(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0066000
(43) 공개일자 2023년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61P 3/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
A61K 39/0011 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7008539
(22) 출원일자(국제) 2021년08월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년03월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/045832
(87) 국제공개번호 WO 2022/036159
국제공개일자 2022년02월17일
(30) 우선권주장
63/064,869 2020년08월12일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
액팀 테라퓨틱스, 인코퍼레이티드
미국, 94710 캘리포니아, 스위트 에이 버클리, 밴크로프트 웨이 626
(72) 발명자
글릭맨, 로라, 힉스
미국, 94611 캘리포니아, 오클랜드, 라이달 코트 36
피터슨, 브렛, 니콜라스
미국, 94602 캘리포니아, 오클랜드, 프루트베일 애비뉴 3608
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

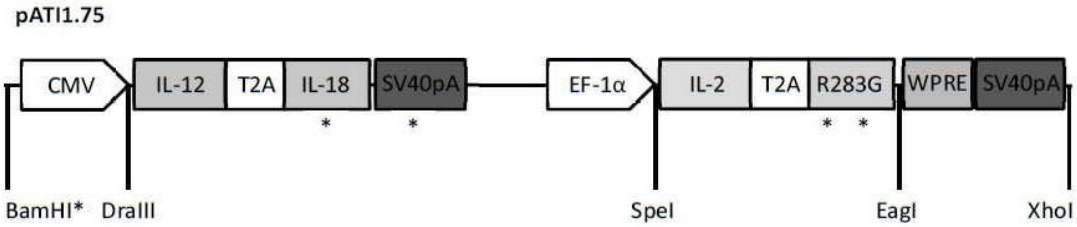
전체 청구항 수 : 총 393 항

(54) 발명의 명칭 **면역자극성 박테리아-기초 백신, 치료제, 및 RNA 전달 플랫폼**

(57) 요 약

예컨대 종양 미세환경, 특히 종양-체류 골수성 세포에서의 축적을 증가시키며, 보체 비활성화에 대한 내성을 향상시키고, 면역 세포 사멸을 감소시키며, 적응 면역력을 촉진하고, T-세포 기능을 증강시킴으로써 예를 들어, 독성을 감소시키고 항종양 활성을 향상시키도록 변형된 게놈을 갖는 약독화된 면역자극성 박테리아가 제공된다. 또한, 백신으로서 사용하기 위한, 그리고 mRNA의 전달을 위한 면역자극성 박테리아가 제공된다. 포식 세포의 콜로니화의 증가는 종양 미세환경 및 종양으로의 인코딩된 치료 생성물의 전달을 향상시키고, 다른 경로 중에서도 면역자극성 박테리아의 전신 투여를 허용한다. 포식 세포의 콜로니화의 증가는 또한, 백신으로서 사용하기 위한 직접 조직 투여용 면역자극성 박테리아의 용도를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/215 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
A61P 3/14 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/4705 (2013.01)
C07K 14/4748 (2013.01)
A61K 2039/523 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/55522 (2013.01)

(72) 발명자
케호, 하이싱
미국, 94709 캘리포니아, 버클리, 아파트먼트 306, 프란시스코 스트리트 1920
이안넬로, 알렉산드르, 찰스 미셸
미국, 94618 캘리포니아, 오클랜드, 트레저 힐 9
타노스, 크리스토퍼, 디.
미국, 94920 캘리포니아, 티뷰론, 미도우 힐 드라이브 38

(30) 우선권주장
63/188,443 2021년05월13일 미국(US)
17/320,200 2021년05월13일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서, 박테리아는 이러한 박테리아가 활성 티미딜레이트 신타제(synthase)를 생성하지 않고 성장용 보조제를 필요로 하는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 2

제1항에 있어서, 성장용 보조제는 티민, 티민 유도체, 티미딘, 티미딘 유도체, 티민 전구체(들), 티미딘 전구체(들), 또는 티미딘 모노포스페이트 전구체(들)를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 박테리아는 TLR2, 및 선택적으로 TLR4 및/또는 TLR5의 활성화를 감소시키거나 무효화시키는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 4

치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

박테리아는 이러한 박테리아가 활성 아스파라기나제를 분비하지 않는 게놈 변형을 포함하고;

박테리아는 TLR2, 및 선택적으로 TLR4 및/또는 TLR5의 활성화를 감소시키거나 무효화시키는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아의 게놈은 L-아스파라기나제 II를 인코딩하는 유전자 *ansB*의 모든 부분 또는 충분한 부분의 결실이나 방해 또는 변형에 의해 변형되며, 이로써 박테리아는 $ansB^-$이고 활성 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않는, 면역자극성 박테리아.

청구항 6

TLR2의 활성화를 감소시키거나 무효화시키며 이로써 유형 I IFN의 유도가 TLR2에 의해 저해되지 않는 게놈 변형(들)을 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

면역자극성 박테리아는 이러한 박테리아가 *생체내에서* 복제할 수 없으나 *시험관내에서* 영양 보조제와 함께 성장될 때 복제할 수 있는 게놈 변형(들)을 포함하고;

게놈 변형(들)은 티미딜레이트 신타제를 무효화시키거나 비활성화시키며, 이로써 박테리아는 $thyA^-$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 7

TLR2의 활성화를 감소시키거나 무효화시키며 이로써 유형 I IFN의 유도가 TLR2에 의해 저해되지 않는 게놈 변형(들)을 포함하는 면역자극성 박테리아로서, 여기서 면역자극성 박테리아는 인터페론을 인코딩하거나, 유형 I 인터페론을 항시적으로 유도하는 변형된 STING 단백질을 인코딩하고 병원체 또는 종양으로부터의 항원 또는 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 8

치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

면역자극성 박테리아의 게놈은 유전자 또는 유전자들의 모든 부분 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해

변형되며, 이로써 박테리아는 변형되어 펜타-아실화된 지질 A를 갖는 지질다당류(LPS)를 생산하며;

헥사-아실화된 지질 A를 갖는 지질다당류는 야생형 박테리아와 비교하여 적어도 10배만큼 실질적으로 감소되거나, 부재하고;

박테리아의 게놈은 필수 영양소에 대해 영양 요구성(auxotrophic)이 되도록 변형되며;

박테리아의 게놈은 박테리아 자체가 감염된 면역 세포에서 유형 I 인터페론(IFN)의 유도를 저해하거나 방지하지 않도록 변형되고;

박테리아의 게놈은 이러한 박테리아가 활성 아스파라기나제 및/또는 티미딜레이트 신타제를 인코딩하거나 생성하지 않도록 변형되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 9

치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

면역자극성 박테리아의 게놈은 유전자 또는 유전자들의 모든 부분 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되며, 이로써 박테리아는 변형되어 펜타-아실화된 지질 A를 갖는 지질다당류(LPS)를 생산하며;

헥사-아실화된 지질 A를 갖는 지질다당류는 야생형 박테리아와 비교하여 적어도 10배만큼 실질적으로 감소되거나, 부재하고;

박테리아의 게놈은 이러한 박테리아가 활성 티미딜레이트 신타제를 생성하지 않으며 이로써 박테리아가 $thyA^-$가 되도록 변형되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 10

치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

면역자극성 박테리아의 게놈은 유전자 또는 유전자들의 모든 부분 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되며, 이로써 박테리아는 편모가 결여되며;

비변형된 면역자극성 박테리아는 편모를 갖고;

박테리아의 게놈은 이러한 박테리아가 활성 티미딜레이트 신타제를 생성하지 않도록 변형되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 게놈 변형은 결실, 삽입, 및/또는 대체를 포함하며, 이로써 박테리아는 $thyA^-$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 게놈은 변형되어, 박테리아는 컬리 핌브리애(curli fimbriae)가 결여되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 TLR4 및/또는 TLR5의 활성화를 감소시키거나 무효화시키는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

게놈 변형은 편모를 갖지 않는 박테리아를 초래하고;

박테리아의 야생형은 편모를 갖는, 면역자극성 박테리아.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 컬리 핌브리애를 생성하지 않는, 면역자극성 박테리아.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 게놈 변형은 펜타-아실화된 지질다당류를 초래하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 편모가 결여되고, *msbB*$^{-}$/*pagP*$^{-}$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 18

TLR2의 활성화를 감소시키거나 무효화시키며 이로써 유형 I IFN의 유도가 TLR2에 의해 저해되지 않는 게놈 변형을 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

면역자극성 박테리아는 진핵 숙주에서 *생체내에서* 복제할 수 있고;

면역자극성 박테리아는 종양-연관 항원을 인코딩하거나, 종양 항원 및 STING 단백질을 인코딩하거나, 종양-연관 항원 및 인터페론 알파를 인코딩하거나, 종양-연관 항원 및 인터페론 베타를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는, 비변형된 인간 STING 단백질과 비교하여 유형 I 인터페론의 유도를 증가시킨 변형된 STING 단백질인 STING 단백질을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 20

제19항에 있어서, 변형된 STING 단백질은 제406항 내지 제431항 중 어느 한 항의 변형된 STING 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 21

제20항에 있어서, 변형된 STING 단백질은 대체 N154S/R284G를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드에서 인코딩되는 치료 생성물은 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부이거나, 인코딩된 생성물은 인터페론-알파 또는 인터페론-베타이거나, 인코딩된 생성물은 IFN-알파와 IFN-베타 둘 다인, 면역자극성 박테리아.

