inc.) (Portland, OR)에 의해 제공되는 제품과 방법이 있으며, 이들의 몇몇 예는 미국 특허 제 4,790,824호; 제 5,064,413호; 제 5,312,335호; 제 5,383,851호; 제 5,399,163호; 제 5,520,639호 및 제 5,993,412호에 기재되어 있다.
- <85> 본 발명의 폴리펩티드는 암모늄 셀레이트 또는 에탄올 침전법, 산 추출법, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 수산화인회석 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 널리 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수되어 정제될 수 있다. 가장 바람직하게는, 이온 금속 친화도 크로마토그래피(IMAC)가 정제를 위해 사용된다. 폴리펩티드가 세포내 합성, 단리 및/또는 정제 동안 변성되는 경우 활성 형태로 재생시키기 위해 단백질을 리폴딩(refolding)시키기 위한 널리 공지된 기술을 사용할 수 있다.
- <86> 본 발명의 중요한 또 다른 일면은 암, 특히 결장직장암 및 자가면역 질환 및 관련 질환의 면역예방 또는 치료를 위해 항체 및/또는 T 세포 면역 반응을 생성시키기에 적합한 본 발명의 단편 또는 전체 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 포유동물을 접종시키는 것을 포함하여 포유동물에게서 면역학적 반응을 유도시키거나, 강화시키거나 조절하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 일면은 생체내에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하고 폴리펩티드를 코딩하는 백터 또는 세포를 통해 본 발명의 폴리펩티드를 전달하여 면역학적 반응을 유도시킴으로써 질병으로부터 포유동물을 예방 또는 치료하기 위한 면역 반응을 생성시키는 것을 포함하여 포유동

물에게서 면역학적 반응을 유도시키거나, 강화시키거나 조절하는 방법에 관한 것이다.

<87> 본 발명의 또 다른 일면은 면역학적/백신 포물레이션(조성물) 및 의학에서의 이들의 용도에 관한 것이다. 이러한 조성물은, 포유동물 숙주내로 도입되는 경우, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 상기 포유동물내에서의 면역학적 반응을 유도하거나, 강화시키거나 조절하며, 상기 조성물은 앞서 규정된 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 면역학적 단편을 포함한다. 더욱 상세하게는, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 안전하고 유효한 양의 CASB7439 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 단편을 포함하며, 상기 CASB7439 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:14를 포함하는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에 있어서, 면역원성 조성물은 안전하고 유효한 양의 CASB7439 엔코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편을 포함하며, 상기 CASB7439 엔코딩 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:15를 포함하는 군으로부터 선택된다.

<88> 본 발명의 백신 포물레이션은 적합한, 즉 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 폴리펩티드가 위에서 파괴될 수 있기 때문에, 비경구적으로(예컨대, 피하, 근내, 정맥내 또는 피내 주입) 투여되는 것이 바람직하다. 비경구적 투여에 적합한 포물레이션에는 산화방지제, 완충제, 제균제 및 포물레이션을 수용자의 혈액과 등장이 되도록 해주는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주입 용액; 및 현탁제 또는 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁물이 포함된다. 포물레이션은 단위-용량 또는 다회-용량 컨테이너, 예컨대 밀봉 앰플 및 바이알내에 제공될 수 있고, 사용하기 직전에 멸균 액체 담체의 첨가만을 필요로 하는 동결-건조된 상태로 저장될 수 있다.

<89> 본 발명의 추가의 일면은 포유동물의 면역계로부터의 세포를 사용하여 본 발명의 단편 또는 전체 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분자에 대한 면역 반응을 시험관내에서 유도시키고, 질환의 치료를 위해 포유동물의 이 활성화된 면역 세포를 재주입시키는 것에 관한 것이다. 면역계로부터의 세포의 활성화는 다양한 면역조절 분자의 존재 또는 부재하에서 본 발명의 전체 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분자와의 시험관내 인큐베이션에 의해 수행된다. 본 발명의 추가의 일면은 본 발명의 부분 또는 전체의 폴리펩티드 또는 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 분자와 함께 시험관내 로딩시킴으로써 변형되고 면역학적 방법으로 생체내 투여되는 항원 제시 세포의 투여에 의한 포유동물의 면역화에 관한 것이다. 또한, 항원 제시 세포는, 상응하는 폴리펩티드를 발현시키는 것과 같이, 본 발명의 단편 또는 전체의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분자를 함유하는 벡터로 시험관내 트랜스펙션되고 면역학적 방법으로 생체내 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 CASB7439 폴리펩티드를 사용하여 시험관내 로딩시킴으로써 변형되거나 CASB7439 폴리펩티드를 발현시키도록 유전학적으로 시험관내 변형된 유효량의 항원 제시 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

<90> 또 다른 구체예에 따르면, 본원에 기술된 약제학적/면역원성 조성물은 본 발명의 면역원성 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 항체, T-세포 및/또는 항원 제시 세포 (APC) 조성물 이외에 1종 이상의 면역자극제를 포함한다. 따라서, 본원에는 CASB7439 폴리펩티드 또는 CASB7439 엔코딩 폴리뉴클레오티드를 적합한 애주번트/면역자극제, 희석제 또는 그 밖의 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합시키는 것을 포함하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법이 제공된다. 면역자극제는 본질적으로 외인성 항원에 대한 면역 반응 (항체 및/또는 세포 매개성)을 향상시키거나 증강시키는 임의의 물질을 의미한다. 면역자극제의 하나의 바람직한 유형은 애주번트를 포함한다. 다수의 애주번트는 알루미늄 히드록시드 또는 미네랄 오일과 같은 항원이 빠르게 이화되는 것을 보호하도록 디자인된 물질, 및 지질 A, 보르타델라 퍼투스시스(*Bordetella pertussis*) 또는 미코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래된 단백질과 같은 면역 반응의 자극제를 함유한다. 특정 애주번트는 예컨대 프로인트 불완전 애주번트 및 완전 애주번트 (Difco Laboratories, Detroit, MI); 머크 애주번트 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA);알루미늄 히드록시드 겔 (알룸) 또는 알루미늄 포스페이트와 같은 알루미늄염; 칼슘염, 철염 또는 아연염; 아실화된 티로신의 불용성 현탁액; 아실화된 당(sugar); 양이온적 또는 음이온적으로 유도체화된 다당류; 폴리포스파젠; 생분해성 미소구체; 모노포스포릴 지질 A 및 퀴ل(quil) A로 시판된다. GM-CSF, 인터루킨-2, -7, -12와 같은 사이토카인 및 그 밖의 유사 성장 인자가 또한 애주번트로서 사용될 수 있다.

<91> 본 발명의 특정 구체예에 있어서, 애주번트 조성물은 Th1 타입이 우세한 면역 반응을 유도시키는 조성물인 것이 바람직하다. 높은 레벨의 Th1-타입 사이토카인 (예컨대, IFN- γ , TNF α , IL-2 및 IL-12)은 투여된 항원에 대한 세포 매개성 면역 반응의 유도를 유리하게 해주는 경향이 있다. 대조적으로, 높은 레벨의 Th2-타입 사이토카인

(예컨대, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10)은 체액성 면역 반응의 유도를 유리하게 해주는 경향이 있다. 본원에 제공된 백신의 적용 후, 환자는 Th-1 및 Th-2 타입 반응을 유도시키는 면역 반응을 지속시킬 것이다. 반응이 주로 Th1-타입인 한 가지 바람직한 구체예에 있어서, Th1-타입 사이토카인의 레벨은 Th2-타입 사이토카인의 레벨보다 높은 정도로 증가할 것이다. 이들 사이토카인의 레벨은 표준 검정을 사용하여 용이하게 평가될 수 있다. 사이토카인의 패밀리의 개관에 대해서는, 문헌[Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989]를 참조하라.

<92> Th1-타입 우세 반응을 유도시키기 위한 몇몇 바람직한 애주번트로는, 예컨대 모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 3-de-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 알루미늄염의 조합물이 있다. MPL®애주번트는 코릭사 코포레이션(Corixa Corporation) (Seattle, WA; 미국 특허 제 4,436,727호; 제 4,877,611호; 제 4,866,034호 및 제 4,912,094호 참조)으로부터 입수할 수 있다. CpG 함유 올리고뉴클레오타이드(여기서, CpG 디뉴클레오타이드는 메틸화되지 않음)는 또한 Th1 우세 반응을 유도시킨다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 널리 공지되어 있고, 예컨대 WO 96/02555호, WO 99/33488호 및 미국 특허 제 6,008,200호 및 제 5,856,462호에 기재되어 있다. 면역자극성 DNA 서열은, 예컨대 문헌[Sato et al. *Science* 273:352, 1996]에 또한 기재되어 있다. 또 다른 바람직한 애주번트는 Quil A와 같은 사포닌 또는 QS21 및 QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)를 포함하는 이의 유도체; 에스신(Escin); 디지토닌(Digitonin); 또는 짐소필라(*Gypsophila*) 또는 케노포듐 퀴노아(*Chenopodium quinoa*) 사포닌을 포함한다. 그 밖의 바람직한 포물레이션은 본 발명의 애주번트 조합물, 예컨대 QS21, QS7, Quil A, β-에스신, 또는 디지토닌을 포함하는 군 중의 둘 이상의 조합물 중에 1종 이상의 사포닌을 포함한다.

<93> 대안적으로, 사포닌 포물레이션은 키토산 또는 그 밖의 다가양이온성 중합체로 구성된 백신 비히클, 폴리락티드 및 폴리락티드-코-글리콜리드 입자, 폴리-N-아세틸 글루코사민 기재 중합체 매트릭스, 다당류 또는 화학적으로 개질된 다당류로 구성된 입자, 리포솜 및 지질 기재 입자, 글리세롤 모노에스테르로 구성된 입자 등과 조합될 수 있다. 사포닌은 리포솜 또는 ISCOM과 같은 입상 구조물을 형성하도록 콜레스테롤의 존재하에서 또한 포물레이팅될 수 있다. 또한, 사포닌은 비입상 용액 또는 현탁액 중에서 또는 포시라멜라(paucilamellar) 리포솜 또는 ISCOM과 같은 입상 구조물 중에서 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 에스테르와 함께 포물레이팅될 수 있다. 사포닌은 점도를 증가시키기 위해 카르보폴(Carbopol[®])과 같은 부형제와 함께 포물레이팅되거나 락토오스와 같은 분말 부형제와 함께 건조 분말 형태로 포물레이팅될 수 있다.

<94> 한 가지 바람직한 구체예에 있어서, 애주번트 시스템은 모노포스포릴 지질 A와 사포닌 유도체의 조합물, 예컨대 WO 94/00153호에 기재된 QS21과 3D-MPL® 애주번트의 조합물, 또는 WO 96/33739호에 기재된 QS21이 콜레스테롤로 켄칭(quenching)된 델 리액토제닉(reactogenic)인 조성물을 포함한다. 그 밖의 바람직한 포물레이션은 수중유 에멀션 및 토코페롤을 포함한다. 수중유 에멀션 형태의 QS21, 3D-MPL®애주번트 및 토코페롤을 사용하는 또 다른 특히 바람직한 애주번트 포물레이션이 WO 95/17210호에 기재되어 있다.

<95> 또 다른 향상된 애주번트 시스템은 CpG 함유 올리고뉴클레오타이드와 사포닌 유도체의 조합물, 특히 WO 00/09159호에 기재된 CpG와 QS21의 조합물을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 포물레이션은 수중유 에멀션 및 토코페롤을 추가로 포함한다.

<96> 본 발명의 약제학적 조성물에 사용되는 추가의 예시적 애주번트로는 몬타니드(Montanide) ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), SBAS 애주번트 시리즈(예컨대, 스미스클라인 비침 (Rixensart, Belgium)의 SBAS-2 또는 SBAS-4), **Detox (Enhanzyn®)** (Corixa, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) 및 그 밖의 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트 (AGP), 예컨대 본원에 참조로 그 전체 내용이 포함되는 미국 특허 출원 제 08/853,826호 및 제 09/074,720호에 기재된 애주번트, 및 WO 99/52549A1호에 기재된 것과 같은 폴리옥시에틸렌 에테르 애주번트가 있다.

<97> 그 밖의 바람직한 애주번트는 하기 일반식(I)의 애주번트 분자를 포함한다:

<98> $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$

<99> 상기 식에서, n은 1 내지 50 이고, A는 단일 결합 또는 -C(O)- 이고, R은 C₁₋₅₀ 알킬 또는 페닐 C₁₋₅₀ 알킬이다.

<100> 본 발명의 한 가지 구체예는 일반식(I)의 폴리옥시에틸렌 에테르(여기서, n은 1 내지 50, 바람직하게는 4 내지 24, 가장 바람직하게는 9 이고; R 성분은 C₁₋₅₀, 바람직하게는 C₄-C₂₀ 알킬, 가장 바람직하게는 C₁₂ 알킬이고, A는 단일 결합임)를 포함하는 백신 포물레이션으로 이루어진다. 폴리옥시에틸렌 에테르의 농도는 0.1 내지 20%, 바

람직하게는 0.1 내지 10%, 가장 바람직하게는 0.1 내지 1% 이어야 한다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 에테르는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-9-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-8-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-35-라우릴 에테르 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르의 군으로부터 선택된다. 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르와 같은 폴리옥시에틸렌 에테르는 머크 인덱스 (12th edition: entry 7717)에 기재되어 있다. 이들 애주번트 분자는 WO 99/52549호에 기재되어 있다.

- <101> 상기 일반식(I)에 따른 폴리옥시에틸렌 에테르는 요망되는 경우 또 다른 애주번트와 조합될 수 있다. 예컨대, 한 가지 바람직한 애주번트 조합물은 바람직하게는 UK 특허 출원 GB 9820956.2호에 기재된 CpG와 조합된 형태이다.
- <102> 바람직하게는, 담체가 본 발명에 따른 백신 조성물에 또한 존재한다. 담체는 수중유 에멀션, 또는 알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 히드록시드와 같은 알루미늄염일 수 있다.
- <103> 한 가지 바람직한 수중유 에멀션은 스쿠알렌, 알과 토크페롤 및 Tween 80과 같은 대사성 오일을 포함한다. 한 가지 특히 바람직한 일면에 있어서, 본 발명에 따른 백신 조성물 중의 항원은 이러한 에멀션 중에서 QS21 및 3D-MPL와 조합된다. 또한, 수중유 에멀션은 스펜(span) 85 및/또는 레시틴 및/또는 트리카프릴린을 함유할 수 있다.
- <104> 전형적으로, 사람 투여의 경우, QS21 및 3D-MPL이 백신 중에 용량 당 1 μ g 내지 200 μ g, 예컨대 10 내지 100 μ g, 바람직하게는 10 μ g 내지 50 μ g으로 존재할 것이다. 전형적으로, 수중유는 2 내지 10%의 스쿠알렌, 2 내지 10%의 알과 토크페롤 및 0.3 내지 3%의 트윈 80을 포함할 것이다. 바람직하게는, 스쿠알렌:알과 토크페롤의 비는 1 이하인데, 이는 이것이 더욱 안정적인 에멀전을 제공하기 때문이다. 또한, 스펜 85는 1%의 레벨로 존재할 수 있다. 일부 경우에서 본 발명의 백신이 안정화제를 추가로 포함하는 것이 유리할 수 있다.
- <105> 비독성 수중유 에멀전은 바람직하게는 수성의 담체중에 비독성 오일, 예컨대 스쿠알렌 또는 스쿠알렌, 에멀전화제, 예컨대 트윈 80을 함유한다. 수성 담체는 예컨대, 포스페이트 완충 식염수일 수 있다.
- <106> 수중유 에멀션 중의 QS21, 3D-MPL 및 토크페롤을 포함하는 특히 강력한 애주번트 포몰레이션이 WO 95/17210호에 기술되어 있다.
- <107> 또한, 본 발명은 다른 항원들, 특히 암, 보다 구체적으로 결장직장암, 자가면역 질환 및 관련 질환들을 치료하기에 유용한 항원들과 함께 본 발명의 백신 포몰레이션을 포함하는 다가 백신 조성물을 제공한다. 이러한 다가 백신 조성물은 상기 기술한 바와 같이 TH-1 유도성 애주번트를 포함할 수 있다.
- <108> 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 본원에 기술된 면역원성 조성물은 수상 세포, 마크로파지, B 세포, 단핵구 및 효과적인 APC가 되도록 공학처리될 수 있는 그 밖의 세포와 같은 항원 제시 세포(APC)를 통해 숙주에 전달된다. 이러한 세포는 항원을 제시할 수 있는 용적을 증가시키고, T 세포 반응의 활성화 및/또는 유지를 개선시키고, 그 자체로 항종양 효과를 나타내고/거나 수용체와 면역학적으로 적합해지도록 (즉, 매칭(matching)된 HLA 반수체형) 유전학적으로 변형될 수 있지만 반드시 변형되는 것은 아니다. APC는 일반적으로 종양 및 종양주변 조직을 포함하는 다수의 생물학적 유체 및 기관 중의 어느 하나로부터 단리될 수 있으며, 자가유래, 동종이계, 유전적동계 또는 이종 세포일 수 있다.
- <109> 본 발명의 몇몇 바람직한 구체예는 항원 제시 세포로서 수상 세포 또는 이의 프로제니터(progenitor)를 사용한다. 수상 세포는 매우 강력한 APC 이고 (Banchereau and Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998), 예방 또는 치료적 항종양 면역을 유도시키기 위한 생리적 애주번트로서 효과적인 것으로 밝혀졌다 (참조: Timmerman and Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). 일반적으로, 수상 세포는 전형적인 형태 (동일계에서 성상(stellate)이고, 시험관내에서 가시적인 현저한 세포질 작용 (수상돌기)을 지님), 항원을 고효율로 흡수하고 프로세싱하고 제시할 수 있는 능력, 및 나이브(naive) T 세포 반응을 활성화할 수 있는 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다. 물론, 수상 세포는 생체내에서 또는 생체외에서 수상 세포에서 보통 발견되지 않는 특정한 세포-표면 수용체 또는 리간드를 발현시키도록 공학처리될 수 있으며, 이러한 변형된 수상 세포는 본 발명에 의해 고려된다. 수상 세포에 대한 대안으로서, 분비된 소포 항원 로딩된 수상 세포 (엑소솜(exosome)이라 일컬어짐)가 백신에 사용될 수 있다 (참조: Zitvogel et al., *Nature Med.* 4:594-600, 1998).
- <110> 수상 세포 및 프로제니터는 말초혈, 골수, 종양 침윤 세포, 종양주변 조직 침윤 세포, 림프절, 비장, 피부, 탯줄 혈액 또는 임의의 그 밖의 적합한 조직 또는 체액으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 수상 세포는 GM-CSF, IL-4, IL-13 및/또는 TNF α 와 같은 사이토카인의 조합물을 말초혈로부터 수집된 단핵구 배양물에 첨가함으

로써 생체외에서 분화될 수 있다. 대안적으로, 말초혈, 탯줄 혈액 또는 골수로부터 수집한 CD34 포지티브 세포는 배양 배지에 GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 리간드, LPS, flt3 리간드 및/또는 수상 세포의 분화, 성숙 및 증식을 유도시키는 그 밖의 성분(들)의 조합물을 첨가함으로써 수상 세포로 분화될 수 있다.

<111> 수상 세포는 편리하게는 "비성숙" 세포와 "성숙" 세포로 분류되며, 이는 간단한 방법으로 두 가지의 잘 특징화된 표현형을 구별할 수 있게 해준다. 그러나, 이러한 명명은 모든 가능한 중간 분화 단계를 배제시키는 것으로 여겨지지 않아야 한다. 비성숙 수상 세포는 항원 흡수 및 프로세싱을 위한 높은 용적을 지닌 APC로서 특징화되며, 이는 Fc γ 수용체 및 만노오스 수용체의 높은 발현과 상관있다. 성숙 표현형은 이들 마커의 낮은 발현에 의해 전형적으로 특징화되지만, 클래스 I 및 클래스 II MHC, 부착 분자 (예를 들어, CD54 및 CD11) 및 보조자극 분자 (예를 들어, CD40, CD80, CD86 및 4-1BB)와 같은 T 세포 활성화를 담당하는 세포 표면 분자의 높은 발현을 나타낸다.

<112> APC는 엔코딩된 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 부분이 세포 표면에서 발현되도록 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (또는 이의 부분 또는 다른 변이체)로 일반적으로 트랜스펙션될 수 있다. 이러한 트랜스펙션은 생체외에서 일어날 수 있으며, 그 후, 이러한 트랜스펙션된 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 본원에 기술된 바와 같이 치료 목적으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 수상 세포 또는 그 밖의 항원 제시 세포를 표적화하는 유전자 전달 비히클이 환자에게 투여되어, 생체내에서 트랜스펙션이 일어나게 할 수 있다. 예를 들어 수상 세포의 생체내 및 생체외 트랜스펙션은 WO 97/24447호에 기술된 방법과 같은 당 분야에 공지된 임의의 방법, 또는 문헌[Mahvi et al. *Immunology and cell Biology* 75:456-460,1997]에 기술된 유전자 건(gun) 방법을 사용하여 일반적으로 수행될 수 있다. 수상 세포의 항원 로딩은 수상 세포 또는 프로제니터 세포를, 종양 폴리펩티드, DNA (네이키드 형태 또는 플라스미드 벡터내에 함유된 형태) 또는 RNA; 또는 항원 표현성 재조합 세균 또는 바이러스 (예를 들어, 백시니아, 파울록스, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스 벡터)와 인큐베이션시킴으로써 달성될 수 있다. 로딩 전에, 폴리펩티드는 T 세포 헬프를 제공하는 면역학적 파트너 (예를 들어, 담체 분자)에 공유적으로 컨주게이션될 수 있다. 대안적으로, 수상 세포는 단독으로 또는 폴리펩티드의 존재하에서 컨주게이션되지 않은 면역학적 파트너를 사용하여 필싱될 수 있다.