청구항 23

제22항에 있어서, 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 치료 생성물은 STING 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 병원체 또는 종양으로부터의 항원, 에피토프(들), 또는 단백질을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 25

이종성 생성물의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

면역자극성 박테리아의 게놈은 유전자 또는 유전자들의 모든 부분 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되며, 이로써 박테리아는 TLR2, 및 선택적으로 TLR4 및 TLR5 중 하나 또는 둘 다에 의한 약독화된(attenuated) 인식을 가지며;

하나의 생성물은 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부이고;

항원, 에피토프 또는 에피토프들로부터의 제2 생성물은 병원체 또는 종양에 대한 면역화를 위한 항원이거나 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 26

제25항에 있어서, 박테리아의 게놈은 박테리아가 컬리 핌브리애를 갖지 않도록 변형되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 27

원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결된 핵산을 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

핵산은 원핵생물에 의한 번역에 필요한 서열이 결여된 RNA를 인코딩하며, 이로써 RNA는 박테리아에서 생성되고;

인코딩된 RNA는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열이 결여되고/되거나 내부 리보솜 진입 부위(IRES: Internal Ribosome Entry Site), 및/또는 2A 펩타이드를 통한 번역 판독물을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 28

원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결된 핵산을 포함하는 면역자극성 박테리아로서, 여기서 핵산은 원핵생물에 의한 번역에 필요한 서열이 결여된 RNA를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 29

제28항에 있어서, RNA는 샤인-달가노 서열이 결여된, 면역자극성 박테리아.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 2A 펩타이드는 T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 중 하나 이상인, 면역자극성 박테리아.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

치료 생성물을 인코딩하는 핵산은 원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결되며,

핵산은 원핵생물에 의한 번역에 필요한 서열이 결여된 RNA를 인코딩하며, 이로써 RNA는 박테리아에서 생성되고,

RNA는 샤인-달가노 서열이 결여되고, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 또는 2A 펩타이드를 통한 번역 판독물을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 32

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 원핵 프로모터는 박테리아 프로모터 또는 박테리오파지(bacteriophage) 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 33

제32항에 있어서, 프로모터는 박테리오파지 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 파지 RNA 폴리머라제를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 35

제32항에 있어서, 프로모터는 임의의 SEQ ID NO: 393-396을 각각 포함하는 프로모터로부터 선택되는, 면역자극성 박테리아:

attatgtcttgacatgtagtgagtgggctggtataatgcagcaag, 또는

ttatgcttgacgctgcgtaaggtttttgttataatacaccaag, 또는

attatgtcttgacatgtagtgagtgggctggtaaatgcagcaag, 또는

gatcccggagttcatgcgtgatgcaatgaaagtgccgttctacttcggtgggacctcactgcttatcgttgttgtcgtgattatggact
ttatggctcaagtgcaaactctgatgatgtccagtcagtatgagtctgcattgaagaaggcgaacctgaaaggctacggccgttaa
ttggtcgcctgagaagttacggagagtaaaaatgaaagttcgtgcttccgtcaagaaattatgccgtaactgcaaaatcgttaagc
gtgatggtgtcatccgtgtgatttgcagtgccgagccgaagcataaacagcgccaaggctgatttttttcgcatatttttcttgcaaag
ttgggttgagctggctagattagccagccaatcttttgtatgtctgtacgtttccatttgagtatcctgaaaacgggctttttcagcatgg
tacgtacatattaaatagtaggagtgcatagtggcccgtatagcaggcattaacattcctgatcagaaacacgccgtgatcgcgtta
acttcgatctacggtgtcggcaagacccgttctaaagccatcctggctgcagcgggtatcgctgaaaatgttaagatcctctagatt
taagaaggagatatacat (*살모넬라* rpsm 프로모터).

청구항 36

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 이러한 박테리아가 조직-체류 골수성 세포를 감염시키고 상피 세포를 감염시키지 않는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 37

제36항에 있어서,

박테리아는 편모가 결여되고;

게놈 변형이 없는 박테리아는 편모를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 38

치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서, 박테리아에 의한 대식세포의 감염은 인간 M2 대식세포를 M1 또는 M1-유사 표현형 대식세포로 전환시키는, 면역자극성 박테리아.

청구항 39

제38항에 있어서, 치료 생성물은 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인, 면역자극성 박테리아.

청구항 40

제39항에 있어서, 유형 I IFN의 발현은 항시적인, 면역자극성 박테리아.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 치료 생성물은 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 치료 생성물의 기능-획득(GOF) 변이체이고, 변이체 GOF 생성물은 유형 I IFN의 발현을 초래하기 위해 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드를 필요로 하지 않는, 면역자극성 박테리아.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 변이체 STING 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아에 의한 감염은 인간 M2 대식세포를 M1-유사 유형 I IFN 생성 세포로 전환시키는, 면역자극성 박테리아.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 편모가 결여되며, 야생형 박테리아는 편모를 갖고, $pagP^{-}/msbB^{-}$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 45

제44항에 있어서, *살모넬라*(*Salmonella*) 균주인, 면역자극성 박테리아.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 항암 치료제인, 면역자극성 박테리아.

청구항 47

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 항바이러스 치료제 또는 항병원체성 박테리아 치료제인, 면역자극성 박테리아.

청구항 48

제47항에 있어서, 항바이러스 치료제는 바이러스 효소를 저해하거나 바이러스 복제를 저해하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 49

제47항에 있어서, 치료제는 바이러스 항원의 발현이 바이러스에 대한 면역-보호 반응을 초래하는 항바이러스 치료제이거나, 항바이러스 치료제는 바이러스 항원에 결합하거나 이와 상호작용하는 항체이며, 이로써 바이러스는 저해 또는 차단되거나, 항바이러스 면역력이 초래되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 50

제47항에 있어서, 치료제는 박테리아 항원의 발현이 박테리아 병원체에 대한 면역-보호 반응을 초래하는 박테리아 항원인 항박테리아 치료제이거나, 항박테리아 치료제는 박테리아 항원에 결합하거나 이와 상호작용하는 항체이며, 이로써 병원체성 박테리아는 저해 또는 차단되거나, 항병원체성 박테리아 면역력이 초래되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 지속적 감염을 야기하는 바이러스 또는 감염성 병원체(infectious agent)를 치료하기 위한 항바이러스 치료제를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 52

제47항 내지 제49항 및 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 항바이러스 치료제는 바이러스 항원 또는 항원의 에피토프이고, 항원은 바이러스 표면 단백질, 또는 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 바이러스 비구조 단백질, 또는 바이러스 개방 리딩 프레임(open reading frame) 단백질을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 53

제51항에 있어서, 바이러스 또는 감염성 병원체는 만성 감염을 야기하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 54

제51항에 있어서, 바이러스 또는 감염성 병원체는 잠재 감염(latent inferction)을 야기하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 55

제51항에 있어서, 바이러스 또는 감염성 병원체는 느린 감염(slow infection)을 야기하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 56

제51항에 있어서, 바이러스 또는 감염성 병원체는 T-세포 백혈병 바이러스(T-Cell leukemia virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus), 헤르페스바이러스(herpesvirus), 대상 포진 바이러스(varicella zoster virus), 홍역 바이러스(measles virus), 파포바바이러스(papovavirus),

프리온(prion), A형, B형, C형, D형 및 E형 간염 바이러스(hepatitis virus type A, B, C, D and E), 아데노바이러스(adenovirus), 파보바이러스(parvovirus), 인간 면역결핍 바이러스(HIV: human immunodeficiency virus), 코로나바이러스(coronavirus), 천연두 바이러스(smallpox virus), 폴리오바이러스(poliovirus), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 로타바이러스(rotavirus), 황열 바이러스(yellow fever virus), 유행성 이하선염 바이러스(mumps virus), 풍진 바이러스(rubella virus), 및 유두종바이러스(papillomavirus) 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 57

제51항에 있어서, 바이러스는 HIV이거나 간염 바이러스인, 면역자극성 박테리아.

청구항 58

제51항에 있어서, 감염성 병원체는 프리온 또는 원생동물인, 면역자극성 박테리아.

청구항 59

제47항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 숙주에서 면역 반응을 생성하기에 충분한 바이러스 표면 항원 또는 이의 일부인, 면역자극성 박테리아.

청구항 60

제51항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 바이러스 유전자 발현 또는 복제를 방해하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 면역자극성 단백질을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 62

제61항에 있어서, 면역자극성 단백질은 인터페론 유전자 자극제(STING) 단백질, 변형된 STING 단백질, 사이토카인, 케모카인, 또는 공동자극성 수용체 또는 리간드인, 면역자극성 박테리아.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 이러한 박테리아에서 편모가 결여되는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 이러한 박테리아가 *pagP*$^{-}$ 또는 *msbB*$^{-}$/*pagP*$^{-}$가 되는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,

박테리아는 이러한 박테리아가 아스파라기나제를 발현하지 않거나 분비되는 아스파라기나제의 합성을 활성화시키지 않는 박테리아 게놈 변형을 포함하며; 및/또는

면역자극성 박테리아의 게놈은 L-아스파라기나제 II를 인코딩하는 유전자 *ansB*의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되어, 박테리아는 *ansB*$^{-}$이고 활성 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않는, 면역자극성 박테리아.

청구항 66

제65항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 종양 및/또는 종양 미세환경을 콜로니화하며, 이로써 *ansB*$^{-}$ 표현형은

활성 아스파라기나제의 생성을 감소시키거나 무효화시키는 항암 치료제인, 면역자극성 박테리아.

청구항 67

원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결된 핵산을 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

핵산은 원핵생물에 의한 번역에 필요한 서열이 결여된 RNA를 포함하며, 이로써 RNA는 박테리아에서 생성되나 박테리아에 의해 번역될 수 없으며;

박테리아는 감염이 골수성 세포에 제한되는 게놈 변형을 갖고;

RNA는 치료 생성물을 인코딩하거나 치료 생성물인, 면역자극성 박테리아.

청구항 68

골수성 세포를 주로 또는 독점적으로 감염시키고 원핵 프로모터의 제어 하에 박테리아에 의해 인코딩되는 RNA를 포함하는 면역자극성 박테리아를 포함하는 RNA 전달 시스템으로서,

RNA는 박테리아에 의한 번역에 필요한 조절 서열이 결여되고;

RNA는 치료 생성물을 인코딩하거나 치료 생성물인, RNA 전달 시스템.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 전사된 RNA는 샤인-달가노 서열이 결여된, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 70

제67항 또는 제68항에 있어서, 전사된 RNA는 샤인-달가노 서열이 결여되고 코작 컨센서스 서열(Kozak consensus sequence)을 포함하는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 71

제70항에 있어서, 코작 컨센서스 서열은 ACCAUGG(SEQ ID NO: 397)인, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 72

제67항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 편모가 결여되고 게놈 변형을 함유하며, 이로써 박테리아는 *pagP*$^{-}$/*msbB*$^{-}$인, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 73

제67항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물을 인코딩하거나 치료 생성물인 RNA는 플라스미드 상에서 인코딩되는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 74

제67항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, RNA를 인코딩하는 핵산은 유도적인 원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 75

제67항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, RNA를 인코딩하는 핵산은 항시적인 원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 76

제67항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, RNA를 인코딩하는 핵산은 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함하는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아의 게놈은 L-아스파라기나제 II를 인코딩하는 유전자 *ansB*의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되며, 이로써 박테리아는 *ansB*$^{-}$이고 활성 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 78

제1항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아의 게놈은 L-아스파라기나제 II를 인코딩하는 유전자 *ansB*의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해, 그리고 유전자 *csgD*의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되며, 이로써 박테리아는 *ansB*$^{-}$이며 활성 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않고, *csgD*$^{-}$이고 컬리 핌브리애의 합성을 활성화시키지 않는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 79

제1항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 게놈은 편모를 인코딩하는 유전자의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해를 추가로 포함하며, 이로써 박테리아는 플라젤린$^{-}$이고 편모를 생성하지 않고, 야생형 박테리아는 편모를 갖는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 80

제79항에 있어서, 박테리아의 게놈은 유전자 *csgD*의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 추가로 변형되며 이로써 박테리아는 *csgD*$^{-}$이거나, 게놈에 또 다른 또는 추가 변형을 가지며 이로써 생물막 형성이 손상되는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 81

제79항에 있어서, 박테리아의 게놈은 유전자의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 추가로 변형되며, 이로써 박테리아는 *csgD*$^{-}$/*msbB*$^{-}$/*pagP*$^{-}$인, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 82

제69항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 이러한 박테리아에서 편모가 결여되는 게놈의 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아 또는 RNA 전달 시스템.

청구항 83

박테리아에서 편모가 결여되며 *lppA*$^{-}$/*lppB*$^{-}$이고 선택적으로 *csgD*$^{-}$가 되는 게놈 변형을 포함하는 면역자극성 박테리아.

청구항 84

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 퓨린에 대해 영양요구성인, 면역자극성 박테리아.

청구항 85

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 아데노신에 대해 영양요구성이거나 아데노신, 아데닌 및 ATP에 대해 영양요구성인, 면역자극성 박테리아.

청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *purI*$^{-}$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *pagP*$^{-}$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 88

제1항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *asd*$^-$ 또는 *thyA*$^-$ 또는 둘 다인, 면역자극성 박테리아.

청구항 89

제1항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제$^-$(*asd*$^-$)이고, 박테리아는 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제(*asd*)를 인코딩하는 내인성 유전자의 모두 또는 일부의 방해 또는 결실로 인해 *asd*$^-$이며 이로써 내인성 *asd*는 발현되지 않거나 기능적 효소는 생성되지 않거나, 내인성 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 일부의 방해 또는 결실로 인해 *thyA*$^-$이며 이로써 내인성 티미딜레이트 신타제는 발현되지 않거나 기능적 효소는 생성되지 않는, 면역자극성 박테리아.

청구항 90

아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제$^-$(*asd*$^-$)인 면역자극성 박테리아로서,

박테리아는 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제(*asd*)를 인코딩하는 내인성 유전자의 모두 또는 일부의 방해 또는 결실로 인해 *asd*$^-$이며 이로써 내인성 *asd*는 발현되지 않거나 기능적 효소는 생성되지 않고;

박테리아는 내인성 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 일부의 방해 또는 결실로 인해 *thyA*$^-$이며 이로써 내인성 티미딜레이트 신타제는 발현되지 않거나 기능적 효소는 생성되지 않는, 면역자극성 박테리아.

청구항 91

제90항에 있어서, 비변형된 박테리아는 *살모넬라* 박테리아인, 면역자극성 박테리아.

청구항 92

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 프로모터의 제어 하에 플라스미드 상에서 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제(*asd*)를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 93

제1항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *msbB*$^-$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 94

제1항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, *asd*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$, 및 *pagP*$^-$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 95

제1항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$ 및 *pagP*$^-$; 또는 *thyA*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$ 및 *pagP*인, 면역자극성 박테리아.

청구항 96

제1항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, *ansB*$^-$, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$ 및 *pagP*$^-$; 또는 *ansB*$^-$, *thyA*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$ 및 *pagP*$^-$인, 면역자극성 박테리아.

청구항 97

제1항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 항암 치료제인, 면역자극성 박테리아.

청구항 98

제1항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 변형된 STING 및 IL-15 또는 IL-15/IL-15R 알파 사슬

복합체를 인코딩하고, STING은 cGAS 및/또는 임의의 STING 리간드의 부재 하에 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 99

제1항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *ansB*⁻, *thyA*⁻, *csgD*⁻, *purI*⁻, *msbB*⁻, 플라젤린⁻ 및 *pagP*⁻인, 면역자극성 박테리아.

청구항 100

제1항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물을 인코딩하는 핵산은 분비 신호를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결되며, 이로써 발현될 때 치료 생성물이 분비되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 101

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 항바이러스 생성물인, 면역자극성 박테리아.

청구항 102

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 바이러스 항원인, 면역자극성 박테리아.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 항바이러스 항체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 104

제100항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서,

인코딩된 치료 생성물은 항바이러스 생성물이고;

선택된 바이러스는 만성 감염 또는 잠재 감염을 야기하는 바이러스인, 면역자극성 박테리아.

청구항 105

제100항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서,

인코딩된 치료 생성물은 항바이러스 생성물이고;

바이러스는 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상 포진 바이러스, 수두바이러스, 홍역 바이러스, 및 레트로바이러스 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 106

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드의 복제수는 150 초과인, 면역자극성 박테리아.

청구항 107

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드의 복제수는 150 복제수 이하이거나 150 이하인, 면역자극성 박테리아.

청구항 108

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 저 복제수로 존재하고, 저 복제수는 25 미만, 20 미만, 약 25 미만, 또는 약 20 미만의 복제수인, 면역자극성 박테리아.

청구항 109

제1항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 핵산 또는 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 110

제109항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 111

제1항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드 상에서 인코딩된 치료 생성물(들)은 항암 치료(들)인, 면역자극성 박테리아.

청구항 113

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드 상에서 인코딩된 치료 생성물(들)은 항바이러스 치료(들)인, 면역자극성 박테리아.

청구항 114

제112항 또는 제113항에 있어서, 박테리아는 사이토카인, 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질, 및 공동자극성 수용체 또는 분자 중에서 선택되는 2개 이상의 생성물을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 115

제114항에 있어서, 공동자극성 분자는 세포질 도메인이 결여되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 116

제1항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물 또는 생성물들 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은, 박테리아를 포함하는 세포로부터 치료 생성물(들)의 분비를 위한 신호를 인코딩하는 핵산을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 117

제1항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드 상에서 생성물을 인코딩하는 핵산은 진핵생물 숙주에 의해 인식되는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 118

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 2개 이상의 생성물을 인코딩하며, 각각의 생성물의 발현은 별개의 프로모터의 제어 하에 있거나 모두의 발현은 단일 프로모터의 제어 하에 있고, 각각의 생성물은 2A 펩타이드를 인코딩하는 핵산에 의해 분리되어 각각의 인코딩된 치료 생성물의 별개의 번역을 발휘하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 119

제118항에 있어서, 핵산은 T2A, F2A, E2A, 또는 P2A 펩타이드를 인코딩하여, 단일 프로모터의 제어 하에 발현되는 치료 생성물의 별개의 발현을 발휘하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 120

제1항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵생물 프로모터는 RNA 폴리머라제 II 프로모터 또는 RNA 폴리머라제 III 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 121

제120항에 있어서, 프로모터는 바이러스 프로모터인 RNA 폴리머라제 II 프로모터 또는 포유류 RNA 폴리머라제 II 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 122

제121항에 있어서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 헤르페스 바이러스 프로모터, 및 아데노바이러스 프로모터 중에서 선택되는 바이러스 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 123

제1항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드 상에서 인코딩된 치료 생성물 또는 이종성 단백질 중 하나 이상의 발현을 제어하는 프로모터는 신장 인자-1(EF-1) 알파 프로모터, 또는 MND 프로모터, 또는 UBC 프로모터, 또는 PGK 프로모터, 또는 CAG 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 124

제1항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드 상에서 인코딩된 치료 생성물 또는 이종성 단백질 중 하나 이상의 발현을 제어하는 프로모터는 EF-1 알파, 아데노바이러스 2 또는 5 후기(late), CMV, SV40, MND, PGK, EIF4A1, CAG, 또는 CD68 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 125

제1항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드 상에서 인코딩된 치료 생성물 또는 이종성 단백질 중 하나 이상의 발현을 제어하는 프로모터는 후기 프로모터인 바이러스 프로모터인, 면역자극성 박테리아.

청구항 126

제1항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 SV40, hGH, BGH, MND, 닭 베타-글로불린, 및 rbGlob(토끼 글로불린) 유전자 중에서 선택되는 종결인자 및/또는 프로모터(들)를 포함하는 조절 서열을 포함하여, 치료 생성물(들)의 발현을 제어하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 127

제1항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물(들)은 플라스미드를 함유하는 세포로부터의 분비를 위해 신호 서열에 작동 가능하게 연결되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 128

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드는 인핸서, 프로모터, 치료 생성물 또는 이종성 단백질을 인코딩하는 개방 리딩 프레임, 및 polyA 테일을 포함하는 작제물을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 129

제1항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 인핸서, 프로모터, IRES, 치료 생성물 또는 이종성 단백질을 인코딩하는 개방 리딩 프레임, 및 polyA 테일을 포함하는 작제물을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 130

제1항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 인핸서, 프로모터, IRES, 위치화 서열, 치료 생성물 또는 이종성 단백질을 인코딩하는 개방 리딩 프레임, 및 polyA 테일을 포함하는 작제물을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 131

제130항에 있어서, 치료 생성물 또는 이종성 단백질을 인코딩하는 플라스미드 상의 작제물은 우드척 간염 바이러스(WHP: Woodchuck Hepatitis Virus) 전사후 조절 요소(Posttranscriptional Regulatory Element)(WPRE), 또는 B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE)를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 132

제1항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질

성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 치료 생성물 또는 이러한 치료 생성물의 변이체를 인코딩하는 핵산을 함유하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 133

제132항에 있어서, 치료 생성물은 이의 비변형된 형태에서 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드를 감지하거나 이와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하여, 유형 I IFN의 발현을 유도하고, 변이체 단백질은 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드의 감지 또는 상호작용의 부재 하에 유형 I IFN의 발현을 유도하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 134

제132항에 있어서, 치료 생성물은 대상체에서 발현될 때 유형 I IFN의 항시적 발현을 유발하는 변이체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 135

제132항에 있어서, 치료 생성물은 유형 I IFN의 발현을 초래하는 데 있어서 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드를 필요로 하지 않는 기능-획득(GOF) 변이체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 136

제1항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, IRF-8, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, 및 SNRNP200 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 137

제1항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, 및 SNRNP200 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 138

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 증가된 활성을 갖거나, 유형 I 인터페론(IFN)의 항시적 발현을 초래하는 변이체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 139

제1항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 인간에서 인터페론병증(interferonopathy)을 촉진하거나 야기하는 단백질의 기능-획득, 항시적 활성 변이체를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 140

제132항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은, 단백질에서 인산화 부위를 무효화하여, 활성화된 B-세포의 핵 인자 카파-경쇄-인핸서(NF-κB) 신호전달을 감소시키는 돌연변이를 포함하는 변이체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 141

제132항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 유형 I IFN을 유도하는 치료 생성물은 STING, RIG-I, IRF-3, 또는 MDA5이거나; 유형 I IFN을 유도하는 치료 생성물은 IRF-5 또는 IRF-8인, 면역자극성 박테리아.