<113> 당업자에게 알려진 임의의 적합한 담체가 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있지만, 담체의 타입은 전형적으로 투여 모드에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 조성물은 예를 들어 국소, 경구, 코, 점막, 정맥내, 두개내, 복강내, 피하 및 근내 투여를 포함하는 임의의 적합한 투여 방식을 위해 포물레이팅될 수 있다.

<114> 이러한 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 생체적합성이고, 또한 생분해성일 수 있다. 특정한 구체예에 있어서, 포물레이션은 상대적으로 일정한 활성 성분 방출 레벨을 제공하는 것이 바람직하다. 그러나, 다른 구체예에 있어서, 투여 즉시 보다 신속한 방출 속도가 요망될 수 있다. 이러한 조성물의 포물레이션은 공지된 기술을 사용하는 당업자의 수준에 충분히 속하는 것이다. 이와 관련하여 유용한 예시적 담체로는 폴리(락티드-코-글리콜리드), 폴리아크릴레이트, 라텍스, 전분, 셀룰로오스, 텍스트란 등의 미세입자가 있다. 그 밖의 예시적인 지연 방출 담체로는 초분자 바이오벡터가 있으며, 이는 비액체성 친수성 코어 (예를 들어, 가교된 다당류 또는 올리고당류) 및 임의로, 인지질과 같은 양쪽친화성 화합물을 포함하는 외부층을 포함한다 (참조: 미국 특허 제 5,151,254호 및 PCT 출원 WO 94/20078호, WO 94/23701호 및 WO 96/06638호). 지연 방출형 포물레이션에 함유된 활성 화합물의 양은 이식 부위, 방출 속도 및 예상 방출 기간 및 치료하거나 예방하려는 질환의 성질에 따라 달라진다.

<115> 또 다른 예시적 구체예에 있어서, 생분해성 미소구체 (예를 들어, 폴리락테이트 폴리글리콜레이트)가 본 발명의 조성물용의 담체로서 사용된다. 적합한 생분해성 미소구체는 예를 들어, 미국 특허 제 4,897,268호; 제 5,075,109호; 제 5,928,647호; 제 5,811,128호; 제 5,820,883호; 제 5,853,763호; 제 5,814,344호, 제 5,407,609호 및 제 5,942,252호에 기재되어 있다. WO 99/40934호 및 여기에 인용된 문헌에 기술된 담체와 같은 변형된 B형 간염 코어 단백질 담체 시스템이 다수의 응용에 또한 유용하다. 또 다른 예시적 담체/전달 시스템은 숙주에서 클래스 I 제한된 세포독성 T 림프구 반응을 유도시킬 수 있는, 미국 특허 제 5,928,647호에 기술된 것과 같은 입상 단백질 복합체를 포함하는 담체를 사용한다.

<116> 본 발명의 약제학적 조성물은 종종 1종 이상의 완충제 (예를 들어, 중성 완충 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수), 탄수화물 (예를 들어, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 글리신과 같은 아미노산, 산화방지제, 계면제, EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트화제, 애췌번트 (예를 들어, 알루미늄 히드록시드), 포물레이션이 수용자의 혈액과 등장, 저장 또는 약한 정도의 고장이 되도록 해주는 용질, 현탁제, 증점제 및/또는 방부제를 추가로 포함할 것이다. 대안적으로, 본 발명의 조성물은 동결건조물로

서 포물레이팅될 수 있다.

- <117> 본원에 기술된 약제학적 조성물은 단위 용량 또는 다회 용량 컨테이너, 예를 들어 밀봉 앰플 또는 바이알로 제공될 수 있다. 이러한 컨테이너는 전형적으로 사용시까지 포물레이션의 멸균성 및 안정성을 보존하도록 하는 방식으로 밀봉되어 있다. 일반적으로, 포물레이션은 유성 또는 수성 비히클 중에 현탁액, 용액 또는 에멀션으로서 저장될 수 있다. 대안적으로, 약제학적 조성물은 사용 직전의 멸균 액체 담체의 첨가만을 필요로 하는 동결 건조된 상태로 저장될 수 있다.
- <118> 예를 들어 경구, 비경구, 정맥내, 비내 및 근내 투여 및 포물레이션을 포함하는 다양한 치료 방법에 본원에 기술된 특정 조성물을 사용하기 위한 적합한 투여 및 치료 방법을 개발하는 것은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 이들 중 몇몇이 일반적인 예시 목적으로 하기 간단히 논의된다.
- <119> 몇몇 응용에 있어서, 본원에 기술된 약제학적 조성물은 경구 투여를 통해 동물에게 전달될 수 있다. 따라서, 이러한 조성물은 비활성 회석제 또는 흡수성의 식용 담체와 함께 포물레이팅되거나, 경질 껍질 또는 연질 껍질 젤라틴 캡슐에 넣어지거나, 정제로 타정되거나, 규정식의 음식과 직접 혼합될 수 있다.
- <120> 활성 화합물은 부형제와 함께 혼합되어, 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼(wafer) 등의 형태로 사용될 수 있다 (참조: Mathiowitz *et al.*, Nature 1997 Mar 27; 386(6623):410-4; Hwang *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1998:15(3):243-84; U.S. Patent 5,641,515; U.S. Patent 5,580,579 and U.S. Patent 5,792,451). 정제, 트로키, 환제, 캡슐 등은 임의의 다양한 추가 성분, 예를 들어 검 트라가칸트, 아카시아, 옥수수전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 인산 이칼슘과 같은 부형제; 옥수수전분, 감자 전분, 알긴산 등과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 및 수크로스, 락토스 또는 사카린과 같은 감미제 또는 페퍼민트, 노루발풀 오일 또는 체리향과 같은 착향제를 또한 함유할 수 있다. 단위 제형이 캡슐인 경우, 이는 상기 타입의 물질 이외에 액체 담체를 함유할 수 있다. 그 밖의 다양한 물질이 코팅으로서 존재하거나 단위 제형의 물리적 형태를 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 또는 캡슐은 셀락, 당 또는 둘 모두로 코팅될 수 있다. 물론, 임의의 단위 제형을 제조하는 데에 사용되는 임의의 물질은 약제학적으로 순수해야하고, 사용되는 양이 실질적으로 무독성이어야 한다. 또한, 활성 화합물은 지연 방출형 프리퍼레이션(preparation) 및 포물레이션내로 혼입될 수 있다.
- <121> 전형적으로, 이러한 포물레이션은 약 0.1% 이상의 활성 화합물을 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 퍼센트는 물론 변할 수 있으며 편리하게는 포물레이션 전체 중량 또는 부피의 약 1 또는 2% 내지 약 60% 또는 70% 이상일 수 있다. 물론, 각각의 치료적으로 유용한 조성물 중의 활성 화합물(들)의 양은 적합한 용량이 임의의 주어진 화합물의 단위 용량에서 수득되는 방식으로 제조될 수 있다. 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장 수명 뿐만 아니라 그 밖의 약리학적 고려사항과 같은 인자가 이러한 약제학적 포물레이션을 제조하는 분야의 당업자에 의해 고려되므로, 다양한 용량 및 치료 방법이 요망될 수 있다.
- <122> 경구 투여의 경우, 본 발명의 조성물은 대안적으로 구강세척제(mouthwash), 치약, 협측 정제, 경구 스프레이 또는 설하 경구투여형 포물레이션 형태로 1종 이상의 부형제와 혼합될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 분산나트륨, 글리세린 및 중탄산칼륨을 함유하는 용액과 같은 경구 용액내로 혼입되거나, 치약에 분산되거나, 치료적 유효량으로 물, 결합제, 마모제, 착향제, 발포제 및 습윤제를 포함할 수 있는 조성물에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 설하에 놓여지거나 입안에서 용해될 수 있는 정제 또는 용액 형태로 만들어질 수 있다.
- <123> 몇몇 경우, 본원에 기술된 약제학적 조성물을 비경구적, 정맥내, 근내 또는 복강내 전달하는 것이 바람직하다. 이러한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 이 중 몇몇은 예를 들어 미국 특허 제 5,543,158호; 미국 특허 제 5,641,515호 및 미국 특허 제 5,399,363호에 추가로 기술되어 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 자유 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 적합하게는 히드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 혼합된 형태로 수중에서 제조될 수 있다. 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물에서 및 오일에서 또한 제조될 수 있다. 보통의 저장 및 사용 조건하에서, 이러한 프리퍼레이션은 미생물의 성장을 방지하기 위해 방부제를 함유하는 것이 일반적이다.
- <124> 주사용으로 적합한 예시적 약제학적 형태로는 멸균 수용액 또는 분산액 및 주사용 멸균 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말 (예를 들어, 미국 특허 제 5,466,468호 참조)가 있다. 모든 경우, 상기 형태는 멸균 상태이어야 하고, 용이하게 주사할 수 있을 정도로 유동성이어야 한다. 이것은 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하고, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 활동에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 프로필렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및/또는

식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅을 사용하고, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지시키고/거나 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 활동의 방지는 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티머로살 등에 의해 촉진될 수 있다. 다수의 경우, 등장제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사성 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 일으킬 수 있다.

<125> 한 가지 구체예에 있어서, 수용액 형태의 비경구 투여의 경우, 용액은 필요한 경우 적합하게 완충되거나, 액체 희석제가 먼저 충분한 식염수 또는 글루코스로 등장이 되어야 한다. 이러한 특정한 수용액은 정맥내, 근내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 발명의 기재내용에 비추어 당업자가 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 하나의 용량은 1ml의 등장 NaCl 용액에 용해되어, 1000ml의 대량피하주사 유체에 첨가되거나 제안된 주입 부위에서 주사될 수 있다 (참조: "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). 용량의 약간의 변화는 치료하려는 피검자의 질환에 따라 필연적으로 이루어질 것이다. 더욱이, 사람 투여의 경우, 프리퍼레이션은 물론 FDA 오피스 오브 바이오로지컬스 스탠다즈 (FDA Office of Biologics standards)가 요구하는 멸균성, 발열성, 및 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족하는 것이 바람직하다.

<126> 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 본원에 기술된 조성물은 중성 또는 염 형태로 포물레이팅될 수 있다. 예시적인 약제학적으로 허용되는 염은 산부가염 (단백질의 유리 아미노기와 함께 형성됨)을 포함하며, 이들은 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산을 사용하여 형성된다. 유리 카르복실기를 사용하여 형성되는 염은 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화 제2철과 같은 무기 염기, 또는 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 또한 유래될 수 있다. 포물레이션시에, 용액은 용량 포물레이션과 적합한 방식으로 및 치료적으로 유효한 양으로 투여된다.

<127> 담체는 임의의 용매 및 모든 용매, 분산매, 비히클, 코팅, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁제, 콜로이드 등을 추가로 포함할 수 있다. 약제학적 활성 물질용의 이러한 매질 및 제제는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상의 매질 또는 제제가 활성 성분과 부적합한 것을 제외하고는, 치료 조성물에 이를 사용하는 것이 고려된다. 보충적 활성 성분이 조성물내로 또한 혼입될 수 있다. "약제학적으로 허용되는"이란 용어는 사람에게 투여되는 경우 알레르기 또는 유사한 부적당한 반응을 일으키지 않는 분자 물질 및 조성물을 의미한다.

<128> 몇몇 구체예에 있어서, 약제학적 조성물은 비내 스프레이, 흡입제, 및/또는 그 밖의 에어로졸 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 코 에어로졸 스프레이를 통해 유전자, 핵산, 및 펩티드 조성물을 폐에 직접 전달하는 방법은, 예를 들어 미국 특허 제 5,756,353호 및 미국 특허 제 5,804,212호에 기재되어 있다. 마찬가지로, 비내 미세입자 수지 (Takenaga *et al.*, J Controlled Release 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) 및 리소포스파티딜-글리세롤 화합물 (U.S. Patent 5,725,871)을 사용하는 약물의 전달은 또한 약제학 분야에서 널리 공지되어 있다. 마찬가지로, 폴리테트라플루오로에틸렌 지지 매트릭스 형태의 예시적 경점막 약물 전달은 미국 특허 제 5,780,045호에 기술되어 있다.

<129> 몇몇 구체예에 있어서, 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 지질 입자, 소포 등이 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포/생물체내로 도입시키는 데에 사용된다. 특히, 본 발명의 조성물은 지질 입자, 리포솜, 소포, 나노구체, 또는 나노입자 등 내에 캡슐화된 형태로 전달용으로 포물레이팅될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 조성물은 이러한 담체 비히클의 표면에 공유결합되거나 비공유결합될 수 있다.

<130> 잠재적인 약물 담체로서 리포솜 및 리포솜 유사 프리퍼레이션을 형성하고 사용하는 것은 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다 (참조: Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul;16(7):307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 Mar;56(3):691-5; Chandran *et al.*, Indian J Exp Biol. 1997 Aug;35(8):801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995;12(2-3):233-61; U.S. Patent 5,567,434; U.S. Patent 5,552,157; U.S. Patent 5,565,213; U.S. Patent 5,738,868 and U.S. Patent 5,795,587; 각각 전체 내용이 본원에 참조로 포함되어 있음).

<131> 리포솜은 T 세포 현탁액, 1차 간세포 배양물 및 PC 12 세포를 포함하는, 그 밖의 방법에 의해 트랜스펙션시키기가 일반적으로 어려운 다수의 세포 타입과 관련하여 성공적으로 사용되어 왔다 (Renneisen *et al.*, J Biol Chem. 1990 Sep 25;265(27):16337-42; Muller *et al.*, DNA Cell Biol. 1990 Apr;9(3):221-9). 또한, 리포솜은 바이러스 기재 전달 시스템에 전형적인 DNA 길이 제약물질이 없다. 리포솜은 유전자, 다양한 약물, 방사요

법용 제제, 효소, 바이러스, 전사 인자, 알로스테릭 이펙터 등을 다양한 배양된 세포주 및 동물에게 도입시키는 데에 효과적으로 이용되어 왔다. 또한, 리포솜을 사용하는 것은 전신적 전달 후 자가면역 반응 또는 허용되지 않는 독성과 관련이 없는 것으로 여겨진다.

- <132> 몇몇 구체예에 있어서, 리포솜은 수성 매질에 분산되는 인지질로부터 형성되고, 자발적으로 다중라멜라 동심원적 이중층 소포 (다중라멜라 소포 (MLV)로도 일컬어짐)를 형성한다.
- <133> 대안적으로, 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 본 발명의 조성물의 약제학적으로 허용되는 나노캡슐 포물레이션을 제공한다. 일반적으로 나노캡슐은 안정하고 재현가능한 방법으로 화합물을 포획할 수 있다 (참조: Quintanar-Guerrero *et al.*, Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec;24(12):1113-28). 세포내 중합체 오버로딩 (overloading)으로 인한 부작용을 방지하기 위해, 이러한 초미세 입자 (약 0.1 μ m의 크기)가 생체내에서 분해될 수 있는 중합체를 사용하여 디자인될 수 있다. 이러한 입자는 예를 들어 하기 문헌에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다 [Couvreux *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988;5(1):1-20; zur Muhlen *et al.*, Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar;45(2):149-55; Zambaux *et al.* J Controlled Release. 1998 Jan 2;50(1-3):31-40; and U.S. Patent 5,145,684].
- <134> 또한, 본 발명은 진단 시약으로서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드로부터 유도된 프라이머의 형태로 폴리뉴클레오티드를 사용하고, 본 발명의 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체 또는 시약의 형태로 폴리펩티드를 사용하는 것에 관한 것이다.
- <135> 암발생 경로에 따른 매우 초기의 변화의 검출을 가능케해주는 혈액 또는 조직내의 유전학적 또는 생화학적 마커의 확인은 환자에 대한 최상의 치료법을 결정하는데 도움을 줄것이다. 폴리뉴클레오티드 발현과 같은 종양 마커 대용물은 다양한 형태 및 상태의 암을 진단하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현 레벨의 확인은 암 질환의 단계결정(staging) 및 암 조직의 성질의 등급분류 둘 모두에 있어서 유용할 것이다. 단계결정 방법은 암의 진행을 모니터링하는 것이고 생체검사된 부위의 악성 조직의 존재 여부로 결정된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 암의 공격성, 예컨대 신체의 상이한 부위에서의 존재에 대한 마커를 확인함으로써 단계결정 방법이 완전해지도록 도울 수 있다. 암의 등급분류는 종양이 이의 동일한 타입의 정상 조직과 얼마나 유사한 지를 나타내는 것이고 이의 세포 형태학 및 그 밖의 분화 마커에 의해 평가된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이들이 종양을 지닌 세포의 분화 상태의 결정에 도움을 줄수 있는 것처럼 종양 등급을 결정하는데 유용할 수 있다.
- <136> 진단 검정은 환자로부터 유래된 샘플로부터 비정상적으로 감소되거나 증가된 레벨의 폴리펩티드 또는 mRNA를 결정하는 것을 포함하는 방법에 의한 진단을 통해 암, 자가면역 질병 및 관련 질환에 대한 감수성을 진단하거나 결정하기 위한 방법을 제공한다. 이러한 진단 방법은 차등 발현(differential expression)으로서 공지되어 있다. 특정 유전자의 발현을 질환 조직 및 정상 조직간에 비교하였다. 예컨대 분자량, 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열, 또는 상대적 풍부함면에서의 상기 두 조직에서 폴리뉴클레오티드-관련 유전자, mRNA 또는 단백질의 차이는 질환에 걸린 사람의 조직에서 상기 유전자 또는 이를 조절하는 유전자내에서의 변화를 나타낸다.
- <137> 감소되거나 증가된 발현은 RNA 레벨에서 측정될 수 있다. 폴리A RNA는 두 조직으로부터 최초로 단리되며 본 발명의 차등 발현된 폴리뉴클레오티드에 상응하는 유전자에 의해 엔코딩된 mRNA의 검출은 예컨대, 조직 절편에서의 동일계내 하이브리드화, 폴리A + mRNA를 포함하는 노던 블롯을 사용하는 역전사효소-PCR, 또는 임의의 다른 직접 또는 간접적인 RNA 검출 방법에 의해 검출될 수 있다. 정상 조직에 비해 질환에 걸린 조직에서의 소정의 RNA의 증가되거나 감소된 발현은 전사체 및/또는 발현된 단백질이 질병에서 어떠한 역할을 함을 시사한다. 따라서 정상 레벨과 관련하여 SEQ ID NO:1에 상응하는 mRNA의 높거나 낮은 레벨의 검출은 환자에 암이 존재함을 암시하는 것이다.
- <138> 샘플내의 mRNA 발현 레벨은 샘플로부터의 발현된 서열 태그(EST)의 라이브러리의 생성에 의해 결정될 수 있다. 라이브러리내의 EST의 상대적인 표시는 출발 샘플내의 유전자 전사체의 상대적인 표시를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 그런 다음 상기 시험의 EST 분석은 관심있는 폴리뉴클레오티드의 상대적인 발현 레벨을 결정하기 위해 참조 샘플의 EST 분석과 비교될 수 있다.
- <139> 그 밖의 mRNA 분석은 일련의 유전자 발현 분석(SAGE) 방법(참조: Velculescu *et al.* Science (1995) 270:484), 차등 디스플레이 방법(예컨대, 미국 특허 제 5,776,683호) 또는 뉴클레오티드 상호작용의 특이성에 의존하는 하이브리드화 분석법을 사용하여 수행될 수 있다.
- <140> 또한, 상기 비교는 단백질 레벨에서 수행될 수 있다. 두 조직내의 단백질 크기는 두 조직으로부터의 단백질 추

출물의 웨스턴 블롯에서 폴리펩티드를 검출하기 위한 항체를 사용하여 비교될 수 있다. 발현 레벨 및 하위세포 위치결정은 상응하는 단백질에 대한 항체를 사용하여 면역학적으로 검출될 수도 있다. 숙주로부터 유래된 샘플 내에서 본 발명의 폴리펩티드와 같은 단백질의 레벨을 결정하기 위해 사용될 수 있는 추가적인 검정 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 정상 조직에서 동일한 단백질의 발현 레벨에 비해 질환에 걸린 조직에서 폴리펩티드 발현의 증가되거나 감소된 레벨은 발현된 단백질이 질환과 연관될 수 있음을 시사한다.