청구항 142

제132항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서,

유형 I IFN의 발현을 유도하는 치료 생성물은 증가된 활성 또는 항시적 활성을 갖는 이의 변이체이고;

치료 생성물은 STING, RIG-I, IRF-3, IRF-5, IRF-8, 또는 MDA5인, 면역자극성 박테리아.

청구항 143

제132항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 유형 I IFN의 증가된 발현을 초래하는 기능-획득 돌연변이를 포함하는 STING, RIG-I, IRF-3, IRF-5, IRF-8, 또는 MDA5의 변이체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 144

제132항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 STING, RIG-I, IRF-3, IRF-5, IRF-8, 또는 MDA5의 변이체이며, 여기서 바이러스 감염의 결과 인산화되는 하나 이상의 세린(S) 또는 트레오닌(T) 잔기(들)는 아스파르트산(D)으로 대체되며, 이로써 생성된 변이체는 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 인산모방체(phosphomimetic)인, 면역자극성 박테리아.

청구항 145

제132항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서,

치료 생성물은 SEQ ID NO: 312를 기준으로 위치 396, 398, 402, 404 및 405의 잔기에서 하나 이상의 대체(들)를 갖는 IRF-3이고;

잔기는 아스파르트산 잔기로 대체되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 146

제145항에 있어서, IRF-3은 SEQ ID NO: 312를 기준으로 대체 S396D를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 147

제145항에 있어서, IRF-3은 SEQ ID NO: 312를 기준으로 대체 S396D/S398D/S402D/T404D/S405D를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 148

제132항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, IRF-5, IRF-8, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, 및 SNRNP200 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 149

제132항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서,

세포기질성 DNA/RNA를 감지하는 치료 생성물은 변이체 STING, MDA5, RIG-I 또는 IRF-3이고;

비변형된 STING은 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 서열을 가지며, 비변형된 MDA5는 SEQ ID NO: 310으로 표시된 서열을 갖고, 비변형된 RIG-I는 SEQ ID NO: 311로 표시된 서열을 가지며, 비변형된 IRF-3은 SEQ ID NO: 312로 표시된 서열을 갖는, 면역자극성 박테리아.

청구항 150

제132항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서,

치료 생성물은 STING, MDA5, IRF-3, 및 RIG-I 중에서 선택되고, STING, MDA5, IRF-3, IRF-5, IRF-8, 또는 RIG-I가 항시적으로 활성으로 되는 기능-획득 돌연변이(들)를 포함하며, 이로써 유형 I IFN의 발현은 항시적인, 면역자극성 박테리아.

청구항 151

제149항 또는 제150항에 있어서, 돌연변이는 하기로부터 선택되는, 면역자극성 박테리아:

a) STING에서, SEQ ID NO: 305-309를 기준으로, S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A,

E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, N154S/R284G, 및 S324A/S326A 중에서 선택되는 하나 이상;

b) MDA5에서, SEQ ID NO: 310을 기준으로, T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F, 및 A452T 중 하나 이상;

c) RIG-I에서, SEQ ID NO: 311을 기준으로, E373A 및 C268F 중 하나 또는 둘 다; 및

d) IRF-3에서, SEQ ID NO: 312를 기준으로, S396D.

청구항 152

제132항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 SEQ ID NO: 305-309를 기준으로, S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, N154S/R284G, 및 S324A/S326A, 및 이의 보존적 대체 중에서 선택되는 하나 이상의 아미노 대체(들)를 함유하는 변이체 STING인, 면역자극성 박테리아.

청구항 153

제114항 및 제132항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 유형 I IFN은 인터페론-α 또는 인터페론-β인, 면역자극성 박테리아.

청구항 154

제1항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 155

제154항에 있어서, 이중특이적 항체는 이중특이적 T-세포 연계자(engager)인, 면역자극성 박테리아.

청구항 156

제1항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 DLL3 및 CD3에 결합하는 이중특이적 T-세포 연계자 항체를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 157

제156항에 있어서, 이중특이적 T-세포 연계자 항체는 항-DLL3 항체 및 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 158

제156항 또는 제157항에 있어서, 이중특이적 T-세포 연계자 항체는, 서열이 SEQ ID NO: 485-490으로 표시되는 DLL3 및 CD3 각각에 결합하는 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 인코딩하는 SC16.15, SC16.34, 및 SC16.56으로 표기된 작제물에서 인코딩된 것, 또는 이의 인간화(humanized) 변이체, 및 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 159

제157항 또는 제158항에 있어서, 이중특이적 T-세포 연계자 항체는 a) 내지 f)의 조합을 포함하며, 이로써 생성된 작제물은 DLL3 및 CD3 각각에 결합할 수 있는, 면역자극성 박테리아:

a) SEQ ID NO: 487의 아미노산 잔기 154-260, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는 경쇄; 및

b) SEQ ID NO: 487의 아미노산 잔기 22-138로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는 중쇄; 및

c) SEQ ID NO: 489의 아미노산 잔기 155-261로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는 경쇄; 및

d) SEQ ID NO: 489의 아미노산 잔기 22-139로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는 중쇄; 및

e) 중쇄 및 경쇄로서,

경쇄는 SEQ ID NO: 485의 아미노산 잔기 155-261로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고;

중쇄는 SEQ ID NO: 485의 아미노산 잔기 22-139로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는, 중쇄 및 경쇄; 및

f) 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄로서,

항-CD3 항체의 경쇄는 SEQ ID NO: 485의 아미노산 잔기 398-504로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고;

항-CD3 항체의 중쇄는 SEQ ID NO: 485의 아미노산 잔기 267-382로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는, 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄.

청구항 160

제156항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 이중특이적 T-세포 연계자 항체 작제물은 리더(leader) 서열을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 161

제160항에 있어서, 리더 서열은 IgGK 리더 서열인, 면역자극성 박테리아.

청구항 162

제156항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서,

이중특이적 항체는 하나 이상의 경쇄 및 중쇄를 연결하는 Gly-Ser 링커를 포함하고;

Gly-Ser 링커는 이중특이적 T-세포 연계자 항체의 항-DLL3 부분 및 항-CD3 부분을 연결하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 163

제162항에 있어서, 링커는 SEQ ID NO: 485의 잔기 383-397로 표시된 아미노산의 서열을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 164

제156항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 T-세포 연계자 항체는 플래그 태그(flag tag)를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 165

제164항에 있어서, 플래그 태그는 SEQ ID NO: 485의 잔기 505-512로 표시된 아미노산의 서열을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 166

제156항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 리더 서열, 항-DLL 항체의 중쇄와 경쇄, 및 항-CD3 항체의 중쇄와 경쇄, 및 선택적으로 하나 이상의 펩타이드 링커, 및 선택적으로 플래그 태그를 인코딩하는 핵산 작제물을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 167

제156항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 이중특이적 T-세포 연계자 항체 작제물은 임의의 SEQ ID NO: 485-491로 표시된 아미노산 잔기의 서열, 또는 이의 인간화 변이체, 또는 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 변이체, 및 이와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 168

제1항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 종양-연관 항원을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 169

제1항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 유형 I 인터페론을 항시적으로 유도하는 변형된 STING 단백질을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 170

제169항에 있어서, STING 단백질은 대체 N154S, 또는 R284G, 또는 N154S/R284G를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 171

제1항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 IL-15 또는 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 172

제1항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 변형된 STING, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, 종양-연관 항원 및/또는 이중특이적 T-세포 연계자 항체의 조합을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 173

제1항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 하기 중 하나 이상 중에서 선택되는 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아: IL-2, IL-7, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15Rα-IL-15sc), IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, CCL3, CCL4, CCL5, T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하거나 이를 발휘하거나 강화시키는 단백질, CD40, CD40 리간드(CD40L), CD28, OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 4-1BB 리간드(4-1BBL), B7-CD28 계열의 구성원, CD47 길항제, 항-IL-6 항체 또는 IL-6 결합 유인 수용체, TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼계열의 구성원.

청구항 174

제173항에 있어서,

면역자극성 단백질은 선택적으로 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 절두되거나 세포질 도메인이 결여된 CD40, CD40 리간드(CD40L), CD28, OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 및 4-1BB 리간드(4-1BBL) 중에서 선택되는 공동자극성 분자이고;

절두된 유전자 생성물은 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고, 결실된 세포질 도메인으로 인해 항원-제시 세포(APC)에 역조절(counter-regulatory) 신호를 할 수 없는, 면역자극성 박테리아.

청구항 175

제173항 또는 제174항에 있어서, 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질은 사이토카인 또는 케모카인인, 면역자극성 박테리아.

청구항 176

제173항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질은 공동자극성 분자 또는 이의 세포질 도메인-결실 형태인, 면역자극성 박테리아.

청구항 177

제176항에 있어서, 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질은 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, CD24L, B7RP1, 및 OX40L 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 178

제1항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제인 치료 생성물을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 179

제1항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 면역자극성 박테리아.

청구항 180

제179항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 단일-사슬 Fv(scFv), Fv, dsFv, 나노체(nanobody), 이중체(diabody) 단편, 및 단일-사슬 항체 중에서 선택되는 항원-결합 단편인, 면역자극성 박테리아.

청구항 181

제179항 또는 제180항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화이거나 인간인, 면역자극성 박테리아.

청구항 182

제179항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PD-1, PD-L1, CTLA-4, VEGF, VEGFR2, CD24, 또는 IL-6의 길항제인, 면역자극성 박테리아.

청구항 183

제1항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 하기 중에서 선택되는 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아:

a) 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질;

b) 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 단백질, 또는 유형 I IFN의 발현을 증가시키도록 증가된 활성을 갖는 이의 변이체, 또는 유형 I IFN의 항시적 발현을 초래하는 이의 변이체 중 하나 이상; 및

c) 항암 항체 또는 이의 항원-결합 부분.

청구항 184

제183항에 있어서, 면역자극성 단백질은 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 세포질 도메인 또는 이의 충분한 부분이 결여된 공동자극성 분자이며, 이로써 절두된 공동자극성 분자는 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고 항원 제시 세포(APC)에 역조절 신호를 할 수 없는, 면역자극성 박테리아.