- <141> 본 발명의 검정에서, 진단은 SEQ ID NO:1에 제시된 하나 이상의 서열에 의해 엔코딩된 유전자 생성물 발현 레벨의 검출에 의해 결정될 수 있다. 질환에 걸린 조직 대 정상 조직에서의 mRNA 또는 단백질 레벨의 비교는 또한 질환의 진행 또는 완화를 주시하기 위해 사용될 수 있다.
- <142> 샘플내의 수많은 폴리뉴클레오티드 서열은 폴리뉴클레오티드 어레이(array)를 사용하여 검정될 수 있다. 이들은 유전자들의 차등 발현을 조사하고 유전자 기능을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예컨대, 폴리뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:1의 어레이는 임의의 폴리뉴클레오티드가 정상 세포와 암세포간에 차등 발현되는 지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에서, SEQ ID NO:1 뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 어레이는, 예컨대 유전학적 돌연변이의 효율적인 스크리닝을 수행하기 위해 작제될 수 있다. 어레이 공학 방법은 널리 공지되어 있으며 일반적인 응용성을 가지고 있고 유전자 발현, 유전학적 연관 및 유전자학적 다양성을 포함하는 분자 유전학에서의 다양한 문제점을 해결하기 위해 사용될 수 있다 [참조: M.Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)].
- <143> 본원에 사용되는 바와 같이 "진단"에는 질환에 대한 피검자의 감수성의 결정, 피검자가 지금 질환에 걸려있는지에 대한 결정, 및 질환에 걸린 피검자의 예후가 포함된다.
- <144> 본 발명은 추가로 다음을 포함하는 진단 검정을 수행하기 위한 진단 키트에 관한 것이다:
- <145> (a) 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 단편;
- <146> (b) (a)의 서열과 상보적인 뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 SEQ ID NO:6의 뉴클레오티드 서열;
- <147> (c) 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게는 SEQ ID NO:2 또는 3의 폴리펩티드, 또는 이의 단편; 또는
- <148> (d) 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체, 바람직하게는 SEQ ID NO:2 또는 3의 폴리펩티드에 대한 항체.
- <149> 또한 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 염색체 위치결정을 위해 중요하다. 상기 서열은 개개의 사람 염색체의 특정 위치에 특이적으로 표적화되고 이와 하이브리드화될 수 있다. 본 발명에 따른 염색체에 대한 관련 서열의 맵핑은 이 서열과 유전자 관련 질환을 상호관련시키는 중요한 제 1 단계이다. 일단 서열이 정확한 염색체 위치에 대해 맵핑되면, 염색체상의 서열의 물리적 위치를 유전자 지도 데이터와 상호관련시킬 수 있다. 이러한 데이터는, 예컨대 문헌[참조: V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man(available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library)]에 밝혀져 있다. 그런 다음 동일한 염색체 영역에 대해 맵핑된 유전자와 질환 사이의 관계를 연관 분석(물리적으로 인접한 유전자의 동시유전)을 통해 확인하였다. 또한 병에 걸린 개체 및 병에 걸리지 않은 개체 간의 cDNA 또는 지놈 서열에서의 차이가 결정될 수 있다.
- <150> 본 발명의 폴리펩티드 또는 이들의 단편 또는 이들의 유사체, 또는 이들을 발현시키는 세포는 또한 본 발명의 폴리펩티드에 대해 면역특이적인 항체를 생성시키기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 용어 "면역특이적"은 항체가 종래 기술의 다른 관련 폴리펩티드에 대한 친화도보다 본 발명의 폴리펩티드에 대한 친화도가 실질적으로 크다는 것을 의미한다.
- <151> 또 다른 일면에서 본 발명은 상기 정의한 바와 같이 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 이의 면역학적 단편에 대해 면역특이적인 항체를 제공한다. 바람직하게는 상기 항체는 모노클로날 항체이다.
- <152> 본 발명의 폴리펩티드에 대해 생성된 항체는 보편적인 프로토콜을 사용하여 폴리펩티드 또는 에피토프-보유 단편, 유사체 또는 세포를 동물, 바람직하게는 사람을 제외한 동물에게 투여함으로써 획득될 수 있다. 모노클로날 항체의 제조를 위해, 연속적인 세포주 배양에 의해 생성된 항체를 제공하는 기술이 사용될 수 있다. 예에는 하이브리도마 기술[참조: Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497], 트리오마(trioma) 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술[참조: Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72] 및 EBV-하이브리도마 기술[참조: Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985]이 포함된다.
- <153> 미국 특허 제 4,946,778호에 기술된 바와 같은 단일 사슬 항체의 생성을 위한 기술은 또한 본 발명의 폴리펩티

드에 대한 단일 사슬 항체를 생성시키기 위해 적합될 수 있다. 또한, 트랜스제닉 마우스, 또는 다른 포유동물을 포함하는 그 밖의 생물체는 인간화된 항체를 발현시키기 위해 사용될 수 있다.

- <154> 상기 기술한 항체는 폴리펩티드를 발현시키는 클론을 단리하거나 동정하거나 친화도 크로마토그래피에 의해 폴리펩티드를 정제하기 위해 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 항체는 암, 특히 결장직장암, 자가면역 질환 및 관련 질환을 예방하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- <155> 본 발명의 또 다른 일면은 질환의 증상 또는 진행을 예방하거나 완화시키기 위해 항체 및/또는 T 세포 면역 반응을 생성시키기에 적합한 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 포유동물을 접종시키는 것을 포함하여 포유동물에게서 면역학적 반응을 유도시키거나 조절하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 일면은 질환으로부터 상기 동물을 보호하는 항체를 생성시키기 위한 면역학적 반응을 유도시키기 위해 생체내에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하고 폴리펩티드를 코딩하는 벡터를 통해 본 발명의 폴리펩티드를 전달하는 것을 포함하여 포유동물에게서 면역학적 반응을 유도시키거나 조절하는 방법에 관한 것이다.
- <156> 그러므로, 본 발명이 예컨대, CASB7439 폴리펩티드 활성의 존재, 과잉, 또는 하향-발현과 관련된 암 및 자가면역 질병, 특히 결장직장암과 같은 비정상적인 질환을 치료하는 방법을 제공함이 인식될 것이다. 본 발명이 치료하고자 하는 CASB7439 발현과 관련된 그 밖의 비정상적 질환은 만성 림프구성 백혈병 및 생식세포성 종양이다.
- <157> 본 발명은 CASB7439 폴리펩티드의 기능을 자극하거나 억제시키는 화합물을 확인하기 위해 화합물들을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 효능제 또는 길항제는 상기 언급한 바와 같은 질환을 위한 치료적 및 예방적 목적을 위해 사용될 수 있다. 화합물은 다양한 공급원, 예컨대 세포, 무세포 프리퍼레이션, 화학적 라이브러리 및 천연 생성물 혼합물로부터 확인될 수 있다. 이렇게 확인된 상기 효능제, 길항제 또는 억제제는 폴리펩티드일 수 있는 경우와 같이, 천연 또는 변형된 물질, 리간드, 수용체, 효소 등일 수 있거나; 이들의 구조적 또는 기능적 모사체일 수 있다[참조: Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5 (1991)]. 스크리닝 방법은 당업자가 알 수 있을 것이다. 추가의 스크리닝 방법은 예컨대, 문헌[참조: D. Bennett *et al.*, J Mol Recognition, 8:52-58 (1995); and K. Johanson *et al.*, J Biol Chem, 270(16): 9459-9471 (1995)] 및 문헌내 참조문헌들에 밝혀져 있다.
- <158> 따라서 본 발명은 다음 방법으로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드의 기능을 자극하거나 억제시키는 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 방법을 제공한다:
- <159> (a) 후보 화합물과 직접 또는 간접적으로 결합된 표지에 의해 폴리펩티드(또는 폴리펩티드를 가진 세포 또는 막) 또는 이의 용합 단백질에 후보 화합물이 결합하는 것을 측정하는 방법;
- <160> (b) 표지된 경쟁물질의 존재하에서 폴리펩티드(또는 이 폴리펩티드를 가진 세포 또는 막) 또는 이의 용합 단백질에 후보 화합물이 결합하는 것을 측정하는 방법;
- <161> (c) 폴리펩티드를 가진 세포 또는 세포막에 대해 적합한 검출 시스템을 사용하여, 후보 화합물이 폴리펩티드의 활성화 또는 억제에 의해 생성되는 시그널을 초래하는 지를 시험하는 방법;
- <162> (d) 청구의 범위 제 1항의 폴리펩티드를 함유하는 용액과 후보 화합물을 혼합시켜 혼합물을 형성시키고, 혼합물 내의 폴리펩티드의 활성을 측정하고, 혼합물의 활성을 표준물질과 비교하는 방법; 또는
- <163> (e) 예컨대, ELISA 검정을 사용하여, 세포내의 폴리펩티드 및 폴리펩티드를 엔코딩하는 mRNA의 생성에 대한 후보 화합물의 영향을 검출하는 방법.
- <164> 본 발명의 폴리펩티드는 당 분야에 공지된 표준 수용체 결합 기술을 통해 막 결합된 수용체 또는 가용성 수용체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 또한 널리 공지된 스크리닝 방법은 본 발명의 폴리펩티드가 이의 수용체에 결합하는 것과 경쟁하는 본 발명의 폴리펩티드의 효능제 및 길항제를 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- <165> 따라서, 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 효능제, 길항제, 리간드, 수용체, 기질, 효소 등; 또는 상기 폴리펩티드의 생성을 감소시키거나 향상시키는 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 키트에 관한 것이며, 이는,
- <166> (a) 본 발명의 폴리펩티드;
- <167> (b) 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 재조합 세포;

- <168> (c) 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 세포막; 또는
- <169> (d) 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하며, 여기서 폴리펩티드는 바람직하게는 SEQ ID NO:2 또는 3의 폴리펩티드이다.
- <170> 또한 본 발명의 폴리펩티드를 (a) 우선 먼저 폴리펩티드의 3차원 구조를 결정하고; (b) 효능제, 길항제 또는 억제제의 반응 또는 결합 부위(들)일 것 같은 부위에 대한 3차원 구조를 추론하고; (c) 추론된 결합 또는 반응 부위에 결합하거나 반응할 것으로 예측되는 후보 화합물을 합성하고; (d) 이 후보 화합물이 실제 효능제, 길항제 또는 억제제인 지를 시험함으로써 폴리펩티드의 효능제, 길항제 또는 억제제의 구조-기반 디자인을 위한 방법에 사용할 수 있음은 당업자에 의해 쉽게 이해될 것이다.
- <171> 또한 유전자 요법을 사용하여 피검자내의 적절한 세포에 의한 CASB7439 폴리펩티드의 내인성 생성에 영향을 줄 수 있다. 유전자 요법의 개관을 위해, 문헌[참조: Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (and references cited therein) in Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996)]을 참조하라.
- <172> 백신 제조는 일반적으로 문헌(참조: Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978)에 기술되어 있다. 리포솜내 캡슐화는, 예컨대 풀러톤(Fullerton)에 의한 미국 특허 제 4,235,877호에 기술되어 있다. 고분자에 대한 단백질의 컨주게이션은, 예컨대 리크하이트(Likhite)에 의한 미국 특허 제 4,372,945호 및 아르모르(Armor) 등에 의한 미국 특허 제 4,474,757호에 기술되어 있다.
- <173> 각 백신 투여량에 있어서 단백질의 양은 전형적인 백신접종자에게 현저하게 불리한 부작용을 일으킴없이 면역보호 반응을 유도시키는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 특정 면역원이 사용됨에 따라 다양할 것이다. 일반적으로, 각 투여량은 단백질 1 내지 1000 μ g, 바람직하게는 2 내지 100 μ g, 가장 바람직하게는 4 내지 40 μ g의 단백질을 포함할 것이다. 특정 백신을 위한 최적량은 피검자내의 항체 역가 및 그 밖의 반응의 관찰과 관련된 표준 연구에 의해 평가될 수 있다. 최초 백신접종에 이후, 피검자에게 약 4주 후에 추가접종될 수 있다.
- <174> "단리된"은 천연 상태에서부터 "사람의 손에 의해" 변경되었음을 의미한다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연 발생하는 경우, 이것은 이의 본래 환경으로부터 변화 또는 분리되거나, 변화되고 분리된다. 예컨대, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리되지" 않은 것이지만, 이의 천연 상태로 공존하는 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 본원에 사용한 바와 같이 "단리된" 것이다.
- <175> "폴리뉴클레오티드"는 일반적으로 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 말하며, 이들은 단일 및 이중 가닥 영역을 포함하는 변형되지 않은 RNA 또는 DNA, 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다.
- <176> "변이체"는 참조 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 상이하지만, 필수적인 특성을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 폴리뉴클레오티드의 전형적인 변이체는 또 다른 참조 폴리뉴클레오티드로부터의 뉴클레오티드 서열이 상이하다. 변이체의 뉴클레오티드 서열에 있어서의 변화는 참조 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경시킬 수 있거나 변경시킬 수 없다. 뉴클레오티드 변화는 하기 논의하는 바와 같이, 참조 서열에 의해 엔코딩된 폴리펩티드내에서 아미노산 치환, 첨가, 결실, 융합 및 트렁케이션(truncation)을 초래할 수 있다. 폴리펩티드의 전형적인 변이체는 또 다른 참조 폴리펩티드로부터의 아미노산 서열과 상이하다. 일반적으로, 차이는 참조 폴리펩티드 및 변이체의 서열이 전체적으로 매우 유사하고, 많은 영역에서 동일하도록 제한되어 있다. 변이체와 참조 폴리펩티드는 임의 조합의 하나 이상의 치환, 첨가, 결실에 의한 아미노산 서열면에서 상이할 수 있다. 치환되거나 삽입된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 엔코딩된 아미노산일 수 있거나 아닐 수 있다. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 변이체는 대립형질 변이체와 같은 천연 발생할 수 있거나, 천연 발생하는 것으로 알려지지 않은 변이체일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 비천연 발생 변이체는 돌연변이 유발 기술 또는 직접적인 합성에 의해 만들어 질 수 있다.
- <177> 당 분야에 공지된 바와 같이 "동일성"은 서열들을 비교함으로써 결정되는 바와 같이 두 개 이상의 폴리펩티드 서열 또는 두 개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열간의 관련성이다. 또한 당분야에서, "동일성"은 일련의 서열들간의 일치에 의해 결정되는 바와 같이, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열들간의 서열 관련성의 정도를 의미한다. "동일성" 및 "유사성"은 문헌[참조: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed.,

Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988)]에 기술되어 있는 방법들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공지된 방법들에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 동일성을 결정하는 바람직한 방법은 시험된 서열들 간의 최대 매치를 제공하도록 디자인된다. 동일성 및 유사성을 결정하는 방법은 공개적으로 이용할 수 있는 컴퓨터 프로그램으로 집대성되어 있다. 두 서열간의 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램에는 GCG 프로그램 패키지[참조: Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)], BLASTP, BLASTN 및 FASTA[참조: Atschul, S.F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990)]가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. BLAST X 프로그램은 NCBI 및 그 밖의 공급원[참조: BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)]으로부터 공개적으로 이용할 수 있다. 또한 널리 공지된 스미스 워터맨(Smith Waterman) 알고리즘을 동일성을 결정하기 위해 사용할 수 있다.

- <178> 사용된 바람직한 알고리즘은 FASTA이다. 이 알고리즘을 사용하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에 대한 바람직한 파라미터는 다음을 포함한다:
- <179> 갭 패널티 (Gap Penalty): 12
- <180> 갭 익스텐션 패널티 (Gap extension penalty): 4
- <181> 워드 크기 (Word size): 2, 최대 6
- <182> 다른 방법을 사용하는 폴리펩티드 서열 비교를 위한 바람직한 파라미터는 다음을 포함한다:
- <183> 1) 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)]
- <184> 비교 매트릭스: BLOSSUM62[Hentikoff and Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10915-10919 (1992)]
- <185> 갭 패널티: 12
- <186> 갭 랭스 패널티 (Gap Length Penalty): 4
- <187> 이러한 파라미터들을 사용하는 유용한 프로그램은 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group, Madison WI)으로부터의 "gap" 프로그램과 같이 공개적으로 입수할 수 있다. 상기된 파라미터들은 폴리펩티드 비교를 위한 디폴트 파라미터들이다(말단 갭에 대한 패널티없음).
- <188> 폴리뉴클레오티드 비교를 위한 바람직한 파라미터는 다음을 포함한다:
- <189> 1) 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)]
- <190> 비교 매트릭스: 매치 = +10, 미스매치 = 0
- <191> 갭 패널티: 50
- <192> 갭 랭스 패널티: 3
- <193> 이러한 파라미터들을 사용하는 유용한 프로그램은 제네틱스 컴퓨터 그룹으로부터의 "gap" 프로그램과 같이 공개적으로 입수할 수 있다. 상기된 파라미터들은 폴리뉴클레오티드 비교를 위한 디폴트 파라미터들이다.
- <194> 예로써, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:1의 참조 서열과 동일, 즉 100% 동일하거나, 상기 참조 서열과 비교했을 때 특정한 정수 이하의 뉴클레오티드 변화를 포함할 수 있다. 이러한 변화는 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 트랜지션 및 트랜스버전을 포함하는 치환, 또는 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되며, 여기서 상기 변화는 개별적으로 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 참조 서열 또는 참조 서열내의 하나 이상의 인접 그룹의 뉴클레오티드간에 배치된 이들 말단 위치사이의 임의위치에서 일어날 수 있다. 뉴클레오티드 변화의 수는 각 퍼센트 동일성(100으로 나눈)의 숫자 퍼센트에 의해 SEQ ID NO:1내의 뉴클레오티드의 전체 수를 곱하고 SEQ ID NO:1내의 뉴클레오티드의 전체 수로부터 생성물을 뺌으로써 결정된다:
- <195> $n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$,
- <196> 상기 식에서, n_n 은 뉴클레오티드 변화의 수이고, x_n 은 SEQ ID NO:1내의 뉴클레오티드의 전체 수이고, y 는, 예컨

대 70%인 경우 0.70, 80%인 경우 0.80, 85%인 경우 0.85, 90%인 경우 0.90, 95%인 경우 0.95 등이고, 여기서 \mathbf{x}_a 와 \mathbf{y} 의 임의의 비정수 곱(product)은 \mathbf{x}_a 으로부터 이를 빼기 전에 가장 가까운 정수로 끝수가 잘려진다. SEQ ID NO:2의 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변화는 이 코딩 서열내에 넌센스, 미스센스 또는 프레임쉬프트 돌연변이를 생성시킴으로써 상기 변화 다음의 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드를 변화시킬 수 있다.

<197> 유사하게는, 본 발명의 폴리펩티드 서열은 SEQ ID NO:2의 참조 서열과 동일, 즉 100% 동일하거나, 동일성(%)이 100% 미만인 되도록 참조 서열과 비교하여 특정 정수 이하의 아미노산 변화를 포함할 수 있다. 이러한 변화는 하나 이상의 아미노산 결실, 보존적 및 비보존적 치환을 포함하는 치환, 또는 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되며, 여기서 상기 변화는 참조 폴리펩티드 서열의 아미노-말단 또는 카복시-말단 위치 또는 개별적으로 참조 서열 또는 참조 서열내의 하나 이상의 인접 그룹내 아미노산 사이에 배치된 말단 위치들 사이의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 소정의 동일성(%)에 대한 아미노산 변화의 수는 각 퍼센트 동일성(100으로 나눈)의 숫자 퍼센트에 의해 SEQ ID NO:2내의 아미노산의 전체 수를 곱한 다음 SEQ ID NO:2내의 아미노산의 전체 수로부터 생성물을 뺌으로써 결정된다:

<198> $n_a \leq \mathbf{x}_a - (\mathbf{x}_a \cdot \mathbf{y})$,

<199> 상기 식에서, n_a 는 아미노산 변화의 수이고, \mathbf{x}_a 는 SEQ ID NO:2내의 아미노산의 전체 수이고, \mathbf{y} 는, 예컨대 70%인 경우 0.70, 80%인 경우 0.80, 85%인 경우 0.85 등이고, 여기서 \mathbf{x}_a 및 \mathbf{y} 의 임의의 비정수 곱은 \mathbf{x}_a 로부터 이를 빼기 전에 가장 가까운 정수로 끝수가 잘려진다.

<200> "동족체"는 당분야에서 사용하는 유전학적 용어로서 대상 서열과 높은 정도의 서열 관련성을 가진 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열을 가리킨다. 이러한 관련성은 상기 기술한 바와 같이 비교되는 서열들간의 동일성 및/또는 유사성의 정도를 결정함으로써 정량화될 수 있다. 이러한 유전학적 용어내에는 다른 종 내의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 기능적 등가물인 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 의미하는 용어 "오르토로그(ortholog)" 및 동일 종내에서 고려하는 경우 기능적으로 유사한 서열을 의미하는 "파라로그(paralog)"가 포함된다.

실시예

<207> 실시예 1

<208> 실시간 RT-PCR 분석

<209> 실시간 RT-PCR(참조: U. Gibson, 1996. Genome Research: 6,996)을 사용하여 여러 환자로부터의 매치된 종양 및 정상 결장 조직에서의 후보 항원의 mRNA 전사체 존재비를 비교하였다. 또한, 정상 조직의 패널내의 후보 유전자의 mRNA 레벨을 이러한 접근법에 의해 평가하였다.

<210> 정상 및 종양 결장으로부터의 전체 RNA를 TriPure 시약(보링거(Boehringer))를 사용하여 스냅 동결된 생검물로부터 추출하였다. 정상 조직으로부터의 전체 RNA를 인비트로젠(InVitrogen)으로부터 구입하거나 TriPure 시약을 사용하여 스냅 동결된 생검물로부터 추출하였다. 폴리-A⁺ mRNA를 올리고-dT 자석 비드(Dynal)를 사용한 DNase 처리 후에 전체 RNA로부터 정제하였다. mRNA의 정량화를 SybrII 염료(몰리큘러 프로브스(Molecular Probes))를 사용하는 스펙트로플루오리메트리(VersaFluor, BioRad)에 의해 수행하였다. 실시간 PCR 증폭을 위한 프라이머를 TaqMan 증폭 조건을 위한 디폴트 옵션을 사용하는 퍼킨-엘머 프라이머 익스프레스 소프트웨어(Perkin-Elmer Primer Express software)를 사용하여 디자인하였다.

<211> 실시간 반응을 각 반응을 위해 정제된 mRNA 2ng을 사용하는 표준 PCR 프로토콜에 따라 어셈블링시켰다. SybrI 염료(Molecular Probes)를 실시간 검출을 위해 최종 희석 1/75000으로 첨가하였다. 증폭(40 사이클) 및 실시간 검출을 보편적인 장비 셋팅을 사용하는 퍼킨-엘머 바이오시스템즈 PE7700 시스템에서 수행하였다. Ct 값을 PE7700 서열 검출 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 다수의 Ct 값을 각 환자 샘플에 대해 획득하였다: 환자 샘플의 경우, 후보 TAA에 대한 종양 Ct(CtT) 및 매치된 정상 결장 Ct(CtN) 값, 및 정상 조직 샘플의 패널의 경우, 각각의 정상 조직 XY에 대한 CtXY. 또 다른 Ct (CtA)를 모든 샘플과 관련하여 내부 기준으로서 액틴 유전자에 대해 또한 계산하였다. 대안적으로, 실시간 PCR 증폭을 Taqman 프로브를 사용하여 모니터할 수 있다. 증폭(40 사이클) 및 실시간 검출을 보편적인 장비 셋팅을 사용하는 퍼킨-엘머 바이오시스템즈 PE7700 시스템에서 수행하였다. Ct 값을 PE7700 서열 검출 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. Ct 값을 표적 mRNA (CtX) 및 액틴

mRNA (CtA)에 대해 각각의 조직 샘플로부터 획득하였다.

<212> 일반적인 실험 조건하에서 PCR 증폭의 효율이 이론적인 증폭 효율과 비슷하기 때문에, $2^{-(CtN/T/XY-CtA)}$ 값은 액틴 전사체 레벨과 관련하여 표준화된 샘플의 상대적 TAA 전사체 레벨의 추정치이다. 1의 값은 후보 항원 및 액틴이 동일한 발현 레벨을 지님을 암시한다.

<213> 실시간 PCR 반응은 12명의 환자의 생검물로부터의 종양 결장 및 매칭 정상 결장으로 먼저 수행하였다. 그 후, 반응을 전체 18명의 환자의 보다 완전한 데이터 셋으로 수행하였다 (이 데이터 셋에는 처음 12명의 환자가 포함됨). 이들 18명의 환자 중 6명에 대한 듀플리케이트(duplicate)가 이 데이터 셋에서 이루어졌다. 6명의 추가 환자를 시험하고, 그 결과를 이전의 18명과 함께 풀링하였다. 최종 풀에 대한 통계를 표 3에 나타내었고, 도 1에 도시하였다.

<214> 또한, 29개의 상이한 조직을 나타내는 일련의 48명의 정상 조직 샘플을 동일한 방법으로 시험하였다 (분석된 정상 조직은 표 3에 나타나 있다). TAA 전사체 레벨을 상기 기술한 바와 같이 계산하였다. 후보 항원들을 과잉발현하는 환자의 비율 뿐만 아니라 정상 조직에 대한 평균 전사체 과잉발현을 또한 이 데이터 셋으로부터 계산하였다. 결과를 도 1에 도시하였다.

<215> 표 1: CASB7439 실시간 PCR 발현 결과: 12명의 환자의 데이터 셋.

<216>	매치된 종양 결장에서보다 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 % (포지티브 환자)	92%
	매치된 종양 결장에서보다 3배 이상 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	92%
	매치된 종양 결장에서보다 10배 이상 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	92%
	매치된 종양 결장에서보다 3배 이상 낮은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	8%
	평균 매치된 정상 결장 mRNA 레벨 (액틴 표준화됨)	0.0026
	포지티브 환자에서의 평균 매치된 종양 결장 mRNA 레벨 (액틴 표준화됨)	0.265
	평균 mRNA 과잉발현 배수	2028
	중간 mRNA 과잉발현 배수	115
	평균 정상 조직 mRNA 레벨	0.0079
	중간 정상 조직 mRNA 레벨	0.0016
	평균 정상 조직 mRNA 레벨	0.0064
	중간 정상 조직 mRNA 레벨	0.0017
	평균 정상 조직보다 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	92%
	평균 정상 조직보다 10배 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	75%
	중간 정상 조직 mRNA 레벨 보다 높은 정상 필수 조직	없음

<217> 표 2: CASB7439 실시간 PCR 발현 결과: 18명의 환자의 데이터 셋.

<218>	매치된 종양 결장에서보다 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 % (포지티브 환자)	89%
	매치된 종양 결장에서보다 3배 이상 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	89%
	매치된 종양 결장에서보다 10배 이상 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	78%
	매치된 종양 결장에서보다 3배 이상 낮은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	5%
	평균 매치된 정상 결장 mRNA 레벨 (액틴 표준화됨)	0.005
	포지티브 환자에서의 평균 매치된 종양 결장 mRNA 레벨 (액틴 표준화됨)	0.152
	평균 mRNA 과잉발현 배수	1100
	중간 mRNA 과잉발현 배수	60
	평균 정상 조직 mRNA 레벨	0.0065
	중간 정상 조직 mRNA 레벨	0.0015
	평균 정상 조직 mRNA 레벨	0.005
	중간 정상 조직 mRNA 레벨	0.0015
	중간 정상 조직보다 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	94%
	중간 정상 조직보다 10배 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	94%
	중간 정상 조직 mRNA 레벨 보다 높은 정상 필수 조직	없음

표 3: CASB7439 실시간 PCR 발현 결과: 24명의 환자의 데이터 셋.

인접 정상 결장 보다 종양 결장에서 보다 높은 CASB7439 전사체 레벨을 지닌 환자의 %	92%
인접 정상 결장 보다 종양 결장에서 10배 이상 높은 CASB7439 전사체 레벨을 지닌 포지티브 환자의 %	75%
포지티브 환자의 종양에서의 평균 전사체 과잉발현 배수	1289
정상 조직 평균 보다 종양 결장에서 높은 CASB7439 전사체 레벨을 지닌 환자의 %	96%
정상 조직 평균 보다 종양 결장에서 10배 이상 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	62.5%
CASB7439 전사체 발현이 종양에서의 종양 전사체와 등가인 정상 조직	없음

실시간 PCR 반응을 6명의 환자의 생검물로부터의 종양 결장 및 인접 정상 결장으로 Taqman 프로토콜 (상기 기술된)을 사용하여 또한 수행하였다. 3회의 레플리케이트(replicate) 측정을 각각에 대해 수행하여, 평균값을 추가의 계산을 위해 사용하였다. 결과를 도 1에 나타내었다. 더욱이, 28개의 상이한 조직을 나타내는 36개의 정상 조직 샘플 (표 5 참조)을 동일한 방법에 의해 또한 시험하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

표 4: Taqman 프로브를 사용한 CASB7439 실시간 PCR 발현 결과

다양한 환자로부터의 종양 샘플의 수	6
인접 정상 결장 보다 종양 결장에서 높은 CASB7439 전사체 레벨을 지닌 환자의 % (포지티브 환자)	100%
인접 정상 결장 보다 종양 결장에서 10배 이상 높은 CASB7439 전사체 레벨을 지닌 포지티브 환자의 %	83%
포지티브 환자의 종양에서의 평균 전사체 과잉발현 배수	109
정상 조직 평균 보다 종양 결장에서 높은 CASB7439 전사체 레벨을 지닌 환자의 %	100%
정상 조직 평균 보다 종양 결장에서 10배 이상 높은 mRNA 레벨을 지닌 환자의 %	100%
CASB7439 전사체 발현이 종양에서의 종양 전사체 레벨과 등가인 정상 조직	없음

결과는 CASB7439 전사체가 인접 정상 결장 및 상기 언급된 모든 정상 조직과 비교하여 결장직장 종양에서 과잉발현됨을 명백히 암시한다. 90%가 넘는 환자가 인접 정상 결장과 비교하여 종양에서 CASB7439 전사체를 강하게 과잉발현시킨다. 종양에서의 평균 과잉발현 배수는 100 이상이다. 더욱이, 90%가 넘는 환자가 그 밖의 정상 조직과 비교하여 결장직장 종양에서 CASB7439 전사체를 과잉발현시키며, 이들 중 60%가 넘는 환자는 10배 이상으로 과잉발현시킨다.

표 5: CASB7439 전사체 발현 분석에 사용된 정상 조직의 목록.

조직	약어
부신	Ad_Gl
대동맥	Ao
방광	Bl
골수	Bo_Ma
뇌	Bra
경부	Ce
결장	Co
난관	Fa_Tu
심장	He
일레온(Ileum)	Il
신장	Ki
간	Li
폐	Lu
림프절	Ly_No
식도	Oe

부갑상선	Pa_Thy
직장	Re
피부	Sk
골격근	Sk_Mu
소장	Sm_In
비장	Sp
위	St
갑상선	Thy
기관	Tra
난소	Ov
태반	Pl
전립선	Pr
고환	Te

<227> 실시예 2

<228> cDNA 어레이의 차등 스크리닝.

<229> 서브트랙티드(subtracted) cDNA 라이브러리 중의 종양 관련된 유전자의 확인은 차등 스크리닝에 의해 달성되었다.

<230> 전체 세균 DNA를 100 μ l 오버-나잇(over-night) 배양물로부터 추출하였다. 세균을 구아니딘 이소티오시안테이트로 용해시키고, 세균 DNA를 마그네틱 글래스(Boehringer)를 사용하여 친화도 정제하였다. 플라스미드 삽입물을 어드밴테이지 PCR 증폭 (Clontech)에 의해 세균 DNA로부터 회수하였다. PCR 생성물을 Biomek 96 HDRT 툴(tool) (Beekman)을 사용하여 두 개의 나일론막에 도팅(dotting)하여 고밀도 cDNA 어레이를 생성시켰다. 스포팅(spotting)된 cDNA를 UV 조사에 의해 막에 공유결합시켰다. 첫 번째 막을 1명의 환자의 종양으로부터 준비한 혼합 cDNA 프로브와 하이브리드화시켰다. 두 번째 막은 동일한 환자의 정상 결장으로부터 준비한 등량의 혼합 cDNA 프로브와 하이브리드화시켰다. 프로브 cDNA를 상기 기술된 PCR 증폭에 의해 준비하고, 알크포스 다이렉트 시스템(AlkPhos Direct System) (Amersham)을 사용하여 표지시켰다.

<231> 하이브리드화 조건 및 스트린젠시(stringency) 세척은 알크포스 다이렉트 키트에 기술된 바와 같았다. 하이브리드화된 프로브를 화학형광에 의해 검출하였다. 둘 모두의 블롯상의 각각의 cDNA 단편에 대한 하이브리드화 강도를 필름 밀도계측법 또는 직접 측정법 (BioRad Fluor-S Max)에 의해 측정하였다. 종양 대 정상 하이브리드화 강도의 비 (T/N)를 각각의 유전자에 대해 계산하여 종양에서의 과잉발현의 정도를 평가하였다. 결장 종양에서 현저히 과잉발현된 유전자를 주시하였다. 현저성은 T/N 빈도 분포의 하나의 표준 편차로서 임의적으로 규정된다. 차등 스크리닝 실험을 다수의 환자 도너 (>18)로부터의 RNA를 사용하여 반복함으로써 환자 군집에서의 과잉발현 종양의 빈도를 평가하였다.

<232> 또한, DNA 어레이를 결장 이외의 정상 조직 (상기 목록 참조)로부터의 혼합 cDNA 프로브와 하이브리드화시켜서 이들 조직에서의 후보 유전자의 발현 레벨을 측정하였다.

<233> 실시예 3

<234> DNA 마이크로어레이

<235> DNA 마이크로어레이를 사용하여 여러 샘플내의 유전자의 거대 수집물의 mRNA 발현 프로파일을 검사하였다. 이 정보는 실시간 PCR에 의해 획득된 데이터를 보완하는 데에 사용되었고, 종양 및 정상 조직내의 유전자 발현 레벨의 독립적인 측정을 제공하였다.

<236> DNA 마이크로어레이의 생성을 위한 현재의 기술의 예에는 1) 올리고뉴클레오타이드를 사진제판 방법을 사용하는 고상 화학적 합성에 의해 칩의 표면상에서 합성시키는 어피메트릭스(Affymetrix) "진칩(GeneChip)" 어레이, 2) 소량의 DNA 용액을 로봇에 의해 증착시킨 다음 고상(예컨대, 유리)의 표면상에 고정시키는 DNA 스포팅(spotting) 기술이 포함된다. 두 가지 예 모두에서, 칩은 관심있는 조직(예컨대, 정상 조직, 종양 등)으로부터 추출된 cDNA 또는 cRNA와 하이브리드화되고 방사성 또는 형광성 리포터 분자에 의해 표지된다. 표지된 물질을 칩과 하이브리드화시키고 칩상의 각 서열에 결합된 프로브의 양을 특수 스캐너를 사용하여 결정하였다. 이 실험은 단일 형광성 리포터(또는 방사성)를 사용하여 셋업(set-up)할 수 있거나, 대안적으로는, 두 가지 형광성

리포터를 사용하여 수행할 수 있다. 후자의 경우에서, 두 샘플 각각을 리포터 분자 중 하나로 표시시켰다. 그런 다음 이 두 가지 표시된 샘플을 DNA 칩상의 서열과 경쟁적으로 하이브리드화시켰다. 두 가지 형광성 시그널의 비를 칩상의 서열 각각에 대해 결정하였다. 이 비를 사용하여 두 샘플내의 전사체의 상대적 존재비를 계산하였다. 상세한 프로토콜은 문헌(참조: "DNA Microarrays: A practical approach. Schena M. Oxford University Press 1999") 및 월드 와이드 웹(<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>, <http://arrayit.com/DNA-Microarray-Protocols/>) 및 전문 배포업체(예컨대, 어피메트릭스)를 포함하는 수많은 공급원으로부터 이용할 수 있다.

<237> 실시예 5

<238> 노던-서던 블롯 분석

<239> 한정된 양의 혼합된 종양 및 매치된 정상 결장 cDNA를 어드밴티지 PCR에 의해 증폭시켰다 (상기 참조). 또한, 여러 정상 조직으로부터의 메신저 RNA를 동일한 방법을 사용하여 증폭시켰다. 증폭된 cDNA(1 μ g)를 1.2% 아가로오스 겔상에서 전기영동시키고 나일론 막상으로 이동시켰다. 이 막을 후보 TAA cDNA의 단편을 사용하여 제조된 프로브와 하이브리드화시켰다 (AlkPhos Direct System)). 노던-서던 분석은 종양 및 정상 조직내의 전사체 크기, 스플라이스 변이체의 존재 및 전사체 존재비에 대한 정보를 제공한다.

<240> 실시예 6

<241> 노던 블롯 분석

<242> 노던 블롯을 1 μ g의 폴리 A + mRNA 을 사용하는 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 방사성 프로브를 레디-투-고 (Ready-to-Go) 시스템(파마시아(Pharmacia))을 사용하여 제조하였다.

<243> 실시예 7

<244> 전장 cDNA 서열의 실험적 확인

<245> 결장 종양 cDNA 라이브러리를 5 μ g의 폴리A + mRNA로부터 람다 잭 II(Lambda Zap II) 시스템(Stratagene)을 사용하여 제조하였다. 공급된 프로토콜을 수행하되, 슈퍼스크립트II(Superscript II)(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 역전사 단계를 위해 사용하였다. 올리고 dT-프라이밍된 라이브러리와 무작위-프라이밍된 라이브러리를 작제하였다. 약 1.5×10^6 독립 파아지를 상기 라이브러리의 각 스크리닝을 위해 플레이트팅하였다. 파아지 플라스크를 나일론 필터상으로 이동시키고 알크포스 다이렉트로 표지시킨 cDNA 프로브를 사용하여 하이브리드화시켰다. 포지티브 파아지를 화학발광에 의해 검출하였다. 포지티브 파아지를 아가 플레이트로부터 절제하여, 500 μ l SM 완충액중에 용리시키고, 유전자-특이적 PCR에 의해 확인하였다. 용리된 파아지를 생체내 절제에 의해 단일 가닥 M13 박테리오파아지로 전환시켰다. 그런 다음 이 박테리오파아지를 *E. coli*의 감염에 의해 이중 가닥 플라스미드 DNA로 전환시켰다. 감염된 세균을 플레이트팅하고 cDNA 프로브를 사용하는 스크리닝의 제 2 라운드에 적용하였다. 플라스미드 DNA를 포지티브 세균 클론으로부터 정제하고 양 가닥에 대해 서열분석하였다.

<246> 전장 유전자를 cDNA 라이브러리로부터 직접적으로 수득할 수 없는 경우, 결손 서열을 RACE 기술(Marathon Kit, ClonTech)을 사용하여 단리시켰다. 이러한 방법은 mRNA를 이중 가닥 cDNA로 역전사시키고, cDNA의 말단에 링커를 연결시키고 유전자-특이적인 프라이머와 링커 올리고뉴클레오타이드 중 하나를 사용하여 cDNA의 요망되는 말단을 증폭시키는 것에 의존한다. 마라톤 PCR 생성물을 플라스미드(pCRII-TOPO, InVitrogen)내로 클로닝시키고 서열분석하였다.

<247> SEQ ID NO:1의 폴리뉴클레오타이드를 이 방법을 사용하여 수득하였다.

<248> 실시예 8.

<249> EST 프로파일

<250> 실험적인 항원 조직 발현 특징화를 위한 보충적인 방법은 사람 EST 데이터베이스를 조사하는 것이다. EST('Expressed Sequence Tag')는 특정 조직 또는 세포주로부터 추출된 mRNA의 수집물로부터 만들어진 cDNA의 작은 단편이다. 이러한 데이터베이스는 현재 다양한 타입과 상태의 질환으로부터의 종양 조직을 포함하여, 수천의 cDNA 조직 라이브러리로부터 엄청난 양의 사람 EST(2×10^6)를 제공한다. 정보학 도구(Blast)에 의해, CASB7439 서열의 비교 검색을 수행하여 조직 발현을 추가로 통찰하였다.

CASB7439의 EST 분포:

EST 유전자 은행(GenBank) 수탁 번호	EST cDNA 조직 라이브러리
C00634	사람 성인 (K.Okubo)
AA468668	NCI_CGAP_Co3
AA565752	NCI_CGAP_Co11
AA565766	NCI_CGAP_Co11
AA565767	NCI_CGAP_Co11
AI337239	NCI_CGAP_Co16
AI337448	NCI_CGAP_Co16
AI393930	NCI_CGAP_CLL1
AI473673	NCI_CGAP_Co14
AI632444	NCI_CGAP_GC6
AI861937	NCI_CGAP_Co16
AI825214	NCI_CGAP_GC6
AW080652	NCI_CGAP_Co19
AW083899	NCI_CGAP_Co19
AW206058	NCI_CGAP_Sub3
AW237006	NCI_CGAP_GC6
AW364626	DT0036
AW449612	NCI_CGAP_Sub5

이들 EST는 CASB7439와 완전히 매치된다. 상기 목록은 4가지 상이한 종양 결장 라이브러리로부터의 9개 EST, 하나의 정상 결장 라이브러리로부터의 하나의 EST, 하나의 종양 생식세포 라이브러리로부터의 3개의 EST, 하나의 만성 림프구 백혈병 세포 라이브러리로부터의 하나의 EST, 2가지의 혼합된 종양 라이브러리로부터의 2개의 EST, 공지되지 않은 타입의 라이브러리로부터의 2개의 EST를 함유한다. 이는 예상된 바와 같이 정상 조직과 비교하여 CASB7439가 **종양 조직, 특히 결장직장 종양 조직에서 과잉발현됨**을 명백히 암시한다.

실시예 9:

9.1 종양-특이적 항원의 발현 및 정제

미생물 숙주에서의 발현, 또는 대안적으로는 시험관내 전사/번역을 사용하여 백신을 위한 본 발명의 항원을 생성시키고 면역조직화학에 의한 천연 발현된 단백질의 특징화 또는 정제의 추적조사(follow-up)를 위해 필요한 항체의 신속한 정제 및 생성을 위한 단백질 단편 또는 전체 단백질을 생성시켰다.

제조합 단백질은 두 가지 미생물 숙주인 *E. coli* 및 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*))에서 발현될 수 있다. 이것은 이러한 특정 항원 생성을 위해 가장 우수한 특징을 가진 발현시스템을 선택하도록 해준다. 일반적으로, 제조합 항원은 *E. coli*에서 발현될 것이며 시약 단백질은 효모에서 발현될 것이다.

발현 전략은 우선 제조합 항원의 일차 구조의 디자인과 관련되어 있다. 일반적으로 발현 융합 파트너(EFP)는 면역 융합 파트너(IFP)인 항원의 면역원성 특성을 조절하기에 유용한 영역을 포함할 수 있는 발현의 레벨을 향상시키기 위해 N 말단에 위치되어 있다. 또한, 추가적인 정제를 촉진시키기 위해 유용한 친화도 융합 파트너(AFP)는 C-말단에 포함되어 있다.

상기 언급된 바와 같이, 수 가지 작제물을 사용하여 비교 평가할 수 있었다:

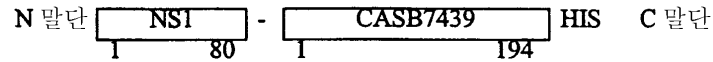
CASB7439의 신속 발현 및 정제 뿐만 아니라 이에 대한 항체의 생성과 관련하여, EFP로서 NS1을 지니고 AFP로서 히스티딘 테일을 지닌 전장 CASB7439 단백질을 *E.Coli*에서 생성시키는 것이 제안된다.