청구항 185

단일 프로모터의 제어 하에 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아로서,

치료 생성물은 하기 중에서 선택되고:

a) 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질;

b) 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 단백질, 또는 유형 I IFN의 발현을 증가시키도록 증가된 활성을 갖는 이의 변이체, 또는 유형 I IFN의 항시적 발현을 초래하는 이의 변이체 중 하나 이상; 및

c) 항암 항체 또는 이의 항원-결합 부분;

인코딩 핵산은 IRES 서열 또는 2A 펩타이드에 의해 분리되고, 각각의 생성물을 인코딩하는 각각의 핵산은 선택적으로 신호 서열을 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결되며, 이로써 인코딩된 mRNA의 번역 시, 각각의 생성물은 박테리아 및/또는 플라스미드를 포함하는 세포로부터 별개로 발현되고 분비되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 186

제185항에 있어서, 면역자극성 단백질은 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 세포질 도메인 또는 이의 충분한 부분이 결여된 공동자극성 분자이며, 이로써 절두된 공동자극성 분자는 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고 항원 제시 세포(APC)에 역조절 신호를 할 수 없는, 면역자극성 박테리아.

청구항 187

제1항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 사이토카인, 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질, 공동자극성 분자, 및 항암 항체 또는 이의 항원-결합 부분 중에서 선택되는 적어도 2개의 치료 생성물을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 188

제1항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 사이토카인, 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질, 공동자극성 분자, 및 항암 항체 또는 이의 항원-결합 부분 중에서 선택되는 적어도 2개의 치료 생성물을 인코딩하고 또한 항원 또는 항원 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 189

제188항에 있어서, 항원은 종양-연관 항원인, 면역자극성 박테리아.

청구항 190

제189항에 있어서, 종양-연관 항원은 종양태아(oncofetal) 항원, 종양바이러스(oncoviral) 항원, 및 과발현/축적된 항원, 암-고환(cancer-Testis) 항원, 선형 제한(linear restricted) 항원, 돌연변이화된 항원, 번역후 변경된 항원, 또는 이디오타입(idiotypic) 항원인, 면역자극성 박테리아.

청구항 191

제190항에 있어서, 종양-연관 항원은 하기 항원 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아:

종양-연관 항원(TAA)의 범주	TAA 의 명칭 / 계열 명칭
종양태아	암배아 항원 (CEA)
	미성숙 라미닌 수용체
	종양-연관 당단백질 72 (TAG-72)
종양바이러스	HPV E6, HPV E7
과발현/축적	BING-4
	표피 성장 인자 수용체 (EGFR)
	윌름 종양 단백질
	칼슘-활성화된 클로라이드 채널 2
	사이클린-B1
	9D7
	상피 세포 접착 분자 (EpCAM)
	에프린 유형-A 수용체 3 (EphA3)
	인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2/Neu)
	텔로머라제
	중피종
	위암-연관 단백질 티로신 포스파타제 1 (SAP-1)
	서바이빈
암-고환	BAGE (B 흑색종 항원) 계열
	CAGE 계열
	GAGE 계열
	MAGE (흑색종 항원) 계열
	SAGE (육종 항원) 계열
	PAGE 계열
	XAGE 계열
	CT9, CT10
	뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 (NY-ESO-1), LAGE-1
	흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원 (PRAME)
	활액막 육종/X 절단점 2 (SSX-2)
계열-제약	T-세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 1 (Melan-A/MART-1)

	gp100/Pmel17
	티로시나제
	티로시나제 관련 단백질 (TRP)-1, TRP-2
	P.poly 펩타이드
	멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)
	전립선-특이적 항원 (PSA)
돌연변이	β-카테닌
	BRCA1, BRCA2
	사이클린 의존적 키나제 4 (CDK4)
	만성 골수원성 백혈병 종양 항원 66 (CML66)
	피브로넥틴
	T-세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 2 (MART-2)
	p53
	Ras
	TGF-β 수용체 유형 II (TGF-βRII)
번역후 변경	뮤신 1, 세포 표면 연관 (MUC1)
이디오타입	면역글로불린(Ig), T-세포 수용체 (TCR)

청구항 192

제1항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 항암 치료제인, 면역자극성 박테리아.

청구항 193

제192항에 있어서, 인코딩된 페이로드(payload)는 진핵 프로모터의 제어 하에 발현되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 194

제1항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아가 플라젤린$^-$, *asd*$^-$, *msbB*$^-$, *pagP*$^-$, 및 *csgD*$^-$이거나, *ansB*$^-$, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$, 및 *pagP*$^-$로 되는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 195

제194항에 있어서, 박테리아가 *thyA*$^-$, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$, 및 *pagP*$^-$로 되는 게놈 변형을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 196

제1항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 암 또는 병원체로부터의 감염을 치료하거나 예방하기 위한 백신인, 면역자극성 박테리아.

청구항 197

제196항에 있어서, 인코딩된 페이로드는 원핵 프로모터의 제어 하에 발현되고, 페이로드를 인코딩하는 핵산은 박테리아 리보솜에 의해서가 아니라 진핵 리보솜에 의해 인식되는 번역 조절 신호를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 198

제1항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아 내의 플라스미드는 병원체로부터의 항원 또는 이의 단백질 또는 에피토프(들)를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 199

제198항에 있어서, 병원체는 만성 바이러스 감염, 예컨대 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상 포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-세포 백혈병 바이러스(HTLV), 호흡기 융합 바이러스(RSV), 및 홍역 바이러스에 의한 감염을 야기하거나; 대상체를 만성적으로 감염시키는 바이러스 또는 다른 병원체이거나; 급성 감염, 예컨대 만성 인플루엔자 및 코로나바이러스, 예컨대 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV: Middle East Respiratory Syndrome coronavirus), 및 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2로서, COVID-19를 야기함)에 의한 초기 감염을 야기하는 병원체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 200

제199항에 있어서, 플라스미드는 병원체로부터의 항원 또는 이의 에피토프 또는 에피토프의 조합, 예컨대 필수 바이러스 단백질로부터의 항원, 예컨대 코로나바이러스의 경우 뉴클레오캡시드로부터의 항원, M 및/또는 S 단백질을 인코딩하며, 이는 중화 항체, 및 장기-수명의 순환형 및 조직-체류 $CD8^+$ T-세포의 증강을 초래할 수 있는, 면역자극성 박테리아.

청구항 201

제198항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 항원, 에피토프, 또는 항원 단백질을 인코딩하는 핵산은 박테리아에 의해 인식되는 원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결되며; 인코딩 서열은 진핵 리보솜에 의해 인식되는 번역을 위한 조절 서열을 포함하며 이로써 박테리아는 인코딩된 RNA를 번역할 수 없거나, 인코딩 서열은 박테리아 리보솜에 의해 인식되는 샤인 달가노 서열을 포함하지 않아 인코딩된 mRNA가 번역되지 않고; mRNA는 진핵 숙주 세포에 전달되고 이러한 진핵 숙주 세포 내로 박테리아가 전달되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 202

제1항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서,

플라스미드는 단일 프로모터의 제어 하에 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩하고;

생성물 중 적어도 2개 또는 모두를 인코딩하는 핵산의 발현은 단일 프로모터의 제어 하에 있고, 각각의 생성물을 인코딩하는 핵산은 2A 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 의해 분리되며, 이로써 번역 시 각각의 생성물은 별개로 발현되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 203

제198항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 발현된 생성물(들)의 분비를 지시하는 서열을 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 204

제1항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서,

치료 생성물은 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 세포질 도메인 결실을 갖는 공동자극성 분자이고;

절두된 유전자 생성물은 세포질 도메인 결실로 인해 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고 항원 제시 세포(APC)에 역조절 신호를 할 수 없는, 면역자극성 박테리아.

청구항 205

제204항에 있어서, 세포질 도메인이 결여된 공동자극성 분자는 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, CD24L, 또는 OX40L인, 면역자극성 박테리아.

청구항 206

제1항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩하며, 적어도 하나의 생성물은 a)로부터 선택되고, 적어도 하나는 b)로부터 선택되며,

a)는 IL-2, IL-7, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-23, IL-36 감마, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15Rα-IL-15sc), IL-18, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, 인터페론-α, 인터페론-β, CCL3, CCL4, CCL5, T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하거나 이를 발휘하거나 강화시키는 단백질, CD40, CD40 리간드(CD40L), OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 4-1BB 리간드(4-1BBL), B7-CD28 계열의 구성원, TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 또는 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼계열의 구성원이고;

b)는 STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, IRF-8, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, 또는 SNRNP200인, 면역자극성 박테리아.

청구항 207

제1항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, TGF-베타 저해성 항체, TGF-베타 결합 유인 수용체, 항-IL-6 항체, 및 IL-6 결합 유인 수용체 중 하나 이상을 인코딩하거나 추가로 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 208

제1항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 생성물의 하기 조합 중 하나 이상을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아:

IL-2 및 IL-12p70;

IL-2 및 IL-21;

IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함), 여기서 Δcyt는 결실된 세포질 도메인임;

IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-15/IL-15Rα 및 IL-12p70;

IL-15/IL-15Rα 및 IL-21;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-12p70 및 IL-21;

IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-12p70 및 STING GOF 변이체;

IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-12p70 및 IL-18;

IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-12p70;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-21;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-21;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, 및 IL-12p70;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-18;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-12p70;

항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-21;

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-21;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체 및 IL-12p70;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-18;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-2, 및 IL-12p70;

CD40 작용제, IL-2, 및 IL-21;

CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-21;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-18;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

종양-연관 항원;

CD40 작용제 및 STING GOF 변이체.