따라서, 두 가지 작제물이 제안된다:

작제물 1: EFP로서의 NS1 cDNA 및 AFP로서의 히스티딘 테일 코딩 cDNA와 융합된 전장의 야생형 CASB7439 cDNA (SEQ ID NO:8). 엔코딩된 융합 단백질 서열은 SEQ ID NO:10 이다.

<263> **작제물 2:** EFP로서의 NS1 cDNA 및 AFP로서의 히스티딘 테일 코딩 cDNA와 융합된 전장의 돌연변이된 CASB7439 cDNA (SEQ ID NO:9). *E.coli* 숙주에서 CASB7439의 발현 잠재력을 향상시키기 위해 이러한 작제물에서 본래의 CASB7439 cDNA의 최초 50개 코돈이 *E.coli* 코돈 사용방식(usage)에 특이적인 코돈에 의해 치환되는 것이 제안된다. 엔코딩된 융합 단백질 서열은 SEQ ID NO:10 이다.

<264> CASB7439 단백질 디자인은 하기 나타난 바와 같다:



<265>

<266> "NS1"은 인플루엔자 단백질 NS1의 N 말단 단편 (80개 아미노산) 이다. "HIS"는 폴리히스티딘 테일이다.

<267> 사용된 재조합 스트레인은 AR58 이다: *gal* E::Tn 10, Δ -8(*chlD-pgl*), Δ -H1(*cro-chlA*), N+, 및 cI857인 N99로부터 유래된 숨은(cryptic) λ 라이소겐 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol82, pp.88-92, January 1985 Biochemistry)

<268> 재조합 스트레인을 이용할 수 있는 경우, 재조합 생성물을 미정제 추출물에서의 양상의 분석에 의한 발현의 레벨의 평가 및 단백질의 추가적인 용해도의 예측에 의해 특징화하였다.

<269> 적절한 배양 배지상에서 성장시키고 재조합 단백질 발현을 유도시킨 후에, 전체 추출물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 재조합 단백질을 염색된 겔에서 가시화시키고 특이적인 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다.

<270> 플라스미드:

<271> 명칭: TCM 281 pRIT..15143

<272> 레플리콘: pMB1

<273> 선택: Kan

<274> 프로모터: P1 long

<275> 삽입물: NS1-C74-39-His

<276> 작제물 1로부터의 재조합 단백질의 발현:

<277> 세균을 30℃에서 LB 배지 + 50 μ g/ml Kan에서 성장시켰다

<278> 배양물의 OD가 0.5 (620nm)에 도달하면, 배양물을 39℃로 가열하고, 5시간 유도시킨 후, 세포를 수거하였다

<279> 추출물 준비:

<280> 세포 농도: 완충액 PBS + 완전.. 중의 .50X..

<281> 파괴: 프레스 프렌치(press french) 3X

<282> 원심분리: 14000t에서 30분

<283> 주해: 세포 추출물의 상층액 중의 90% 초과

<284> 세포 추출물을 12.5% SDS PAGE 상에서 러닝(running)시킨 후, 쿠마시 블루로 염색하였다. 폴리-히스티딘 테일에 대한 시판 모노클로날 항체(Quiagen)를 사용하여 웨스턴 블롯을 또한 수행하였다. 생성된 겔 (도 3 및 4)은 단백질이 발현되고 세포 추출 현탁액에서 가시적임을 보여준다.

<285> 정제 계획은 재조합 단백질내에 His 친화도 테일의 존재에 기초하는 고전적인 방법에 따랐다. 전형적인 실험에서, 파괴된 세포를 여과시키고 세포가 없는 추출물을 이온 금속 친화도 크로마토그래피(IMAC; Quiagen으로부터의 Ni⁺⁺ NTA)상에 로딩시켜 특이적으로 재조합 단백질이 남도록 하였다. 잔류된 단백질을 인산염 완충액중의 0 내지 500mM 이미다졸 구배(가능하게는 세정제의 존재하에서)에 의해 용리시켰다.

<286> 수거된 배양물로부터의 상층액을 6M 우레아, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH 8 중에서 변성시키고, 하기 조건하

에서 크로마토그래피 컬럼 IMAC Qiagen NTA Ni⁺⁺ 상에 로딩시켰다:

<287> 평형 완충액: NaH₂PO₄ 100mM pH 8
 <288> Tris 10mM
 <289> 우레아 6M
 <290> 샘플: 우레아 6M, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris 중의 상층액
 <291> 세척 완충액: 1) NaH₂PO₄ 100mM pH 8
 <292> Tris 10mM
 <293> 우레아 6M
 <294> 이미다졸 25mM
 <295> 2) NaH₂PO₄ 100mM pH 8
 <296> Tris 10mM
 <297> 우레아 6mM
 <298> 이미다졸 50mM
 <299> 용리 완충액: NaH₂PO₄ 100mM pH 5.5
 <300> Tris 10mM
 <301> 우레아 6M
 <302> 이미다졸 500mM

<303> 500mM 이미다졸 + 6M 우레아 중의 용리된 단백질을 하기 조건하에서 투석시켰다:

- <304> - PBS PH 7.2 + 사르코실(sarkosyl) 0.5% + 4M 우레아
- <305> - 2M 우레아 2시간에서 위와 같음
- <306> - 0M 우레아 2시간에서 위와 같음

<307> 최종 물질을 동결시키고, 저장하였다. 단백질 함량을 로우리 단백질 검정을 사용하여 정량하였다 (0.9mg/1.2ml). 순도를 쿠마시 블루로 염색되는 12.5% PAGE SDS에 의해 평가하고 (도 5), 재조합 단백질의 존재를 안티-폴리히스티딘 모노클로날 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검사하였다 (도 6).

<308> 다양한 발현된 항원의 변형체의 비교 평가는 추가의 정제 및 면역학적 평가에 사용될 수 있는 가장 유망한 후보 물질의 선택을 가능하게 해준다.

<309> 9.2 항체 생성 및 면역조직화학

<310> 소량의 상대적으로 정제된 단백질을 사용하여 면역학적 톨을 생성시킴으로써 a) 정상 또는 암 조직 절편에서 면역조직화학에 의해 발현을 검출하거나; b) 발현을 검출한 다음에 정제 과정(ELISA/웨스턴 블롯) 동안 단백질을 주시하거나; c) 정제된 단백질을 특징화/정량하였다(ELISA).

<311> 9.2.1 폴리클로날 항체:

<312> 면역화

<313> 토끼를 애주번트 3D-MPL/QS21중에 포물레이팅된 단백질 100μg을 사용하여 3주 간격으로 3회 근육내적으로(I.M.) 면역화시켰다. 각각 면역화시킨지 3주 후에 혈액 샘플을 취하고 항체 역가를 표준 프로토콜에 따라 코팅 항원으로서 상기 단백질을 사용하여 ELISA에 의해 혈청내에서 평가하였다.

<314> ELISA

<315> 96 웰 마이크로플레이트(maxisorb Nunc)를 4℃에서 밤새 단백질 5μg을 사용하여 코팅시켰다. PBS NCS 1%를 사

용하여 37℃에서 1시간 포화시킨 후에, 토끼 혈청의 연속 희석물을 37℃에서 1시간 30분 동안 첨가하였다(1/10에서 시작함). PBS 트윈중에서 3회 세척한 후에, 항-토끼 바이오티닐화된 항혈청(Amersham)을 첨가하였다(1/5000). 플레이트를 세척하고 퍼옥시다제 커플링된 스트렙타비딘(1/5000)을 37℃에서 30분 동안 첨가하였다. 세척한 후에, 50 μ l TMB(BioRad)를 7분 동안 첨가한 다음 반응을 H₂SO₄ 0.2M을 사용하여 중지시켰다. OD는 450nm에서 측정될 수 있으며 중간 희석은 SoftmaxPro에 의해 계산하였다.

<316> 9.2.2 모노클로날 항체:

<317> 면역화

<318> 5 BALB/c 마우스를 정제된 단백질 5 μ g을 사용하여 3주 간격으로 3회 면역화시켰다. 채혈을 3회 면역화 후 14일째 및 3회 면역화 후 일주일째에 수행하였다. 이 혈청을 코팅된 항원으로서 사용된 정제된 단백질상에서의 ELISA에 의해 시험하였다. 이 결과(중간점 희석>10000)에 기초하여 융합을 위해 마우스 한 마리를 선택하였다.

<319> 융합/ HAT선택

<320> 비장 세포를 PEG 40% 및 DMSO 5%를 사용하는 표준 프로토콜에 따라 SP2/0 골수종과 융합시켰다. 그런 다음, 세포를 96 웰 플레이트에 2.5 x 10⁴ 내지 2.5 x 10⁵ 세포/웰로 시딩하고 HAT 배지중에서 내성 클론을 선택하였다. 이 하이브리도마의 상층액을 특정 항체의 함량에 대해 시험하고, 포지티브인 경우, 2 사이클의 한정된 희석에 사용하였다. 스크리닝의 2 라운드 후에, 3개의 하이브리도마를 복수 생성을 위해 선택하였다.

<321> 9.2.3 면역조직화학

<322> 항체가 이용가능한 경우, 면역 염색을 정상 또는 암 조직 절편상에 수행함으로써:

<323> ◇ 정상 조직과 비교하여 암 조직에서의 본 발명의 항원의 발현의 레벨 또는

<324> ◇ 항원을 발현시키는 특정 타입의 암의 비율

<325> ◇ 그 밖의 암 타입이 또한 항원을 발현시키는 지의 여부

<326> ◇ 암 조직에서 항원을 발현시키는 세포의 비율을 결정하였다.

<327> 조직 샘플 준비

<328> 절개한 후에, 조직 샘플을 OCT 화합물중의 코르크 디스크상에 위치시키고 액체 질소(-160℃)에서 미리 과냉각시킨 이소펜탄중에서 신속하게 동결시켰다. 그런 다음 이 블록을 사용시까지 -70℃에서 보존하였다. 7 내지 10 μ m 절편을 저온유지 챔버(-20, -30℃)에서 실현(realize)시켰다.

<329> 염색

<330> 조직 절편을 실온(RT)에서 5분 동안 건조시키고, RT에서 10분 동안 아세톤중에 고정시키고, 다시 건조시키고, PBS 0.5% BSA 5% 혈청을 사용하여 포화시켰다. RT에서 30분 후에 항원 특이적인 항체를 사용하여 직접 또는 간접 염색을 수행하였다. 직접 염색은 특이성은 더 우수하지만 덜 강한 염색을 생성시키는 반면 간접 염색은 보다 강하지만 덜 특이적인 염색을 생성시킨다.

<331> 9.3 본 발명의 항원에 대한 사람 세포성 면역 반응의 분석

<332> 본 발명의 항원의 면역학적 관련성은 사람 T 세포의 시험관내 프라이밍에 의해 평가될 수 있다. 모든 T 세포 림프구 라인 및 수장 세포는 건강한 공여체(바람직하게는 HLA-A2 서브타입)의 PBMC(말초 혈액 단핵 세포)로부터 유래되었다. 또한, HLA-A2.1/Kb 트랜스제닉 마우스 모델을 사용하여 HLA-A2.1 펩티드를 스크리닝하였다.

<333> 새롭게 발견된 항원-특이적 CD8+ T 세포주를 성장시키고 매주 시험관내 자극시킴으로써 유지시켰다. 항원 또는 항원 유도된-펩티드와 반응하는 CD8+ 라인의 용해 활성 및 γ -IFN 생성을 표준 방법을 사용하여 시험하였다.

<334> CD8+ T 세포주를 성장시키기 위해 두 가지 전략을 사용하였다: 펩티드-기재 방법 및 전체 유전자-기재 방법. 두 방법 모두는 정확한 리딩 프레임의 새롭게 발견된 항원의 전장 cDNA이 적절한 운반 시스템내에 클로닝되거나 HLA 결합 펩티드의 서열을 예측하기 위해 사용될 필요가 있다.

<335> 펩티드-기재 방법

<336> 간단히, 트랜스제닉 마우스를 애즈버트처리된 HLA-A2 펩티드를 사용하여 면역화시키고, CD8+ 반응(펩티드-펄싱

된 자가 비장 세포의 효과적인 용해에 의해 정의됨)을 유도시키지 못하는 마우스가 사람 시스템에서 추가로 분석될 것이다.

<337> 사람 수장 세포(로마니(Romani) 등에 따라 배양된)를 펩티드를 사용하여 펄싱시키고 CD8+ 소팅(sorting)된 T 세포(Facs에 의해)를 자극하기 위해 사용하였다. 수 회의 매주 자극 후에, CD8+ 라인을 펩티드-펄싱된 자가 BLCL(EBV-B 형질전환된 세포주)상에서 최초로 시험하였다. 상기 펩티드의 적절한 생체내 프로세싱을 입증하기 위해, CD8+ 라인을 cDNA-트랜스펙션된 종양 세포(HLA-A2 트랜스펙션된 LnCaP, Skov3 또는 CAMA 종양 세포)상에서 시험하였다.

<338> 전체 유전자-기재 방법

<339> CD8+ T 세포주를 유전자-건(gun) 트랜스펙션된 수장 세포, 레트로바이러스에 의해 형질도입된 B7.1-트랜스펙션된 섬유아세포, 재조합 폭스 바이러스 또는 아데노바이러스 감염된 수장 세포를 사용하여 프라이밍시키고 자극시켰다. 바이러스 감염된 세포는 항원이 높은 레벨로 발현되기 때문에 항원 펩티드를 제공하는데 매우 효율적이지만 바이러스 T 세포주의 과잉-성장을 피하기 위해 단지 한번만 사용할 수 있다.

<340> 교대로 자극시킨 후에, CD8+ 라인을 상기 지시한 바와 같이 cDNA-트랜스펙션된 종양 세포상에서 시험하였다. 펩티드 특이성 및 동일성을 결정함으로써 면역학적 유효성을 확인하였다.

<341> CD4+ T-세포 반응

<342> 유사하게는, CD4+ T-세포 면역 반응을 또한 평가할 수 있다. 특정 CD4+ T-세포의 생성은 T-세포를 자극시키기 위해 재조합 정제된 단백질 또는 펩티드로 로딩된 수장 세포를 사용하여 달성되었다.

<343> 추정 에피토프 (9량체 및 10량체) 결합 HLA 대립형질:

<344> HLA 클래스 I 결합 펩티드 서열을 파커의 알고리즘(Parker's algorithm)(Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptide based on independent binding of individual peptide side-chains. J. Immunol. 152: 163 and http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) 또는 램멘시(Rammensee) 방법(참조: Rammensee, Friede, Stevanovic, MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, Immunogenetics 41, 178-228, 1995; Rammensee, Bachmann, Stevanovic: MHC ligands and peptide motifs. Landes Bioscience 1997, and <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>)에 의해 추정하였다. 그런 다음 펩티드를 HLA-A2.1/Kb 트랜스제닉 마우스 모델에서 스크리닝하였다 (Vitiello et al.).

<345> HLA 클래스 II 결합 펩티드 서열을 테피토프(Tepitope) 알고리즘을 사용하여 추정하였으며, 이 알고리즘에서 스코어 컷-오프 (score cut-off)는 6으로 셋팅되어 있었다 (Sturniolo, Hammer et al., Nature Biotechnology, 1999, 17:555-561).

<346> 하기 표는 클래스 I 및 II 추정 에피토프 서열을 수집한 것이다:

<347>

HLA-A 0201 : 10량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스(Subsequence) 잔기목록	파커의 스코어°	SEQ ID:
1	64	KLVLGFQAL	142.060	SEQ ID NO:16

<348> ° : 이러한 서브시퀀스를 함유하는 분자의 1/2 해리 시간의 추정치

<349>

HLA-A 0201 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	파커의 스코어°	SEQ ID:
1	182	ELLDFFSWL	507.976	SEQ ID NO:17
2	104	RLLAEHDAV	126.098	SEQ ID NO:18
3	64	KLVLGFQA	100.850	SEQ ID NO:19

<350> ° : 이러한 서브시퀀스를 함유하는 분자의 1/2 해리 시간의 추정치

<351>

HLA-A 24 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	파커의 스코어°	SEQ ID:
1	97	EYIRALQRL	360.000	SEQ ID NO:20

<352> ° : 이러한 서브시퀀스를 함유하는 분자의 1/2 해리 시간의 추정치

<353>

HLA-A 24 : 10량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	파커의 스코어°	SEQ ID:
1	97	EYIRALQRLL	360.000	SEQ ID NO:21

<354> ° : 이러한 서브시퀀스를 함유하는 분자의 1/2 해리 시간의 추정치

<355>

HLA-B 7 : 10량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	파커의 스코어°	SEQ ID:
1	111	AVRNALAGGL	600.000	SEQ ID NO:22

<356> ° : 이러한 서브시퀀스를 함유하는 분자의 1/2 해리 시간의 추정치

<357>

HLA-B 4403 : 10량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	파커의 스코어°	SEQ ID:
1	156	SEPGSPRSAY	360.000	SEQ ID NO:23
2	89	VETLRSAVEY	180.000	SEQ ID NO:24

<358> ° : 이러한 서브시퀀스를 함유하는 분자의 1/2 해리 시간의 추정치

<359>

HLA-DRB1*1501 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	99	IRALQRLLA	5.6	SEQ ID NO:25

<360>

HLA-DRB1*1502 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	99	IRALQRLLA	4.6	SEQ ID NO:25

<361>

HLA-DRB1*0402 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	120	LRPQAVRPS	5.4	SEQ ID NO:26

<362>

HLA-DRB1*1101 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	99	IRALQRLLA	4.8	SEQ ID NO:25

<363>

HLA-DRB1*1102 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	120	LRPQAVRPS	6.2	SEQ ID NO:26

<364>

HLA-DRB1*1104 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	99	IRALQRLLA	5.8	SEQ ID NO:25

<365>

HLA-DRB1*1106 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	99	IRALQRLLA	5.8	SEQ ID NO:25

<366>

HLA-DRB1*1301 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	120	LRPQAVRPS	6.6	SEQ ID NO:26
2	73	LRQHVPHGG	4.9	SEQ ID NO:27
3	31	LLRCSRERRR	4.4	SEQ ID NO:33

<367>

HLA-DRB1*1302 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	120	LRPQAVRPS	5.6	SEQ ID NO:26

<368>

HLA-DRB1*1304 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	120	LRPQAVRPS	6.2	SEQ ID NO:26
2	73	LRQHVPHGG	4.8	SEQ ID NO:27
3	31	LGFQALRQH	4.6	SEQ ID NO:28

<369>

HLA-DRB1*1305 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	99	IRALQRLLA	4.8	SEQ ID NO:25

<370>

HLA-DRB1*0703 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	112	VRNALAGGL	5.1	SEQ ID NO:29
2	98	YIRALQRLL	4.8	SEQ ID NO:30
3	65	LVNLGFQAL	4.5	SEQ ID NO:31

<371>

HLA-DRB5*0101 : 9량체				
순위	개시 위치	서브시퀀스 잔기목록	테피토프 스코어	SEQ ID:
1	96	VEYIRALQR	4.3	SEQ ID NO:32

<372>

서열 정보

SEQ ID NO:1

GTACCTTGCTTTGGGGGCGCACTAAGTACCTGCCGGGAGCAGGGGGCGCACCGGGAACTCGCAGATTTCGCC
AGTTGGGCGCACTGGGGATCTGTGGACTGCGTCCGGGGGATGGGCTAGGGGGACATGCGCACGCTTTGGGCC
TTACAGAATGTGATCGCGCGAGGGGGAGGGCGAAGCGTGGCGGGAGGGCGAGGCGAAGGAAGGAGGGCGTGA
GAAAGGCGACGGCGGGCGGGGAGGAGGGTTATCTATACATTTAAAAACCAGCCGCTGCGCCGCGCCTGC
GGAGACCTGGGAGAGTCCGGCCGCACGCGGGGACACGAGCGTCCCACGCTCCCTGGCGCGTACGGCCTGCC
ACCACTAGGCCTCCTATCCCCGGGCTCCAGACGACCTAGGACGCGTGCCCTGGGGAGTTGCCTGGCGGGCGCC
GTGCCAGAAGCCCCCTTGGGGCGCCACAGTTTCCCCGTCGCTCCGGTTCCTCTGCCTGCACCTTCTTGCG
GCGCGCCGGGACCTGGAGCGGGCGGGTGGATGCAGGCGCGatggacggcgcacactgcccagggtccgcgc
ccctgcgccccccgctccctgtcggtgcgctgcccggcgagacccgcgtccccggaaactgttgcgctgcag
ccggcggcgcgcagccggccaccgcagagaccggagggcgcgagcgccgtagcgcgcgcaatgagcgcgga
gcgcaaccgcgtgaagctggtgaacttgggcttccagggcgctgcggcagcacgtgccgcacggcggcgcag
caagaagctgagcaaggtggagacgctgcgctcagccgtggagtacatccgcgcgctgcagcgctgctggc
cgagcacgacgcgtgcgaacgcgctggcgggagggctgagggcgagggcgtgcggcgctctgcgccccg
cgggccgcagggaccaccccggtcgccgcctcgccctcccgcgcttcttcgtccccgggcccgcggggcag
ctcgagaccggctccccgcgttccgcctactcgtcgacgacagcggtgcgaaggcgcgctgagtcctgc
ggagcgcgagctactcgacttctccagctggttagggggctactgaGCGCCCTCGACCTATGAGCCTCAGCC
CCGGAAGCCGAGCGAGCGGCCGGCGCGCTCATCGCCGGGAGCCCGCAGGTGGACCGGCCGCGCTCCGCC
CCCAGCGAGCCGGGACCCACCCACCACCCCGCACCGCCGACGCGCCTCGTTCGTCCGGCCAGCCTGA
CCAATGCCGCGGTGGAACGGGCTTGAGCTGGCCCCATAAGGGCTGGCGGCTTCTCCGACGCCGCCCTC
CCCACAGCTTCTCGACTGCAGTGGGGCGGGGGGCACCAACTTGGAGATTTTCCGGAGGGGAGAGGATTT
TCTAAGGGCACAGAAATCCATTTTCTACACATTAACCTTGAGCTGCTGGAGGGACACTGCTGGCAAACGGAG
ACCTATTTTGTACAAAGAACCCTTGACCTGGGGCGTAATAAAGATGACCTGGACCCTGCCCCACTATCT
GGAGTTTCCATGCTGGCCAAGATCTGGACACGAGCAGTCCCTGAGGGGCGGGGTCCCTGGCGTGAGGCCCC
CGTGACAGCCCACCCTGGGGTGGGTTTGTGGGCACTGCTGCTGCTAGGGAGAAGCCTGTGTGGGGCACAC
CTCTTCAAGGGAGCGTGAACTTTATAAATAAATCAGTTCTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO:2

MDGGTLPRSAPPAPPVPVVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQA
LRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPS
RASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLDfSSWLGGY

SEQ ID NO:3

MSAPAARSASGAEAHRSRALSSPLTSWRSRVARAPQDSARLRSRCRPTSRRNAGSRAPSCPRGPGTKKGR
ARRRPGWSLAARGAQTAARPAASALPPARCARRRRARPAGAAARGCTPRLSAASPSCSASCWRRRAARAAAA
PGSPSPSPASRGCAHCAALRPLRRLRSLRWPVAAAGCSATVPGTRVSAGQSRQGRGAQGARTWAVCRRP
SRLHPPARSRRRAAGRCRQRNRRRRGKLWRPKGASGTAPPGNSPGHAS

<373>

SEQ ID NO:4

GTACCTTGCTTTGGGGGCGCACTAAGTACCTGCCGGGAGCAGGGGGCGCACCGGGAACTCGCAGATTTCGCC
 AGTTGGGCGCACTGGGGATCTGTGGACTGCGTCCGGGGGATGGGCTAGGGGGACATGCGCACGCTTTGGGCC
 TTACAGAATGTGATCGCGCCGAGGGGGAGGGCCGAAGCGTGGCGGGAGGGCGAGGCGAAGGAAGGAGGGCGT
 GAGAAAGGCGACGGCGCGCGCGGAGGAGGGTTATCTATACATTTAAAAACCAGCCGCTGCGCCGCGCCT
 GCGGAGACCTGGGAGAGTCCGGCCGCACGCGCGGGACACGAGCGTCCCACGCTCCCTGGCGCGTACGGCCTG
 CCACCCTAGGCCTCCTATCCCGGGCTCCAGACGACCTAGGACGCGTCCCTGGGGAGTTGCCTGGCGGCG
 CCGTGCCAGAAGCCCCCTTGGGGCGCCACAGTTTTCCCGTCGCTCCGTTCCCTCTGCCTGCACCTTCCTG
 CGGCGCGCGGGACCTGGAGCGGGCGGGTGGATGCAGGCGCGatggacggcggcacactgcccaggtccgcg
 cccctgcccccccgctccctgtcggtgctgctgccccggcgagaccccgctccccggaactgttgcgctgc
 agccggcgcgcgacccggccaccgcagagaccggaggcgcgacggcgctagcgcgcgcaatgagcg
 gagcgcaaccgctgaagctggtgaacttgggcttccaggcgctcgggcagcacgtgcccacggcgcgcc
 agcaagaagctgagcaaggtggagacgctgctgctcagccgtggagtacatccgcgctgacgagcctgctg
 gccgagcacgacccgtgcgcaacgctgccccggagggtgagggcgagggcgctgccccgctctgcgccc
 cgcgggcgccagggaacccccggctcgccgctcgcctcccccgcttcttcgtccccggcgcgggggc
 agctcgagccccgctcccccgcttccgcctactcgtcgagcagacagcgctgcaaggcgcgctgagtcct
 gcggagcgcgagctactcgacttctccagctggttaggggctactgaGCGCCCTCGACCTAATAAGCCTCA
 AGCCCCGGAACCCGAGCGAACGGCCGGCGCGCTTCATCGCCGGGAAGCCCGCAAGGTGGACCGGGCCC
 GCGCTCCGCCCCAGCGAGCCGGGGACCCACCCACACCCCCGACCGCCGACCGCCCTCGTTCGTCCGG
 CCCAGCCTGACCAATGCCGCGTGGAAACGGGCTTGGAGCTGGCCCCATAAGGGCTGGCGGCTTCCTCCGAC
 GCCGCCCTCCCCACAGCTTCTCGACTGCAGTGGGGCGGGGGCACCAACTTGGAGATTTTCCGGAGGG
 GAGAGGATTTCTAAGGGCACAGAAATCCATTTCTACACATTAAGTGGAGTCTGGAGGGACACTGCTG
 GCAACGGAGACCTATTTTGTACAAAGAACCTTGACCTGGGGCGTAATAAAGATGACCTGGACCCCTGCC
 CCCACTATCTGGAGTTTTCATGCTGGCCAAGATCTGGACACGAGCAGTCCCTGAGGGGCGGGGTCCCTGGC
 GTGAGGCCCCCGTGACAGCCACCCCTGGGGTGGGTTTGTGGGCACTGCTGCTCTGCTAGGGAGAAGCCTGTG
 TGGGGCACACCTCTTCAAGGGAGCGTGAACCTTATAAATAAATCAGTTCGTGTTAAAAA
 AAAACCGAGGGGGGCCCGGAGCCAACAAA

SEQ ID NO:5

GGTAAACAGAAGTGAATTTATTTATAAAGTTCACGCTCCCTTGAAGAGGTGTGCCCCACACAGGCTTCTCCC
 TAGCAGAGCAGCAGTGCACAAACCCACCCAGGGTGGGCTGTACGGGGGCTCACGCCAGGGACCCCG
 CCCCTCAGGGACTGCTCGTGTCCAGATCTTGGCCAGCATGGAAAATCCAGATAGTGGGGGACGGGTCCA
 GGTCACTCTTTATTACGCCCCAGGTCAAGGGTTCTTTGTACAAAAATAGGTCTCCGTTTGCCAGCAGTGTCC
 CTCCAGCAGCTCAAGTTAATGTGTAGAAAAATGGATTCTCTGTGCCCTTAGAAAAATCCTCTCCCTCCGGAA
 AAATCTCCAAGTGTGTGGTCCCCCGCCCCACTGCAGTCGAGAAGCTGTGGGGAGGGGCGGCGTCGGAGGA
 AGCCGCAGCCCATTTATGGGGCCAGCTCCAAGCCCGTTTCCACCGCGCATTTGGTCAGGCTGGGCGGACGAA
 CGAGGCGGCGTCGGCGGTGCGGGGGTGGTGGGTGGGTCCCCGCTCGCTGGGGGCGGAGCAGCGGGCCGG
 TCCACCTGGCGGGCTCCCC

SEQ ID NO:6

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACAGAACTGATTTATTTATAAAGTTCACGCTCCCTTGAAGAGGTGTGCCCC
 ACACAGGCTTCTCCCTAGCAGAGCAGCAGTGCCCCACAAACCCACCCAGGGTGGGCTGTACGGGGGCTCA
 CGCCAGGGACCCCGCCCTCAGGGACTGCTCGTGTCCAGATCTTGGCCAGCATGGAAACTCCAGATAGTGG
 GGGCAGGGGTCCAGGTCACTTTATTACGCCCCAGGTCAAGGGTCTTTGTACAAAATAGGTCTCCGTTTG
 CCAGCAGTGTCCCTCCAGCAGCTCAAGTTAATGTGTAGAAAATGGATTCTCTGTGCCCTTAGAAAATCCTCT
 CCCCTCCGGAATACTCCAAGTGTGGTGCCCCCGCCCACTGCAGTCGAGAAGCTGTGGGAGGGGCGG
 CGTCGGAGGAAGCCGCCAGCCCTTATGGGGCCAGCTCCAAGCCCGTTTCCACCGCGGCATTGGTCAGGCTGG
 GCCGGACGAACGAGGCGGCGTCCGGCGGTGCGGGGGTGGTGGGTGGGTCCCGGCTCGCTGGGGGCGGAGCG
 CGGGCCGGTCCACCTGGCGGGCTCCCGGGCGATGAGCGCGCCGGCCGCTCGCTCGGCTTCCGGGGCTGAGGC
 TCATAGGTCGAGGGCGCTCAGTAGCCCCCTAACCACTGGAGAAGTCGAGTAGCTCGCGCTCCGAGGACTC
 AGCGCGCTTCGCAGCGCTGTCGTCCGACGAGTAGGCGGAACGCGGGGAGCCGGGCTCCGAGCTGCCCCG
 CGGCCCGGGACGAAGAAGCGGGGAGGGCGAGGCGGACCGGGGTGGTCCCTGGCGGCCCGGGGGCGCA
 GACGGCCGACGGCCTCGCGCCTCAGCCCTCCCGCAGCGCTTGCGCACGGCGTGTGCTCGGCCAGCAGG
 CGTGCAGCGCGGGATGTACTCCACGGCTGAGCGCAGCGTCTCCACCTTGCTCAGCTTCTGTGGCGCCG
 CCGTGGCGCACGTGCTGCCGACGCGCTGGAAGCCCAAGTTCACCACTTGCTCAGCTTCTGTGGCGCCG
 TTGCGCCGCGCTACGGCGCTGCGCGCCCTCCGGTCTCTGCGGTGGCCGGTCCGCCCGCCGGCTGCAGCGC
 AACAGTTCGGGGACGCGGGTCTCCCGCGGCAGCGCAGCCGACAGGGACGGGGGCGCAGGGGGCGCGGAC
 CTGGCAGTGTGCGCGCTCCATCGCGCCTGCATCCACCGCCCGCTCCAGGTCCCGCGCGCCGAGGAAG
 GTGCAGGCAGGAACCGGAGGCGACGGGGAAACTGTGGCGCCCCAAGGGGGCTTCTGGCACGGCGCCGCC
 AGGCAACTCCCCAGGGCAGCGCTCTAGGTGCTTGAGCCCGGGGATAGGAGGCTAGTGGTGGCAGGCCG
 TACGCGCCAGGGAGCGTGGGACGCTCGTGTCCCGCGGTGCGGCCGACTCTCCAGGTCTCCGACGGCGG
 GCGCAGGCGGCTGGTTTTTAAATGTATAGATAACCCCTCCTCCGCGCGCCCGCGCTCGCCTTTCTACGCCCT
 CCTTCCTTCGCCTCGCCCTCCCGCCACGCTTCGCCCTCCCCCTCGCGCGATCACATTCTGTAAGGCCCAAAG
 CGTGCGCATGTCCCCCTAGCCCATCCCCGGACGAGTCCACAGATCCCAGTGCGCCCAACTGGCGAAATC
 TGGAGTTCCCGGTGCGCCCCCTGCTCCCGGCAGGTACTTAGTGCGCCCCCAAAGCAAGGTAC

SEQ ID NO:7

MCRKWILCALRKSSPLRKNLQVLVPPAPLQSRSCGEGRRRRKPPALMGPAPSPFPFPRHWSGWAGRTRRRRR
 CGGWVWGPRLAGGGARARSTLAGFPGDEARRPVRSGFRGLRLIRSRALSSPLTSWRSRVARAPQDSARLRS
 RCRPTSRRNAGSRAPSCPRGPGTKKRGRARRRPGWSLAARGAQTAARPAASALPPARCARRRARPAAGAAAR
 GCTPRLSAASPPCSASCWRRRAARAAAAPGSPSPASRGCAHCAALRPLRRLSLRWPVAAAGCSATVP
 GTRVSAGQSRQGRGAQGARTWAVCRRPRLHPPARSRRRAAGRCRQRNRRRRGKLWRPKGASGTAPPGN
 SPGHAS

SEQ ID NO: 8

<375>

ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGAC
CAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGC
ACcCTcGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGtGGAGCGGAttctGAAAGAAAGAA
TCCGATGAGGCACTTAAATGACCATGGACGGCGGCACACTGCCAGGTCCGCGCCCCCTGCGCCCCCGTC
CCTGTGGGCTGCGCTGCCCGCGGAGACCCGCGTCCCGGAACTGTTGCGCTGCAGCCGGCGGCGCGACCG
GCCACCGCAGAGACCGGAGCGGCGCAGCGGCCGTAGCGCGGCGCAATGAGCGCGAGCGCAACCGCGTGAAG
CTGGTGAACCTTGGGCTTCCAGGCGCTGCGGCAGCACGTGCCGCACGGCGCGCCAGCAAGAAGCTGAGCAAG
GTGGAGACGCTGCGCTCAGCCGTGGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCGCCTGCTGGCCGAGCACGACGCGCTG
CGCAACGCGCTGGCGGGAGGGCTGAGGCCGCGAGGCCGTGCGGCCGTCTGCGCCCCGCGGGCCGCCAGGGACC
ACCCCGGTGCGCGCTCGCCCTCCCGCGCTTCTTCGTCCCCGGGCGCGGGGGCAGCTCGGAGCCCGGCTCC
CCGCGTTCCGCTACTCGTCGGACGACAGCGGCTGCGAAGGCGCGCTGAGTCCTGCGGAGCGCGAGCTACTC
GACTTCTCAGCTGGTTAGGGGGCTACactagtggccaccatcaccatcaccattaa

SEQ ID NO:9

ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGA
CCAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCA
GCACCCCTCGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAA
GAATCCGATGAGGCACTTAAATGACCATGGACGGCGGCACCCCTGCCGCGTTCCGCGCCGCGGCGCGCC
AGTTCCGGTTGGCTGCGCTGCCCGTCCCGCGTCCCGGAACTGCTGCGCTGCAGCCGTGCGCGTC
GCCCCGCCACCGCAGAGACCGGAGGCGGCGCAGCGGCCGTAGCGCGCGCAATGAGCGCGAGCGCAACCGC
GTGAAGCTGTTGAACCTTGGGCTTCCAGGCGCTGCGGCAGCACGTGCCGCACGGCGGCGCCAGCAAGAAGCT
GAGCAAGGTGGAGACGCTGCGCTCAGCCGTGGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCGCCTGCTGGCCGAGCACG
ACGCGCTGCGCAACGCGCTGGCGGGAGGGCTGAGGCCGCGAGGCCGTGCGGCCGTCTGCGCCCCGCGGGCGG
CCAGGGACCAACCCCGTCCCGCTCGCCCTCCCGCGCTTCTTCGTCCCCGGGCGCGGGGGCAGCTCGGA
GCCCGGCTCCCGCGTTCCGCTACTCGTCGGACGACAGCGGCTGCGAAGGCGCGCTGAGTCCTGCGGAGC
GCGAGCTACTCGACTTCTCAGCTGGTTAGGGGGCTACACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA

SEQ ID NO:10

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVDQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE
SDEALKMTMDGGTLPASAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVK
LVNLGFQALRQHVPHGASKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGT
TPVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDSDGCEGALSPAERELDFSSWLGGYTSQHNNNNH

SEQ ID NO:11

MYSTAERSVSTLLSFLAPPCTCCRSAPKPKFTSFTLRSLRRLRATAAAPPVSAVAGRRRLQRNSSG
DAGLRRAAQPTGTGGAGGADLGSVPPSIAPASTRPLQVPARRRKVQAEPEATGKTVA PQGGFWHGAARQL
PRARVLGRLEPGDRRPSGGRPYAPGSVGRSCPARAAGLSQVSAGAAQAAGF

SEQ ID NO:12

MEAHLDWYGVPGLEASDACPRESCSSALPEAREGANVHFPPHPVPREHFSCAAPELVAGAQLNASLMDG
GALPRLMPTSSGVAGACAARRRQASPELLRCSRRRRSGATEASSSSAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALR
QHVPHGGANKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRAALAGLLTPATPPSDECAQPSASPASASLSC
ASTSPSPDRLGCSEPTSPRSAYSSEESSCEGELSPMEQELLDFFSSWLGGY

SEQ ID NO:13

GCCCGGAGCATGGAAGCACGTGAGCTAGGCCATGAACTGCACCCGGGAGGGGTGGGGGTGGAAGCGCACGG
TGTCAGCTTTGCAGAATGTGTACACCAAGGGGAGGGCGAGGCGAAGGAAGGAGGGCGTAAGAAAGGAGGCG
GTGGCGGGGCGGAGGAGATTATCTATACTTTTAAAAAAAGGAGCCTCTTAGCCGCGTAAAGGAGACTTG
GGGAGCGCTGACAGCACGCGCGGGACACGAGAGTACCACGCTTCCCTACTCTTTTCAGACCTTGACTGGT
ACGGGGTCCCAGGACTGCAGGAGGCCAGCGACGCGTGCCTAGGGAGTCCGTCAGCAGTGCCCTGCCTGAG
GCCCCGTGAAGGTGCAACCGTCCACTTCCCACCGCACCCGGTTCCTCGCGAGCACTTTTCTGTGCCGACCC
AGAAGCTCGTAGCAGGGGCCCAGGGGGTGAATGCAAGCTTGATGGACGGCGGCGCGCTGCCAGACTCATGC
CCACCTCGTCTGGAGTGCCTGGAGCCTGCGCTGCTCGGCGGAGACAAGCGTCTCCGGAATTGCTGCGCTGC
AGCCGGCGGGCGGATCTGGAGCAACCGAGGCCAGCAGCAGCTCGGCGTCCGTGGCACGCCGCAATGAGCG
CGAGCGCAACCGCGTAAAGCTGGTAACTTGGGCTTCCAGGCGTGCAGGAGCAGCTGCCGACGGCGGGCG
CCAACAAGAAGCTGAGTAAAGTGGAGACGCTGCGCTCCGCGGTAGAGTACATTGCTGCGCTGCAGCGGCTG
CTCGCAGAGCACGACACGGTGGCGCCGGNGCTCGCTGGGGGGCTGTTAACACCCGCTACTCCGCCGTCCGA
TGAGTGACGACGACCCCTCTGCTCCCCCTGCCAGCGGGTCTCTGTCTGCGCCTCTACGTCTCCGTCCCGGA
CCCTGGGCTGCTCTGAGCCTACCTCCCCGCGCTCCGCTACTCGTCGGAGGAAAGCAGCTGCGAGGGGAGAG
CTAAGCCCCGATGGAGCAGGAGCTGCTTGACTTTTCCAGTTGGTTAGGGGGCTACTGA

SEQ ID NO:14

MESHFNWYGVPRQLQKASDACPRESCSSALPEAREGANVHFPPHPVPREHFSGAPKPVAGAPALNASLMDG
GALPRLVPTSSGVAGACTARRRPSPPELLRCSRRRRSGATEASSSSAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALR
QHVPHGGANKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRAALSGLLTPATRPDVCTQPSASPASASLSC
TSTSPDRLGCSEPASPRAYSSEDSSCEGETYPMQMFDFFSNWLGGY

SEQ ID NO:15

TTCACCCGGCTGCAAGCGCTAGGTGTACGGAGACCTGGCAGCTCTTGGGGCTTAAGGACTGAGCRCCAGAG
CCGGTGGAGGTTCTGTGGAGTACATTCCGACCCCTCTCACAGCCCCGAGAGTGCGGGACGTGCGGAGCGC
AGTTCCGGGATCTGCACTCGAGGACTTGTGAGGACGCATTAAAGCTAAGCATCTGCTCGGAGCATGGAATCG
CACTTTAACTGGTACGGGGTCCCAAGGCTCCAGAAGGCTAGCGACGCGTGCCCTAGGGAATCCTGCAGCAG
TGCCCTGCTGAGGCCCGTGAAGGTGCGAACGTCCACTTCCCACCGCACCCGGTTCCTCGCGAGCACTTTT
CCTGTGGCGCACCGAAACCCGTAGCGGGGGCCCCGGCGCTGAATGCAAGCTTGATGGACGGCGGGCGGCTG
CCCAGACTCGTGCCACCTCGTCTGGAGTGCCTGAGCCTGCACTGCTCGGCGGAGACCCCGTCCCCGGA

ACTGCTTCGCTGCAGCCGACGGCGGCGATCGGGAGCAACCGAGGCCAGCAGCAGCTCGGCGGCCGTGGCAC
 GCCGCAATGAGCGTGAGCGCAACCGCGTAAAGCTGGTAACTTGGGCTTCCAGGCGCTGCGGCAGCACGTG
 CCGCACGGCGGCGCCAACAAGAAGCTGAGTAAGGTGGAGACGCTGCGCTCCGCGGTAGAGTACATCCGTGC
 GTGTCAGCGGCTGCTAGCAGAGCACGACGCGGTGCGTGTGCGCTCTCTGGGGGTCTATTAAACACCCGCTA
 CTCGGCCGTCCGATGTGTGCACGCAGCCCTCCGCCTCCCCTGCCAGCGCGTCTCTGTCTGCACCTCTACA
 TCCCCAGACCGCCTAGGCTGCTCCGAGCCTGCCTCTCCGCGCTCCGCCTACTCGTCGGAGGACAGCAGCTG
 CGAGGGAGAGACTTACCCGATGGGGCAGATGTTTGACTTTTCCAATTGGTTAGGGGGCTACTGAGCACCCC
 ACACCCCTAAGCTGCGTCCCTGGGTGTCCCCTGGTGGACCTACCTGCGTTTCTTGCCAGGAAACCTGGGC
 CCAATGCCTTACCCATGCTGTCTAGTGACGCTGACCAAATGCCAAGTACTGACCTCTGCTCGGCCTCCACG
 CCGCGGAATGACATCTTCCATCTCCCAGTCTTGCCGAACCAGGACTTGAAAATTCTCAGGAGAAAGAAT
 TTTACAATGACAATCTGCTTTTATCAATTAACCTGAACTGCTGGAGGACTCTGCTGAAAATATGAAGAAT
 TATTTTTATACAAAGGATCCTTAAGCTTGGAGCACAATAAAGATGACCTCTGTCTCTCACCCCCACTGTCT
 AGAACTTTCCAACCTGGCCAAAGTGTGGACGGGTGCGGCCCTGAGGGCAAGATGCCTGGCTGCACCCCTTCT
 TCCTCTTCCGAAGCCTATCCTGACGCTGATGTTTGCCAGTGTGGGAACCCTGCTATTGCAAAGTGACTA
 TTCTATAAAAGTTGTTTTTCATTGGAAAGGAATTC

SEQ ID NO:16

KLVNIGFQAL

SEQ ID NO:17

ELLDFSSWL

SEQ ID NO:18

RLLAEHDAV

SEQ ID NO:19

KLVNIGFQA

SEQ ID NO:20

EYIRALQRL

SEQ ID NO:21

EYIRALQRLL

SEQ ID NO:22

AVRNALAGGL

SEQ ID NO:23

SEPGSPRSAY

SEQ ID NO:24

VETLRSAYEY

SEQ ID NO:25

IRALQRLLA

SEQ ID NO:26

LRPQAVRPS

SEQ ID NO:27

LRQHVPHGG

SEQ ID NO:28

LGFQALRQH

SEQ ID NO:29

VRNALAGGL

SEQ ID NO:30

YIRALQRL

SEQ ID NO:31

LVNLGFQAL

SEQ ID NO:32

VEYIRALQR

SEQ ID NO:33

LLRCSRERR

<379>

도면의 간단한 설명

<201>

도 1은 태깅(Tagman) 프로브를 사용한 실시간 PCR을 도시한다. 범례는 다음과 같다: 부신: Ad_G1; 방광: B1; 골수: Bo_Ma; 경부: Ce; 결장: Co; 난관: Fa_Tu; 일레온(Ileum): Il; 간: Li; 폐: Lu; 림프절: Ly_No; 식도: Oe; 부갑상선: Pa_Thy; 태반: Pl; 전립선: Pr; 직장: Re; 피부: Sk; 골격근: Sk_Mu; 소장: Sm_In; 비장: Sp; 고환: Te; 갑상선: Thy; 기관(Trachea): Tr.