청구항 209

제208항에 있어서, 종양-연관 항원을 추가로 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 210

제208항 또는 제209항에 있어서, STING 기능-획득(GOF) 변이체는 제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 표시된 것 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 211

치료 생성물의 하기 조합 중 하나 이상을 인코딩하는 면역자극성 박테리아 또는 세포:

IL-2 및 IL-12p70;

IL-2 및 IL-21;

IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함), 여기서 Δcyt는 결실된 세포질 도메인임;

IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-15/IL-15Rα 및 IL-12p70;

IL-15/IL-15Rα 및 IL-21;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-12p70 및 IL-21;

IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-12p70 및 STING GOF 변이체;

IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

IL-12p70 및 IL-18;

IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-12p70;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-21;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-21;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체 및 IL-12p70;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-18;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

TGF-β 유인 수용체 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-12p70;

항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-21;

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-21;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체 및 IL-12p70;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-18;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

항-CTLA-4 항체 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-2, 및 IL-12p70;

CD40 작용제, IL-2, 및 IL-21;

CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-21;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제 및 IL-12p70;**

CD40 작용제, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-18;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체;

CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

CD40 작용제 및 STING GOF 변이체;

이중특이적 T-세포 연계자(BiTe) + STING 단백질, BiTe + IL-15, BiTe + IL-15 + STING 단백질, 여기서 BiTe는 DLL3, EGFR, Her2, CEA, 메소텔린(Mesothelin), PSMA, EpCAM, CD74, 폴레이트 수용체, Nectin4, EphA2, CA-IX, B7H3, Siglec-15, Muc1, 또는 루이스 Y 항원을 표적화함;

종양 항원(들) + STING 기능-획득 변이체;

종양 항원(들)과 IL-15의 치료 조성물;

종양 항원(들) + IL-15 + STING 기능-획득 변이체의 치료 조성물;

하나 이상의 항원 및 IFN;

하나 이상의 항원 및 IFNα;

하나 이상의 항원, 및 IFNα2 또는 IFNα1-16;

하나 이상의 항원 및 임의의 IFNα-16;

하나 이상의 항원 및 IFN-β;

하나 이상의 항원, IFNα2, 및 IFN-β;

하나 이상의 항원 및 돌연변이 S396D를 갖는 IRF3 GOF 변이체;

하나 이상의 항원, IFNα2 또는 IFNα1-16, 및 돌연변이 S396D를 갖는 IRF3 GOF 변이체;

IFN알파2 + IRF3-S396D;

IFNα1-16 + IRF3-S396D;

IFN알파2 + IFN-베타;

IFNα1-16 + IFN-베타

단독으로 또는 다른 면역자극성 단백질과 조합되어, FLT-3L, 또는 시알리다제(sialidase), 또는 IL-12p35, 또는 아주린(Azurin), 또는 막 앵커링된 IL-2, IL-12, IL-12p35, IL-21, IL-15, FLT-3L; 및

TLR8 작용제, 여기서 작용제는 단독으로 또는 임의의 면역자극성 단백질과 조합되어 polyU 또는 polyU/G, microRNA, 또는 miR-21임.

청구항 212

제202항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 종양-연관 항원을 추가로 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 213

제1항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미드는 제191항에 제시된 바와 같은 종양-연관 항원을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 214

제1항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 이중특이적 T-세포 연계자인, 면역자극성 박테리아.

청구항 215

제214항에 있어서, 이중특이적 T-세포 연계자는 델타-유사 리간드 3(DLL3) 및 CD3에 결합하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 216

제1항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인 및 변형된 또는 변이체 STING 단백질을 인코딩하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 217

제215항에 있어서, STING 단백질은 제406항 내지 제436항 중 어느 한 항의 STING 단백질인, 면역자극성 박테리아.

청구항 218

제215항 또는 제216항에 있어서, 사이토카인은 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, 또는 IL-15, 또는 IL-12인, 면역자극성 박테리아.

청구항 219

제215항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인은 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, 또는 IL-15인,

면역자극성 박테리아.

청구항 220

제215항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, STING 단백질은 태즈메이니아 데빌(Tasmanian devil)로부터의 CTT와 함께 인간 STING 단백질을 포함하는 키메라 STING 단백질이거나, 태즈메이니아 데빌로부터의 CTT와 함께 그리고 하나 이상의 기능-획득 돌연변이를 갖는 인간 STING 단백질을 포함하는 키메라 STING인, 면역자극성 박테리아.

청구항 221

제215항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, STING 단백질은 N154S, 또는 R284G, 또는 N154S/R284G인 기능-획득 돌연변이를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 222

제214항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, STING 기능-획득 변이체는 제405항 내지 제430항 중 어느 한 항에 제시된 것 중에서 선택되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 223

제1항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 Fc 도메인을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 224

제1항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 B7 단백질 막횡단 도메인을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 225

제1항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 종양-연관 항원인, 면역자극성 박테리아.

청구항 226

제1항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 생성물은 이중특이적 T-세포 연계자 항체인, 면역자극성 박테리아.

청구항 227

제1항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 GPI-앵커(anchored)되는, 면역자극성 박테리아.

청구항 228

제1항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 인코딩된 생성물의 혈청 반감기를 증가시키는 인간 혈청 알부민 또는 이의 유도체를 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 229

제1항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 치료 생성물은 콜라겐에 대한 융합을 포함하는, 면역자극성 박테리아.

청구항 230

제1항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/*F*-△*purI*, 또는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/*F*-△*purI*/△*thyA*로 표기된 균주인, 면역자극성 박테리아.

청구항 231

톨-유사 수용체(TLR) 2, 4 및 5에 의한 반응이 게놈 변형을 갖지 않는 박테리아와 비교하여 감소되는 게놈 변형

을 포함하는 게놈 변형된 박테리아로서,

박테리아는 필요한 영양소 또는 인자에 대해 영양 요구성이 되는 추가의 게놈 변형을 포함하며, 따라서 이는 진핵 숙주에서 복제할 수 없으나 영양소 또는 인자와 함께 공급될 때 *시험관내에서* 복제할 수 있으며;

박테리아는 생성물을 인코딩하는 핵산을 함유하는 플라스미드를 포함하거나, 생성물을 인코딩하는 RNA를 포함하고;

핵산 또는 RNA에 의해 인코딩된 생성물은 항원 서열 또는 병원성 바이러스, 박테리아, 또는 기생충인 병원체로부터의 서열이거나, 종양 항원이며, 이로써 숙주에서 인코딩된 항원의 발현 시, 숙주는 병원성 바이러스, 박테리아, 기생충, 또는 종양 항원에 대한 면역-보호 반응 또는 면역화 반응을 발달시키거나, 생성물은 치료 생성물이며;

항원 서열(들)의 발현은 원핵 프로모터의 제어 하에 있어서, 항원(들)을 인코딩하는 RNA가 박테리아에서 생성되고;

항원을 인코딩하는 핵산은 박테리아 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지만 진핵 숙주 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지 않는 조절 서열을 포함하며, 이로써 번역은 박테리아에서 전사로부터 분리되며;

생성된 박테리아는 진핵 대상체에게 투여될 때 식세포를 감염시키기 위해 선택되고, 핵산을 RNA가 번역되는 식세포 내로 전달하는, 박테리아.

청구항 232

제231항에 있어서, 항원 서열(들)을 인코딩하는 핵산은 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 포함하며, 이로써 숙주 세포 번역은 용이하게 되거나 증강되고, 박테리아 번역은 저해되거나 방지되는, 박테리아.

청구항 233

제232항에 있어서, IRES는 혈관 내피 성장 인자 및 유형 1 콜라겐 유도적 단백질(VCIP) IRES인, 박테리아.

청구항 234

제232항 또는 제233항에 있어서, 항원(들)을 인코딩하는 핵산은 박테리아에서 번역을 저해하거나 감소시키고 진핵 숙주에서 번역을 허용하고 선택적으로 촉진하거나 증강시키는 VCIP 또는 다른 IRES를 포함하는, 박테리아.

청구항 235

제232항 또는 제233항에 있어서, IRES 또는 VCIP IRES는 프로모터의 3' 및 항원(들) 코딩 서열의 5'인 위치에서 플라스미드에 포함되는, 박테리아.

청구항 236

제233항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, VCIP IRES의 서열은 SEQ ID NO: 434로 표시되는, 박테리아.

청구항 237

제231항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 병원체는 박테리아 또는 바이러스인, 박테리아.

청구항 238

제231항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, 인코딩된 항원은 종양 항원인, 박테리아.

청구항 239

제231항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 바이러스 감염 또는 박테리아 감염을 예방하거나 치료하기 위한 백신인, 박테리아.

청구항 240

제236항에 있어서, 병원체는 만성 바이러스 감염을 야기하는 바이러스 중에서 선택되는, 박테리아.

청구항 241

제240항에 있어서, 감염은 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상 포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-세포 백혈병 바이러스(HTLV), 호흡기 융합 바이러스(RSV), 홍역 바이러스, 및 대상체를 만성적으로 감염시키는 다른 바이러스에 의한 감염 중에서 선택되는, 박테리아.

청구항 242

제239항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 감염은 급성 감염인, 박테리아.

청구항 243

제242항에 있어서, 감염은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 또는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2로서, COVID-19를 야기함)에 의한 감염인, 박테리아.

청구항 244

제231항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 병원체는 *에스케리키아*(*Escherichia*), *스타필로콕커스*(*Staphylococcus*), *슈도모나스*(*Pseudomonas*), *액티노박테리아*(*Actinobacteria*), *아캐오박테리아*(*Archaeobacteria*), *미코박테리아*(*Mycobacterium*) 또는 *포르피로모나스*(*Porphyromonas*)의 종인, 박테리아.

청구항 245

제231항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 병원체는 *피. 긴기발리스*(*P. gingivalis*), SARS-CoV, 또는 *이. 콜라이*(*E. coli*), 또는 해모필루스(Haemophilus) 인플루엔자인, 박테리아.

청구항 246

제231항 내지 제245항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 내 플라스미드는 면역자극성 단백질 또는 다른 아쥬반트를 추가로 인코딩하는, 박테리아.

청구항 247

제246항에 있어서, 플라스미드는 면역자극성 단백질 또는 다른 치료 단백질의 조합을 인코딩하는, 박테리아.

청구항 248

제247항에 있어서, 면역자극성 단백질은 STING 단백질인, 박테리아.

청구항 249

제248항에 있어서, STING 단백질은 기능-획득 돌연변이를 포함하고/하거나 키메라 STING 단백질인, 박테리아.

청구항 250

제248항 또는 제249항에 있어서, STING 단백질은 제406항 내지 제436항 중 어느 한 항의 STING 단백질인, 박테리아.

청구항 251

제231항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 치료 생성물의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는, 박테리아.

청구항 252

제250항에 있어서, 제1항 내지 제251항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 면역자극성 박테리아인, 박테리아.

청구항 253

제231항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서,

면역자극성 단백질(들) 및/또는 다른 치료 단백질은 박테리아에 의해 인식되는 원핵 프로모터의 제어 하에 항원의 발현과 함께 다시스트론성(polycistronic) 서열의 부분으로서 플라스미드에서 인코딩되거나;

면역자극성 단백질(들) 및/또는 다른 치료 단백질은 진핵 숙주에 의해 인식되는 진핵 프로모터의 제어 하에 플라스미드 상에서 인코딩되는, 박테리아.

청구항 254

제231항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *시험관내에서* 박테리아를 배양함으로써 생성되는 원핵 프로모터의 제어 하에 발현되는 항원(들) 및 임의의 다른 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는, 박테리아.

청구항 255

제231항 내지 제254항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아가 편모가 결여되고 펜타-아실화된 지질 A를 갖는 LPS를 생성하게 되는 게놈 변형을 포함하는, 박테리아.

청구항 256

제231항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, *asd*$^-$ 또는 *thyA*$^-$ 또는 둘 다인, 박테리아.

청구항 257

제231항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, o 아데노신 영양 요구체, 및 *csgD*$^-$ 중 하나 또는 둘 다이고, 선택적으로 *ansB*$^-$인, 박테리아.

청구항 258

제231항 내지 제257항 중 어느 한 항에 있어서, TLR8 작용제를 인코딩하는 핵산을 포함하는, 박테리아.

청구항 259

제258항에 있어서, TLR8 작용제는 polyU, polyU/G, microRNA, 또는 miR-21인, 박테리아.

청구항 260

제231항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, *msbB*$^-$/*pagP*$^-$이며, 편모가 결여되고, *asd*$^-$ 또는 *thyA*$^-$이거나 *asd*$^-$와 *thyA*$^-$ 둘 다인, 박테리아.

청구항 261

제1항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, *에스케리키아*, *리스테리아*(*Listeria*), *미코박테리아*, 또는 *살모넬라*의 종 또는 균주인, 박테리아.

청구항 262

제1항 내지 제261항 중 어느 한 항에 있어서, *살모넬라*의 균주인, 박테리아.

청구항 263

제262항에 있어서, *살모넬라 티피무리움*(*Salmonella typhimurium*) 균주인, 박테리아.

청구항 264

제262항 또는 제263항에 있어서, 비변형된 *살모넬라*는 야생형 균주이거나, 비변형된 *살모넬라* 균주는 약독화되는, 박테리아.

청구항 265

제1항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 균주 VNP20009 또는 YS1646으로부터, 또는 균주 ATCC 14028로부터, 또는 균주 ATCC 14028의 모든 식별화 특징(identifying characteristic)을 갖는 균주로부터 유래

되는, 박테리아.

청구항 266

제231항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 게놈 변형은 유전자에서의 결실, 삽입, 방해, 및 다른 변형 중 하나 이상이며, 이로써 유전자에 의해 인코딩되는 생성물은 생성되지 않거나, 생성된 바와 같이 비활성인, 박테리아.

청구항 267

제231항 내지 제266항 중 어느 한 항에 있어서, 원핵 프로모터는 박테리아 프로모터 또는 박테리아 파지 프로모터인, 박테리아.

청구항 268

제231항 내지 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 숙주는 인간인, 박테리아.

청구항 269

대상체에게 투여되어 대상체에서 적응 면역 반응을 이끌어내기 위한 양으로 비히클에 제1항 내지 제268항 중 어느 한 항의 박테리아를 포함하는 백신.

청구항 270

제269항에 있어서, 에어로졸로서, 또는 분말로서, 또는 정제 또는 좌제로서 제형화되는, 백신.

청구항 271

제269항 또는 제270항에 있어서, 경구 투여, 비내 투여, 흡입 투여, 직장 투여, 질 투여, 안내 투여, 두개내 투여, 피부내 투여, 또는 근육내 투여를 위해 제형화되는, 백신.

청구항 272

바이러스로부터의 단백질 또는 비내 또는 폐 흡입을 위해 제형화된 바이러스 코로나 바이러스로부터의 단백질로부터의 항원을 인코딩하는 핵산을 포함하는 백신으로서, 여기서 백신은 TRL2를 충분히 활성화시키지 못하며, 이로써 백신은 유형 I IFN을 유도하는, 백신.

청구항 273

제272항에 있어서, 바이러스는 코로나 바이러스인, 백신.

청구항 274

제273항에 있어서, 바이러스는 SARS-COV2인 코로나 바이러스인, 백신.

청구항 275

제272항 내지 제274항 중 어느 한 항에 있어서, 유형 I IFN을 저하시키거나 저해하기에 충분한 TLR4 및/또는 TRL5 반응을 또한 활성화시키지 않는, 백신.

청구항 276

병원체 또는 종양으로부터의 항원 또는 단백질 또는 에피토프를 인코딩하는 핵산을 포함하는 백신으로서,

백신은 병원체 또는 종양에 대한 면역 반응을 이끌어내며;

병원체는 폐 및/또는 비인두(naso-pharynx)를 포함한 호흡계를 감염시키는 호흡기 병원체이고;

종양은 폐 종양이며;

백신은 코 또는 폐를 통한 흡입을 위해 제형화되고;

백신은 핵산을 포식성 대식세포에 전달하여 면역억제성 포식성 대식세포를, CD8+ T-세포에의 현장(in situ) 항

원 교차-제시를 할 수 있고 림프절로 이동하여 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 프라이밍할 수 있는 면역자극성 포식성 대식세포로 전환시키는, 백신.

청구항 277

제276항에 있어서, 유형 I IFN을 저하시키거나 저해하기에 충분한 TLR4 및/또는 TRL5 반응을 또한 활성화시키지 않는, 백신.

청구항 278

제276항 또는 제277항에 있어서, 유형 I IFN을 저하시키거나 저해하기에 충분할 정도로 TLR2/4/5를 활성화시키지 않는, 백신.

청구항 279

제272항 내지 제278항 중 어느 한 항에 있어서, 백신은 바이러스에 대한 면역 반응을 이끌어내는, 백신.

청구항 280

제279항에 있어서, 병원체는 바이러스인, 백신.

청구항 281

제269항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 병원체는 RNA 바이러스인, 백신.

청구항 282

제281항에 있어서, 바이러스는 코로나 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스인, 백신.

청구항 283

제282항에 있어서, 바이러스는 코로나 바이러스인, 백신.

청구항 284

제283항에 있어서, 바이러스는 SARS 바이러스인, 백신.

청구항 285

제284항에 있어서, 바이러스는 SARS-COV2 바이러스인, 백신.

청구항 286

제269항 내지 제285항 중 어느 한 항에 있어서, 항원, 단백질 또는 에피토프는 바이러스 항원, 단백질 또는 에피토프인, 백신.

청구항 287

제286항에 있어서, 단백질은 캡시드 또는 뉴클레오단백질인, 백신.

청구항 288

제269항 내지 제287항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스는 SARS-COV2이고, 단백질 또는 에피토프는 S1, S2, 외피(E), 막(M), 뉴클레오캡시드(N), ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, 및 ORF8에 의해 지정되거나 인코딩되는 단백질이거나 이로부터의 것인, 백신.

청구항 289

제269항 내지 제288항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스는 SARS-COV2이고, 단백질 또는 에피토프는 스파이크(spike) 단백질이거나 이로부터의 것인, 백신.

청구항 290

제269항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 백신은 단백질 또는 항원을 인코딩하는 mRNA를 포함하는, 백신.

청구항 291

제290항에 있어서, mRNA는 mRNA의 안정성 또는 인코딩된 단백질 또는 항원 또는 에피토프의 안정성을 증가시키도록 변형되는, 백신.

청구항 292

제290항에 있어서, mRNA는 변형된 바이러스 단백질을 인코딩하며, 여기서 변형은 단백질의 구조를 변경시켜 숙주 세포 단백질과의 상호작용을 변경시키는, 백신.

청구항 293

제269항 내지 제292항 중 어느 한 항에 있어서, 병원체로부터의 항원 또는 단백질을 인코딩하거나, 종양 항원을 인코딩하는 핵산을 포함하는 전달 비히클인, 백신.

청구항 294

제269항 내지 제293항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아를 포함하고, 여기서 박테리아는 게놈 변형을 포함하며, 이로써 이러한 박테리아는 펜타-아실화된 지질다당류(LPS)를 갖고, 편모가 결여되며, 야생형 박테리아는 편모를 갖는, 백신.

청구항 295

제294항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 게놈 변형(들)을 가지며, 이로써 이러한 박테리아는 컬리 핌브리애를 생성하지 않는, 백신.

청구항 296

제294항 또는 제295항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 병원체에 대한 항원 또는 종양 항원을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는, 백신.

청구항 297

제296항에 있어서, 플라스미드는 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 부분인 치료 생성물을 인코딩하는, 백신.

청구항 298

제297항에 있어서, 생성물은 STING, IRF3, IRF5, IRF7, IRF8, MDA5, RIG-I 또는 기능-획득 돌연변이를 포함하는 이의 변형된 형태이며, 이로써 유형 I 인터페론의 발현은 항시적인, 백신.

청구항 299

제1항 내지 제298항 중 어느 한 항에 있어서, 약독화된 박테리아이거나 그람-음성 박테리아이거나, 그람-양성 박테리아인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 300

제1항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *살모넬라*, *시겔라(Shigella)*, *이. 콜라이*, *비피도박테리아(Bifidobacteriae)*, *리케치아(Rickettsia)*, *비브리오(Vibrio)*, *리스테리아*, *클레브시엘라(Klebsiella)*, *보르데텔라(Bordetella)*, *네이쎄리아(Neisseria)*, *애로모나스(Aeromonas)*, *프란치셀라(Francisella)*, *콜레라(Cholera)*, *코리네박테리움(Corynebacterium)*, *시트로박터(Citrobacter)*, *클라미디아(Chlamydia)*, *해모필루스*, *브루셀라(Brucella)*, *미코박테리움(Mycobacterium)*, *미코플라즈마(Mycoplasma)*, *레지오넬라(Legionella)*, *로도콕커스(Rhodococcus)*, *슈도모나스*, *헬리코박터(Helicobacter)*, *바실러스(Bacillus)*, 또는 *에리시펠로트릭스(Erysipelothrix)*, 또는 *아캐오박테리아*의 균주, 또는 박테리아 균주의 임의의 전술한 목록의 이의 약독화된 균주 또는 이의 변형된 균주인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 301