<202>

도 2는 Sybr 프로토콜을 사용한 실시간 PCR 발현을 도시한다. 범례는 다음과 같다: 부신: Ad_G1; 방광: B1; 골수: Bo_Ma; 경부: Ce; 결장: Co; 림프절: Ly_No; 식도: Oe; 부갑상선: Pa_Thy; 태반: Pl; 전립선: Pr; 직장: Re; 피부: Sk; 골격근: Sk_Mu; 소장: Sm_In; 비장: Sp; 고환: Te; 갑상선: Thy; 기관(Trachea): Tr; 심장: He.

<203>

도 3은 CASB7439를 발현하는 스트레인(strain)으로부터의 세포 추출물의 쿠마시 블루 염색된 SDS PAGE를 도시한다. 레인 1은 분자량 마커이고, 레인 2는 39°C에서 5시간 유도된 세포 추출물이고; 레인 3은 유도된 세포 추출물의 상층액을 도시하고; 레인 4는 유도된 세포 추출물의 펠레트를 도시한다.

<204>

도 4는 NS1-CASB7439 발현된 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 겔을 CASB7439를 발현하는 스트레인으로부터의 세포 추출물로 로딩하고, 안티-NS1 모노클로날 항체로 검출하였다.

<205>

도 5는 정제 후 CASB7439의 쿠마시 블루 염색된 SDS-PAGE를 도시한다. 레인 1과 5는 분자량 마커이고; 레인 2,

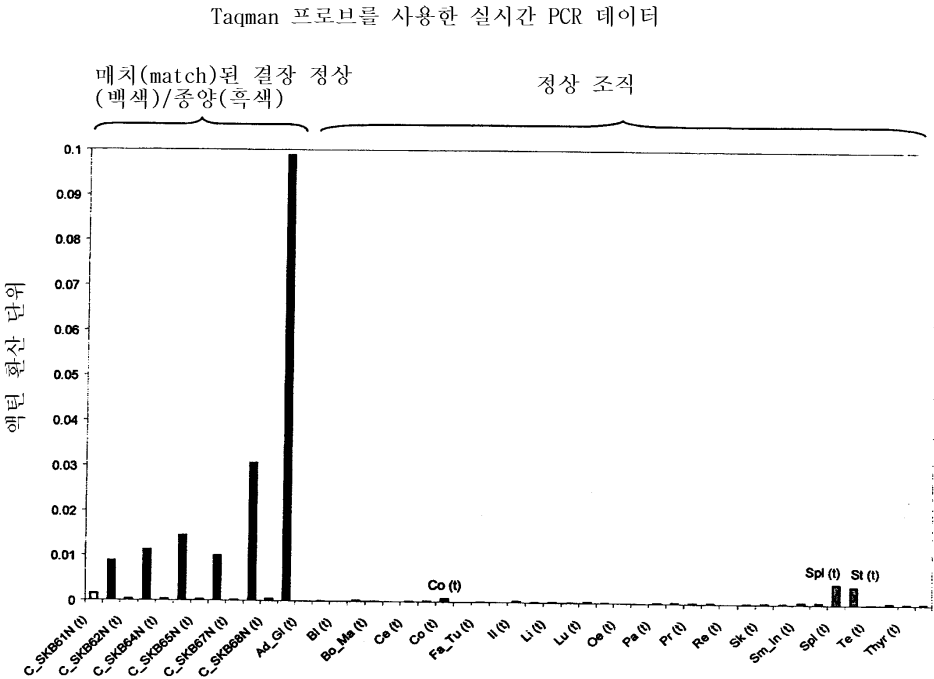
3, 4는 각각 2 μ l, 4 μ l 및 6 μ l의 정제된 단백질로 로딩된다.

<206>

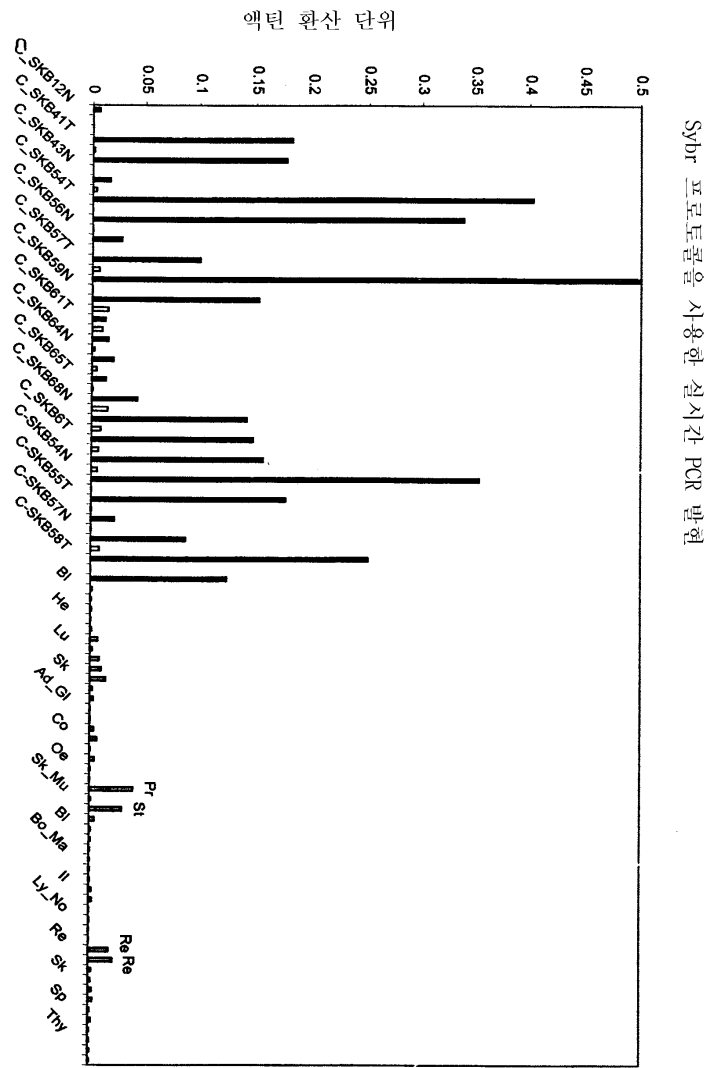
도 6은 안티-폴리히스티딘 모노클로날 항체에 의해 검출된 정제 후의 웨스턴 블롯 CASB7439를 도시한다.

도면

도면1

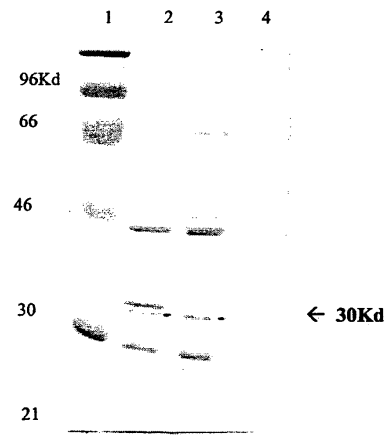


도면2



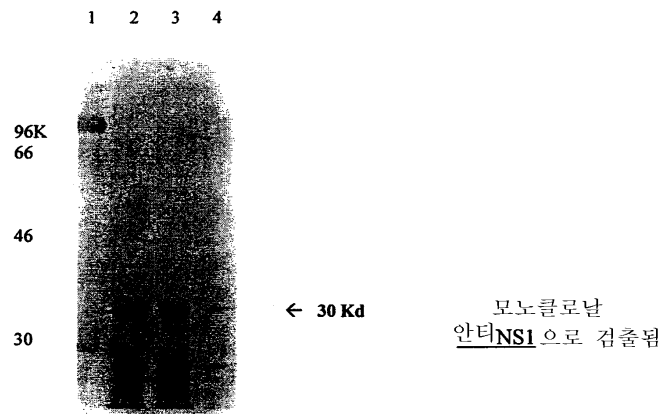
도면3

CASB7439를 발현하는 스트레인으로부터의 세포 추출물의
쿠마시 블루 염색된 SDS PAGE



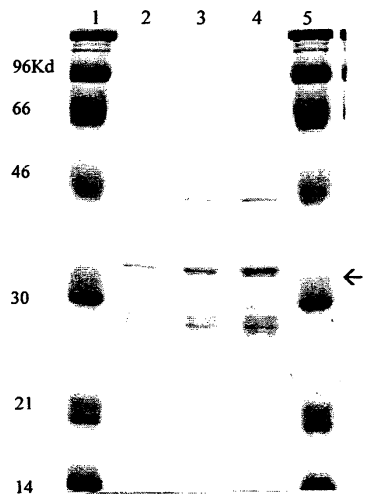
도면4

CASB7439를 발현하는 스트레인으로부터의 세포 추출물로
로딩된 웨스턴 블롯



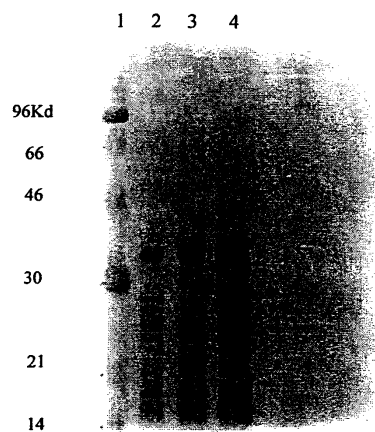
도면5

정제후 CASB7439의 쿠마시 블루 염색된 SDS-PAGE



도면6

정제후 웨스턴 블롯 CASB7439 (모노클로날 안티-폴리히스티딘)



서열 목록

SEQUENCE LISTING
 <110> SmithKline Beecham Biologicals s.a.
 <120> Novel Compounds
 <130> BC45300
 <160> 32
 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0
 <210> 1
 <211> 1791
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 1
 gtaccttget ttggggggcg actaagtacc tgccgggagc agggggcgca ccgggaactc 60
 gcagatttcg ccagttgggc gcaactggga tctgtggact gcgtccgggg gatgggctag 120
 ggggacatgc gcacgctttg ggccttacag aatgtgatcg cgcgaggggg agggcgaagc 180

 gtggcgggag ggcgaggcga aggaaggagg gcgtgagaaa ggcgacggcg gcggcgcgga 240
 ggagggttat ctatacattt aaaaaccagc cgcctgcgcc gcgcctgcgg agacctggga 300
 gagtccggcc gcacgcggcg gacacgagcg tcccacgctc cctggcgctg acggcctgcc 360
 accactaggc ctctatccc cgggctccag acgacctagg acgctgccc tggggagtgg 420
 cctggcggcg ccgtgccaga agcccccctg gggcgccaca gttttcccg tcgcctccgg 480
 ttctctgcc tgcaccttc tgcggcgcg cgggacctgg agcggggggg tggatgcagg 540
 cgcatggac ggcggcacac tgcccaggtc cgcgcccct gcgcccccg
 tcctgtcgg 600
 ctgcgtgcc cggcgagac ccgcgtccc ggaactgtt gcgtgcagcc ggcggcgcg 660
 accggccacc gcagagaccg gaggcgcg cgcggcgta gcggcgca atgagcgca 720
 gcgcaaccgc gtgaagctgg tgaacttggg ctccaggcg ctgcggcagc acgtgccga 780
 cggcggcgcc agcaagaagc tgagcaaggt ggagacgct gcctcagccg tggagtacat 840
 ccgcgcgtg cagcgctgc tggccgagca cgacccgtg cgcaacgcg tggcgggagg 900
 gctgaggccg caggccgtgc ggccgtctgc gcccccggg ccgccaggga ccaccccggt 960
 cgccgctcg cctcccgcg cttcttcgtc
 cccggcgcg gggggcagct cggagccgg 1020
 ctcccgcgt tccgctact cgtcggacga cagcgctgc gaaggcgcg tgagtctgc 1080
 ggagcgcgag ctactcact tctccagctg gtagggggc tactgagcg cctcgacct 1140
 tgagcctcag ccccggaagc cgagcgagcg gccggcgcg tcatcgccg ggagcccgcc 1200
 aggtggaccg gcccgcgctc cgcggcgagc gagccgggga cccaccacc acccccgca 1260
 ccgcgacgc cgctcgttc gtccggccca gcctgacaa tgcccggtg gaaacgggct 1320
 tggagctggc ccataaggg ctggcggtt cctccgacgc cgcctccc cacagttct 1380
 cgactgcagt
 gggcggggg gcaccaacac ttggagattt ttccggagg gagaggattt 1440
 tctaaggga cagagaatcc attttctaca cattaactg agctgctga gggacactgc 1500
 tggcaaacg agacctattt ttgtacaaag aaccttgac ctggggcgta ataaagatga 1560
 cctggacccc tgccccact atctggagt ttccatgctg gccaagatct ggacacgagc 1620
 agtccctgag gggcggggtc cctggcgtga ggccccgtg acagccacc ctggggtggg 1680
 tttgtgggca ctgctgctc gctagggaga agcctgtgtg gggcacacct cttcaaggga 1740
 gcgtgaactt tataaataaa tcagtctgt ttaaaaaaa aaaaaaaaa a 1791

<210> 2

<211> 193

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

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

Arg Pro Ser
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser
 130 135 140
 Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser
 145 150 155 160
 Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu
 165 170 175
 Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly

 180 185 190
 Tyr
 <210> 3
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 3
 Met Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ser Ala Ser Gly Ala Glu Ala His Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg Ala Leu Ser Ser Pro Leu Thr Ser Trp Arg Ser Arg Val Ala
 20 25 30
 Arg Ala Pro Gln Asp Ser Ala Arg Leu Arg Ser Arg Cys Arg Pro Thr
 35 40 45

 Ser Arg Arg Asn Ala Gly Ser Arg Ala Pro Ser Cys Pro Arg Gly Pro
 50 55 60
 Gly Thr Lys Lys Arg Gly Arg Ala Arg Arg Arg Pro Gly Trp Ser Leu
 65 70 75 80
 Ala Ala Arg Gly Ala Gln Thr Ala Ala Arg Pro Ala Ala Ser Ala Leu
 85 90 95
 Pro Pro Ala Arg Cys Ala Arg Arg Arg Ala Arg Pro Ala Gly Ala Ala
 100 105 110
 Ala Arg
 Gly Cys Thr Pro Arg Leu Ser Ala Ala Ser Pro Pro Cys Ser
 115 120 125
 Ala Ser Cys Trp Arg Arg Arg Ala Ala Arg Ala Ala Ala Pro Gly
 130 135 140
 Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Arg Gly Cys Ala Arg Ala His Cys Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Arg Pro Leu Arg Arg Leu Arg Ser Leu Arg Trp Pro Val Ala
 165 170 175
 Ala Ala Gly Cys Ser
 Ala Thr Val Pro Gly Thr Arg Val Ser Ala Gly
 180 185 190
 Gln Arg Ser Arg Gln Gly Arg Gly Ala Gln Gly Ala Arg Thr Trp Ala
 195 200 205
 Val Cys Arg Arg Pro Ser Arg Leu His Pro Pro Ala Arg Ser Arg Ser
 210 215 220
 Arg Arg Ala Ala Gly Arg Cys Arg Gln Arg Asn Arg Arg Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Lys Leu Trp Arg Pro Lys Gly Ala Ser
 Gly Thr Ala Pro Pro Gly Asn
 245 250 255
 Ser Pro Gly His Ala Ser
 260
 <210> 4
 <211> 1830

<212> DNA
 <213> Human
 <400> 4

gtaccttgcgt ttggggggcgc actaagtacc tgccggggagc aggggggcgca ccgggaactc 60
 gcagatttcg ccagttgggc gcaactgggga tctgtggact gcgtccgggg gatgggctag 120
 ggggacatgc gcacgctttg ggccttacag aatgtgatcg cggcgagggg gagggccgaa 180
 gcgtggcggg agggcgaggc gaaggaagga gggcgtgaga aaggcgacgg

cggcggcgcg 240
 gaggagggtt atctatacat ttaaaaacca gccgcctgcg ccgcgcctgc ggagacctgg 300
 gagagtccgg ccgcacgcgc gggacacgag cgtccacgc tccctggcgc gtacggcctg 360
 ccaccactag gcctctatc cccgggctcc agacgaccta ggacgcgtgc cctggggagt 420
 tgcttggcgg cgccgtgcca gaagccccct tggggcgcca cagttttccc cgtcgcctcc 480
 ggttctcttg cctgcacctt cctcgggcgc gccgggacct ggagcgggcg ggtggatgca 540
 ggcgcgatgg acggcggcac actgcccagg tccgcgcccc ctgcgcccc cgtccctgtc 600
 ggctgcgctg cccggcggag acccgctcc

ccggaactgt tgcgtgcag ccggcggcgg 660
 cgaccggcca ccgcagagac cggaggcggc gcagcggccg tagcgcggcg caatgagcgc 720
 gagcgcaacc gcgtgaagct ggtgaacttg ggcttccagg cgtcgcggca gcacgtgccg 780
 cagggcggcg ccagcaagaa gctgagcaag gtggagacgc tgcgtcagc cgtggagtac 840
 atccgcgcgc tgcagcgct gctggccgag cagcagcgc tgcgcaacgc gctggcggga 900
 gggctgaggc cgcagggcgt cggccgctt gcgccccgcg ggccgccagg gaccaccccg 960
 gtgcgcgct cgccctcccg cgtttcttcg tccccgggc gcgggggcag ctccgagccc 1020
 ggctccccgc

gttccgcta ctgcctggac gacagcggct gcgaaggcgc gctgagtcct 1080
 gcggagcgc agctactcga cttctccagc tggtagggg gctactgagc gccctcgacc 1140
 taataagcct caagccccgg aaaccgcagc gaacgggccc gcgcgcttca tcgccgggga 1200
 agcccgccaa ggtggaccgg gcccgcgctc gccccccagc gagccgggga cccaccacc 1260
 accccccga ccgcgcagc cgctcgttc gtccggccca gcccgacca tgcgcgggtg 1320
 gaaacgggct tggagctggc ccataagggt ctggcggctt cctccgacgc cgccctccc 1380
 cacagcttct cgactgcagt ggggcggggg gcaccaacac ttggagattt ttccggaggg

1440
 gagaggattt tctaaggga cagagaatcc attttctaca cattaacttg agctgctgga 1500
 gggacactgc tggcaaacgg agacctattt ttgtacaaag aacccttgac ctggggcgta 1560
 ataaagatga cctggacccc tgccccact atctggagtt ttccatgctg gccagatct 1620
 ggacacgagc agtccctgag gggcggggtc cctggcgtga ggccccctg acagcccacc 1680
 ctggggtggg ttgtgggca ctgctgctt gctagggaga agcctgtgtg gggcacacct 1740
 cttcaaggga gcgtgaactt tataaataaa tcagttctgt ttaaaaaaa aaaaaaaaa 1800
 aaaaccgagg gggggcccg agccaacaaa 1830

<210> 5
 <211> 587
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 5

ggtaaacaga actgatttat ttataaagt cagctccct tgaagaggtg tgccccacac 60
 aggttctcc ctgacagagc agcagtgcc acaaacccac ccagggtgg gctgtcacgg 120
 gggcctcacg ccagggaccc cgccctcag ggactgctc tgtccagatc ttggccagca 180
 tggaaaactc cagatagtgg gggcagggtt ccaggtcatc ttattacgc cccaggtcaa 240
 gggttctttg tacaaaaata ggtctccgtt tgccagcagt gtccctccag cagctcaagt 300
 taatgtgtag aaatggatt ctctgtgccc ttagaaaatc

ctctccctc cgaaaaatc 360
 tccaagtgtt ggtgcccccc gccccactgc agtcgagaag ctgtggggag gggcggcgtc 420
 ggaggaagcc gcagccatt atggggccag ctccaagccc gtttccaccg cggcatttgt 480
 caggctgggc ggacgaacga ggcggcgtc gcggtcggg ggttgtggg tgggtccccg 540
 gctcgtggg ggcggagcag cgggccgtc cacctggcgg gctcccc 587

<210> 6
 <211> 1791

<212> DNA
 <213> Human
 <400> 6

tttttttttt ttttttttta aacagaactg atttatattat aaagttcacg ctcccttgaa 60
 gaggtgtgcc

ccacacaggc ttctccctag cagagcagca gtgcccacaa acccacccca 120
 ggggtgggctg tcacgggggc ctcacgccag ggaccccgcc cctcaggagc tgctcgtgtc 180
 cagatcttgg ccagcatgga aaactccaga tagtgggggc aggggtccag gtcatcttta 240
 ttacgcccc ggtcaagggt tctttgtaca aaaataggtc tccgtttgcc agcagtgtcc 300
 ctccagcagc tcaagttaat gtgtagaaaa tggattctct gtgcccttag aaaatcctct 360
 cccctccgga aaaatctcca agtgttgggt ccccccggcc cactgcagtc gagaagctgt 420
 ggggaggggc ggcgtcggag gaagccgcca gcccttatgg ggccagctcc aagcccggtt

480
 ccaccgcggc attggtcagg ctgggccgga cgaacgaggc ggcgtcggcg gtgcgggggg 540
 tgggtgggtg gtccccggct cgctgggggc ggagcgcggg ccggtccacc tggcgggctc 600
 cccgcgatg agcgcgccg ccgctcgtc ggcttccggg gctgaggctc ataggtcgag 660
 ggcgctcagt agccccctaa ccagctggag aagtcgagta gctcgcgtc cgcaggactc 720
 agcgcgcctt cgcagccgct gtcgtccgac gagtaggcgg aacgcgggga gccgggctcc 780
 gagtgcctcc cgcggcccg ggacgaagaa gcgcgggagg gcgaggcggc gaccggggtg 840
 gtccctggcg gcccgcgggg cgcagacggc cgcacggcct

ggcgctcag cctccccgc 900
 agcgcgttg gcacggcgct gtgctcggcc agcaggcgct gcagcgcgcg gatgtactcc 960
 acggctgagc gcagcgtct cactttgtc agcttcttg tggcgccgcc gtgcggcacg 1020
 tgctgccga gcgcctggaa gcccaagtc accagttca cgcggttgcg ctgcgctca 1080
 ttgcgccgc ctacggccgc tgcgccgct ccggtctctg cggtagcccg tgcgcccg 1140
 cggctgcagc gcaacagttc cggggacgcg ggtctccgcc gggcagcgca gccacaggg 1200
 acggggggcg cagggggcgc ggacctgggc agtgtgccgc cgtccatcgc gcctgcattc 1260
 acccgccgc tccaggtccc

ggcgcgccgc aggaaggtgc aggcagagga accggaggcg 1320
 acggggaaaa ctgtggcgcc ccaagggggc ttctggcacg gcgcgccag gcaactcccc 1380
 agggcacgcg tcttaggtcg tctggagccc ggggatagga ggcctagtgg tggcaggccg 1440
 tacgcgccag ggagcgtggg acgctcgtg ccgcgcgtg cggccggact ctcccaggtc 1500
 tccgaggcg cggcgaggc ggctggttt taaatgtata gataaccctc ctccgcgcg 1560
 ccgcgctgc ctcttcacg cctccttcc ttcgctcgc cctcccgcca cgcttcgccc 1620
 tcccctcgc gcgatcacat tctgtaaggc ccaaagcgtg cgcattgcc ctagcccat 1680

ccccggagc cagtcacag atccccagt gcgccaaactg gcgaaatctg cgagttcccg 1740
 gtgcgcccc tgctccggc aggtacttag tgcgccccca aagcaaggta c 1791

<210> 7
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 7

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

Glu Gly Arg Arg Arg Arg Lys Pro Pro Ala Leu Met Gly
 35 40 45
 Pro Ala Pro Ser Pro Phe Pro Pro Arg His Trp Ser Gly Trp Ala Gly
 50 55 60
 Arg Thr Arg Arg Arg Arg Cys Gly Gly Trp Trp Val Gly Pro Arg
 65 70 75 80
 Leu Ala Gly Gly Gly Ala Arg Ala Arg Ser Thr Leu Ala Gly Phe Pro
 85 90 95
 Gly Asp Glu Ala Arg Arg Pro

Val Arg Ser Gly Phe Arg Gly Leu Arg
100 105 110
Leu Ile Arg Ser Arg Ala Leu Ser Ser Pro Leu Thr Ser Trp Arg Ser
115 120 125
Arg Val Ala Arg Ala Pro Gln Asp Ser Ala Arg Leu Arg Ser Arg Cys
130 135 140
Arg Pro Thr Ser Arg Arg Asn Ala Gly Ser Arg Ala Pro Ser Cys Pro
145 150 155 160
Arg Gly Pro Gly Thr Lys Lys Arg Gly Arg Ala
Arg Arg Arg Pro Gly
165 170 175
Trp Ser Leu Ala Ala Arg Gly Ala Gln Thr Ala Ala Arg Pro Ala Ala
180 185 190
Ser Ala Leu Pro Pro Ala Arg Cys Ala Arg Arg Arg Ala Arg Pro Ala
195 200 205
Gly Ala Ala Ala Arg Gly Cys Thr Pro Arg Leu Ser Ala Ala Ser Pro
210 215 220
Pro Cys Ser Ala Ser Cys Trp Arg Arg Arg Ala Ala Arg Ala Ala Ala
225 230 235 240
Ala Pro Gly Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Arg Gly Cys Ala Arg Ala
245 250 255
His Cys Ala Ala Leu Arg Pro Leu Arg Arg Leu Arg Ser Leu Arg Trp
260 265 270
Pro Val Ala Ala Ala Gly Cys Ser Ala Thr Val Pro Gly Thr Arg Val
275 280 285
Ser Ala Gly Gln Arg Ser Arg Gln Gly Arg Gly Ala Gln Gly Ala Arg
290
295 300
Thr Trp Ala Val Cys Arg Arg Pro Ser Arg Leu His Pro Pro Ala Arg
305 310 315 320
Ser Arg Ser Arg Arg Ala Ala Gly Arg Cys Arg Gln Arg Asn Arg Arg
325 330 335
Arg Arg Gly Lys Leu Trp Arg Pro Lys Gly Ala Ser Gly Thr Ala Pro
340 345 350
Pro Gly Asn Ser Pro Gly His Ala Ser
355 360

<210> 8

<211> 849

<212> DNA

<213> Influenza virus & human

<400> 8

atggatccaa acactgtgtc aagctttcag gtagattgct ttctttggca tgtccgcaaa 60
cgagtgcag accaagaact aggtgatgcc ccattccttg atcggttcg ccgagatcag 120
aaatccctaa gaggaagggg cagcacctc ggtctggaca tcgagacagc cacacgtgct 180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctgaaa gaagaatccg atgaggcact taaaatgacc 240
atggacggcg gcacactgcc caggtccgcg cccctgcgc ccccgctccc tgtcggctgc 300
gctgcccggc ggagaccgc gtecccgga
ctgttgctgc gtagccggcg gcggcgaccg 360
gccaccgcag agaccggagg cggcgacgc gccgtagcgc ggcgcaatga gcgcgagcgc 420
aaccgcgtga agctggtgaa cttgggcttc caggcgctgc ggcagcacgt gccgcacggc 480
ggcgccagca agaagctgag caaggtggag acgctgcgct cagccgtgga gtacatccgc 540
gcgtgcagc gcctgtggc cgagcacgac gccgtgcgca acgcgtggc gggagggtgc 600
aggccgcagg ccgtgcggcc gtctgcgccc cgcgggccc cagggaccac cccggtcgcc 660
gcctgcctt cccgcgttc ttgtccccg ggccgcgggg gcagctcgga gcccggctcc 720
ccgcgttcg

cctactcgtc ggacgacagc ggctgcgaag gcgcgctgag tcttcggag 780
cgcgagctac tcgacttctc cagctggta gggggctaca ctagtggcca ccatcaccat 840
caccattaa 849
<210> 9
<211> 849
<212> DNA
<213> Influenza virus & human
<400> 9
atggatccaa acactgtgtc aagctttcag gtagattgct ttctttggca tgtccgcaaa 60
cgagttgcag accaagaact aggtgatgcc ccattccttg atcggcttcg ccgagatcag 120
aaatccctaa gaggaagggg cagcacctc
ggctctggaca tcgagacagc cacacgtgct 180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctgaaa gaagaatccg atgaggcact taaaatgacc 240
atggacggcg gcacctgcc gcgttcgcg ccgccggcg cgccagttcc gggtggctgc 300
gtgcccgtc gccgtccgc gtcgccgaa ctgctgcgct gcagccgtcg ccgtcgccg 360
gccaccgcag agaccggagg cggcgacgc gccgtagcgc ggcgcaatga gcgcgagcgc 420
aaccgcgtga agctgtgaa cttgggttc caggcgtgc ggcagcacgt gccgcacggc 480
ggcgccagca agaagctgag caaggtggag acgtgcgct cagccgtgga gtacatccg 540
gcgtgcgac
gcctgtggc cgagcacgac gccgtgcga acgcgtggc gggagggtg 600
aggccgcagg ccgtgcggc gtctgcgcc cgccggcg caggaccac cccggtcgc 660
gcctgcct cccgcgttc ttctcccg ggccgggg gcagctcgga gcccgtc 720
ccgcttcg cctactcgtc ggacgacagc ggctgcgaag gcgcgctgag tcttcggag 780
cgcgagctac tcgacttctc cagctggta gggggctaca ctagtggcca ccatcaccat 840
caccattaa 849
<210> 10
<211> 282
<212> PRT
<213> Influenza virus & human
<400> 10
Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1 5 10 15
His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
20 25 30
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
50 55
60
Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val
85 90 95
Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu
100 105 110
Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly
115 120 125
Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys
130 135 140
Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly
145 150 155 160
Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val
165 170 175
Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val
180 185 190

Arg

Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser
210 215 220

Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser
225 230 235 240

Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu
245 250 255

Ser Pro Ala Glu

Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly
260 265 270

Tyr Thr Ser Gly His His His His His His
275 280

<210> 11
<211> 193
<212> PRT
<213> Human
<400> 11

Met Tyr Ser Thr Ala Glu Arg Ser Val Ser Thr Leu Leu Ser Phe Leu
1 5 10 15

Leu Ala Pro Pro Cys Gly Thr Cys Cys Arg Ser Ala Trp Lys Pro Lys
20 25

30

Phe Thr Ser Phe Thr Arg Leu Arg Ser Arg Ser Leu Arg Arg Ala Thr
35 40 45

Ala Ala Ala Pro Pro Pro Val Ser Ala Val Ala Gly Arg Arg Arg Arg
50 55 60

Leu Gln Arg Asn Ser Ser Gly Asp Ala Gly Leu Arg Arg Ala Ala Gln
65 70 75 80

Pro Thr Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Leu Gly Ser Val Pro
85 90 95

Pro Ser Ile Ala Pro Ala Ser Thr Arg Pro Leu Gln Val Pro Ala Arg
100 105 110

Arg Arg Lys Val Gln Ala Glu Glu Pro Glu Ala Thr Gly Lys Thr Val
115 120 125

Ala Pro Gln Gly Gly Phe Trp His Gly Ala Ala Arg Gln Leu Pro Arg
130 135 140

Ala Arg Val Leu Gly Arg Leu Glu Pro Gly Asp Arg Arg Pro Ser Gly
145 150 155 160

Gly Arg Pro

Tyr Ala Pro Gly Ser Val Gly Arg Ser Cys Pro Ala Arg
165 170 175

Ala Ala Gly Leu Ser Gln Val Ser Ala Gly Ala Ala Gln Ala Ala Gly
180 185 190

Phe

<210> 12
<211> 263
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 12

Met Glu Ala His Leu Asp Trp Tyr Gly Val Pro Gly Leu Gln Glu Ala
1 5 10 15

Ser Asp Ala Cys Pro Arg Glu Ser Cys Ser

Ser Ala Leu Pro Glu Ala
20 25 30

Arg Glu Gly Ala Asn Val His Phe Pro Pro His Pro Val Pro Arg Glu
 35 40 45
 His Phe Ser Cys Ala Ala Pro Glu Leu Val Ala Gly Ala Gln Gly Leu
 50 55 60
 Asn Ala Ser Leu Met Asp Gly Gly Ala Leu Pro Arg Leu Met Pro Thr
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Val Ala Gly Ala Cys Ala Ala Arg Arg Arg Gln Ala
 Ser
 85 90 95
 Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Ser Gly Ala Thr Glu
 100 105 110
 Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg
 115 120 125
 Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His
 130 135 140
 Val Pro His Gly Gly Ala Asn Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu
 145 150
 155 160
 Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu
 165 170 175
 His Asp Ala Val Arg Ala Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu Thr Pro Ala
 180 185 190
 Thr Pro Pro Ser Asp Glu Cys Ala Gln Pro Ser Ala Ser Pro Ala Ser
 195 200 205
 Ala Ser Leu Ser Cys Ala Ser Thr Ser Pro Ser Pro Asp Arg Leu Gly
 210 215
 220
 Cys Ser Glu Pro Thr Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Glu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Cys Glu Gly Glu Leu Ser Pro Met Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe
 245 250 255
 Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr
 260
 <210> 13
 <211> 1051
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 13
 gcccgagca tggaagcacg tcagctaggc catgaactgc acccgaggagg ggtgggggtg 60
 gaagcgcacg
 gtgtcagctt tgcagaatgt gtacaccaag gggagggcga ggcgaaggaa 120
 ggagggcgta agaaaggagg cgggtggcggg gcggaggaga ttatctatac tttttaaaaa 180
 aaaggagcct cttagccgcg taaaggagac ttggggagcg cctgacagca cgcgcgggac 240
 acgagagtac cacgcttccc tactcttttc agaccttgac tggtagcggg tcccaggact 300
 gcaggaggcc agcgacgcgt gccctaggga gtctgcagc agtgccctgc ctgaggcccg 360
 tgaaggtgca aacgtccact tcccaccgca cccggttct cgcgagcact tttctgtgc 420
 cgcaccagaa ctgtagcag gggcccaggg gctgaatgca agcttgatgg acggcggcgc
 480
 gctgcccaga ctcatgccc cctcgtctgg agtcgtgga gccctgcctg ctgcgcggag 540
 acaagcgtct ccggaattgc tgcctgcag ccggcggcgg cgatctggag caaccgaggc 600
 cagcagcagc tcggcgtccg tggcacgccg caatgagcgc gagcgcaacc gcgtaaagct 660
 ggtaaaacttg ggcttccagg cgctgcggca gcacgtgccg caggcggcgc ccaacaagaa 720
 gctgagtaag gtggagacgc tgcctccgc ggtagagtac attcgtgcgc tgcagcggt 780
 gctgcagag cagcacacgg tgcggccggn gctcgtggg gggctgttaa caccgctac 840
 tccgcgtcc gatgagtga cgcagccctc tgcctcccct
 gccagcgggt ctctgtcctg 900
 cgcctctacg tctccgtccc ggacctggg ctgctctgag cctacctccc cgcgtccgc 960

ctactcgtcg gaggaagca gctgcgaggg agagctaagc ccgatggagc aggagctgct 1020
 tgactttttcc agttggtag ggggtactg a 1051
 <210> 14
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Rat
 <400> 14
 Met Glu Ser His Phe Asn Trp Tyr Gly Val Pro Arg Leu Gln Lys Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Ala Cys Pro Arg Glu
 Ser Cys Ser Ser Ala Leu Pro Glu Ala
 20 25 30
 Arg Glu Gly Ala Asn Val His Phe Pro Pro His Pro Val Pro Arg Glu
 35 40 45
 His Phe Ser Cys Gly Ala Pro Lys Pro Val Ala Gly Ala Pro Ala Leu
 50 55 60
 Asn Ala Ser Leu Met Asp Gly Gly Ala Leu Pro Arg Leu Val Pro Thr
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Val Ala Gly Ala Cys Thr Ala Arg Arg
 Arg Pro Pro Ser
 85 90 95
 Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Ser Gly Ala Thr Glu
 100 105 110
 Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg
 115 120 125
 Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His
 130 135 140
 Val Pro His Gly Gly Ala Asn Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu
 165 170 175
 His Asp Ala Val Arg Ala Ala Leu Ser Gly Gly Leu Leu Thr Pro Ala
 180 185 190
 Thr Arg Pro Ser Asp Val Cys Thr Gln Pro Ser Ala Ser Pro Ala Ser
 195 200 205
 Ala Ser Leu Ser Cys Thr Ser Thr Ser Pro Asp Arg Leu Gly Cys Ser
 210
 215 220
 Glu Pro Ala Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Glu Asp Ser Ser Cys
 225 230 235 240
 Glu Gly Glu Thr Tyr Pro Met Gly Gln Met Phe Asp Phe Ser Asn Trp
 245 250 255
 Leu Gly Gly Tyr
 260
 <210> 15
 <211> 1526
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 15
 ttcaccggc tgcaagcgt aggtgtacgg agacctggca gctcttgggg cttaaggact 60
 gagcrccaga gccggtggag gttcctgtgg agtacattcg gaccctctca cagccccga 120
 gagtgcggga cgtgcggagc gcagttcggg atctgcactc gaggacttgt cgaggacgca 180
 ttaagctaag catctgctcg gagcatggaa tcgcacttta actggtacgg ggtcccaagg 240
 ctccagaagg ctagecagc gtgccttagg gaatcctgca gcagtgcct gcctgaggcc 300
 cgtgaaggtg cgaacgtcca cttccaccg caccgggttc ctgcgagca ctttctctgt 360

ggcgaccga aaccgtagc gggggcccg gcgctgaatg caagcttgat ggacggcggc 420
gcgctgcca gactcgtgcc cacctcgtct ggagtcgctg gacccgtcac
tgctcggcgg 480
agaccccggt ccccggaact gcttcgctgc agccgacggc ggcgatcggg agcaaccgag 540
gccagcagca gctcggcggc cgtggcacgc cgcaatgagc gtgagcgcaa ccgctgtaaag 600
ctggtaaact tgggcttcca ggcgctgcgg cagcacgtgc cgcacggcgg cgccaacaag 660
aagctgagta aggtggagac gctgcgtccc gcggtagagt acatccgtgc gctgcagcgg 720
ctgctagcag agcacgacgc ggtgcgtgct gcgctctctg ggggtctatt aacaccgct 780
actcgcccggt ccgatgtgtg cacgcagccc tcgcctccc ctgccagcgc gtctctgtcc 840
tgcacctcta catccccaga ccgcctaggc
tgctccgagc ctgcctctcc gcgctccgcc 900
tactcgtcgg aggacagcag ctgcgaggga gagacttacc cgatggggca gatgtttgac 960
ttttccaatt ggttaggggg ctactgagca cccacaccc ctaagctgcg tccctgggtg 1020
tccctggtg gacctactg cgtttcttgc ccaggaaacc tgggcccatg cttacctat 1080
gctgtctagt gcagcctgac caaatgcaa gtactgacct ctgctcggcc tccacgccgc 1140
ggaatgacat cttccatctc ccagtccttg ccgaaccagg acttggaat ttctcaggag 1200
aaagaatttt acaatgaaa tctgcttttt atcaattaac ttgaactgct ggaggactct 1260
gctgaaaata
tgaagaatta tttttatata aagatcctt aagcttggag cacaataaag 1320
atgacctctg tctctaccc cactgtcta gaactttcca acctggccaa agtgtggacg 1380
ggtcggggccc tgagggcaag atgcctggct gcacccttct tctcttccg aagcctatcc 1440
tgacgtgat gtttggccag tgtgggaacc ctgctattgc aaagtgtact attctataaa 1500
agttgttttt cattggaaag gaattc 1526
<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Human
<400> 16
Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu
1
5 10
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Human
<400> 17
Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu
1 5
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Human
<400> 18
Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val
1 5
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Human
<400> 19
Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 20
 Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu
 1 5
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 21
 Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 22
 Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu
 1 5 10
 <210> 23

 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 23
 Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 24
 Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 25
 Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala
 1 5
 <210> 26
 <
 211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 26
 Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 27
 Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 28
 Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His
 1 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 29
 Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 30
 Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 31
 Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu
 1 5
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 32
 Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg
 1 5
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 33
 Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg
 1 5