제1항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 *리케치아 리케치애(Rickettsia rickettsiae)*, *리케치아 프로와제키이(Rickettsia prowazekii)*, *리케치아 쯔쯔가무시(Rickettsia tsutsugamuchi)*, *리케치아 무세리(Rickettsia mooseri)*, *리케치아 시비리카(Rickettsia sibirica)*, *보르데텔라 브론키셉티카(Bordetella bronchiseptica)*, *네이쎄리아 메닌지티디스(Neisseria meningitidis)*, *네이쎄리아 고노로애(Neisseria gonorrhoeae)*, *애로모나스 유크레노필라(Aeromonas eucrenophila)*, *애로모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida)*, *프란치셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis)*, *코리네박테리움 슈도투베르쿨로시스(Corynebacterium pseudotuberculosis)*, *시트로박터 프룬디이(Citrobacter freundii)*, *클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae)*, *해모필루스 솜누스(Haemophilus somnus)*, *브루셀라 아보르투스(Brucella abortus)*, *미코박테리움 인트라셀룰라레(Mycobacterium intracellulare)*, *미코박테리움 튜버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)*, *스타필로콕커스 아우레우스(Staphylococcus aureus)*, *레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila)*, *로도콕커스 에퀴(Rhodococcus equi)*, *슈도모나스 애루기노사(Pseudomonas aeruginosa)*, *헬리코박터 무스텔래(Helicobacter mustelae)*, *비브리오 콜레라(Vibrio cholerae)*, *바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)*, *에리시펠로트릭스 루시오파시애(Erysipelothrix rhusiopathiae)*, *예르시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica)*, *로칼리마애 퀸타나(Rochalimaea quintana)*, 또는 *애그로박테리움 투메르파시움(Agrobacterium tumerfacium)*인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 302

제1항 내지 제301항 중 어느 한 항에 있어서, *살모넬라*의 균주인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 303

제302항에 있어서, *살모넬라 티피무리움* 균주인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 304

제302항 또는 제303항에 있어서, 비변형된 *살모넬라*는 야생형 균주인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 305

제302항 또는 제303항에 있어서, 비변형된 *살모넬라* 균주는 약독화되는, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 306

제1항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 균주 VNP20009 또는 YS1646, 또는 균주 ATCC 14028, 또는 균주 ATCC 14028의 식별 특징을 모두 갖는 균주로부터 유래되는, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 307

제301항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, $ansB^-$, asd^-, $csgD^-$, $purI^-$, $msbB^-$, 플라젤린$^-$, 및 $pagP^-$이거나 $ansB^-$, $thyA^-$, $csgD^-$, $purI^-$, $msbB^-$, 플라젤린$^-$, 및 *pagP*인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 308

제1항 내지 제307항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아는 보체 사멸화 내성(*rck*) 유전자를 인코딩하고 발현하는, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 309

제308항에 있어서, *rck* 유전자는 *살모넬라 rck* 유전자인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 310

제308항 또는 제309항에 있어서, *이. 콜라이* 균주인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 311

제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아 또는 백신의 박테리아를 약학적으로 허용 가능한 비히클에 포함하는 약학적 조성물.

청구항 312

제311항에 있어서, 전신 투여를 위해 제형화되는, 약학적 조성물.

청구항 313

제311항 또는 제312항에 있어서, 비경구 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 종양내 투여, 복강내 투여, 경구 투여, 직장 투여, 질 투여, 안내 투여, 피부내 투여, 두개내 투여, 점막 투여, 또는 입이나 코 내로의 흡입에 의한 투여를 위해 제형화되는, 약학적 조성물.

청구항 314

대상체에서 고형 종양 또는 혈액학적 악성물을 포함한 암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아, 박테리아 또는 백신, 또는 제311항 내지 제313 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 315

제269항 내지 제298항 중 어느 한 항의 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 면역화 방법.

청구항 316

제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아, 박테리아, 바이러스, 또는 백신 또는 제311항 내지 제313항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 용도로서, 대상체에서 고형 종양 또는 혈액학적 악성물을 포함한 암의 치료를 위한, 용도.

청구항 317

대상체에서 고형 종양 또는 혈액학적 악성물을 포함한 암의 치료 또는 면역화에 사용하기 위한, 또는 병원체에 대한 면역화에 사용하기 위한, 제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아, 박테리아, 바이러스, 또는 백신 또는 제311항 내지 제313항 중 어느 한 항의 약학적 조성물.

청구항 318

제314항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 약학적 조성물, 또는 백신.

청구항 319

제314항 내지 제318항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 고형 종양을 포함하거나 혈액학적 악성물을 포함하는 암을 갖는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 약학적 조성물, 또는 백신.

청구항 320

제314항 내지 제319항 중 어느 한 항에 있어서, 치료는 제2 항암 제제 또는 치료가 투여되는 병용 요법을 포함하는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 약학적 조성물, 또는 백신.

청구항 321

제320항에 있어서, 제2 항암 제제 또는 치료는 면역자극성 박테리아 또는 약학적 조성물 전에, 이와 동시에, 이후에, 또는 간헐적으로 투여되는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 322

제320항 또는 제321항에 있어서, 제2 항암 제제 또는 치료는 면역요법인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백

신, 또는 약학적 조성물.

청구항 323

제314항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아, 약학적 조성물, 또는 백신의 투여는 비경구인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 324

제314항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아, 약학적 조성물, 또는 백신의 투여는 경구, 또는 직장(rectal)이거나, 폐 및/또는 코 내로, 또는 점막에, 또는 두개내로, 피부내로 또는 종양내로 에어로졸에 의한 것인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 325

제314항 내지 제324항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물의 투여는 정맥내, 근육내, 비내, 또는 피하인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 326

제314항 내지 제325항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 백혈병; 림프종; 위암; 및 유방, 심장, 폐, 소장, 결장, 비장, 신장, 방광, 두경부, 결장직장, 난소, 전립선, 뇌, 췌장, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 흉선, 자궁, 고환, 자궁경부, 및 간의 암 중에서 선택되는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 약학적 조성물, 또는 백신.

청구항 327

제314항 내지 제326항 중 어느 한 항에 있어서, 면역요법은 항-PD-1, 또는 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 항체의 투여를 포함하는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 328

제314항 내지 제327항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 *살모넬라*, *시겔라*, *리스테리아*, 또는 *이. 콜라이* 종인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 329

제314항 내지 제328항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 *살모넬라* 종인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 330

제314항 내지 제329항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 *살모넬라 티피무리움* 균주인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 331

제314항 내지 제330항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아의 투여는 복강내 또는 종양내 투여에 의한 것인, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 332

제314항 내지 제331항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 전이암을 갖는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 333

제314항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항암 치료를 투여하는 단계를 포함하고, 제2 치료는 항-PD-1, 항-CTLA-4, 항-PD-L1, 항-IL-6, 항-Siglec-15, 항-VEGF, 항-CD73, 및 항-CD38 항체 중에서 선택되는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 334

제314항 내지 제333항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 또는 추가 항암 치료를 투여하는 단계를 포함하고, 제2 또는 추가 치료는 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제(PARP) 저해제, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 저해제, 화학치료제, 항-EGFR 항체, CAR-T-세포, 항-Her2 항체, 항-메조텔린 항체, 및 항-B-세포 성숙화 항원(BCMA) 항체 중에서 선택되는, 방법, 용도, 면역자극성 박테리아, 백신, 또는 약학적 조성물.

청구항 335

바이러스 감염 또는 또 다른 감염성 병원체에 의한 감염의 치료 방법으로서, 제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아 또는 백신을 투여하는 단계를 포함하며, 면역자극성 박테리아 또는 백신은 바이러스 또는 병원체로부터의 항원, 단백질, 또는 이의 에피토프를 포함하거나 인코딩하는, 방법.

청구항 336

제335항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 박테리아에 의해 인식되는 프로모터의 제어 하에 항원, 단백질 또는 이의 에피토프를 인코딩하고; 면역자극성 박테리아는 이러한 박테리아가 *생체내에서* 복제하지 않게 되는 게놈 변형(들)을 포함하는, 방법.

청구항 337

제1항 내지 제310항 중 어느 한 항, 또는 제335항 또는 제336항에 있어서, 바이러스 감염 또는 또 다른 감염성 병원체에 의한 감염을 치료하는 데 사용하기 위한, 면역자극성 박테리아, 백신 또는 방법.

청구항 338

바이러스 또는 다른 감염성 병원체에 의한 감염을 예방하기 위해(이의 위험을 감소시키기 위해) 면역화시키는 방법으로서, 면역화 용량의 제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아 또는 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 면역자극성 박테리아에 의해 인코딩된 생성물은 항바이러스 또는 항병원체성 치료제 또는 항원, 에피토프, 또는 단백질인, 방법.

청구항 339

제1항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 또는 또 다른 감염성 병원체에 의한 감염에 대해 면역화하기 위해, 이에 대해 보호하기 위해, 또는 이의 중증도를 감소시키거나 이의 위험을 감소시키기 위해 사용하기 위한 것이고, 면역자극성 박테리아에 의해 인코딩되는 생성물은 항바이러스 또는 항병원체성 치료제 또는 항원, 에피토프, 또는 단백질인, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 340

제335항 내지 제339항 중 어느 한 항에 있어서, 감염성 병원체는 바이러스인, 면역자극성 박테리아, 백신 또는 방법.

청구항 341

제1항 내지 제340항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 박테리아에 존재하는 폴리머라제에 의해 인식되는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 RNA를 인코딩하는 플라스미드를 포함하며, 여기서 진핵 숙주 세포의 감염 시, RNA는 진핵 숙주의 세포질 내로 방출되는, 면역자극성 박테리아, 백신, 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

청구항 342

제341항에 있어서, 진핵 숙주의 세포질 내로 방출되는 RNA는 mRNA인, 면역자극성 박테리아, 백신, 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

청구항 343

제341항 또는 제342항에 있어서, 프로모터는 유도적 프로모터인, 면역자극성 박테리아, 백신, 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

청구항 344

제341항 내지 제343항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 또한 프로모터를 인식하는 폴리머라제를 인코딩하는, 면역자극성 박테리아, 백신, 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

청구항 345

제341항 내지 제344항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제인, 면역자극성 박테리아, 백신, 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

청구항 346

제341항 내지 제345항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 박테리아는 asd^- 또는 $thyA^-$ 또는 둘 다인, 면역자극성 박테리아, 백신, 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

청구항 347

제1항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 바이러스 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 것이며, 박테리아는 항암 또는 항바이러스 치료 생성물을 인코딩하거나, 항원, 단백질 또는 에피토프 또는 이의 조합은 바이러스 또는 종양을 형성하는, 면역자극성 박테리아 또는 백신.

청구항 348

암 또는 바이러스 감염의 치료 방법으로서, 암 및/또는 바이러스 감염을 갖는 대상체에게 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항의 RNA 전달 시스템, 또는 종양-연관 항원 또는 바이러스 항원, 단백질 또는 에피토프를 인코딩하는 제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아 또는 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 349

M2 대식세포를 M1 또는 M1-유사 표현형으로 전환시키는 방법으로서, 항바이러스 또는 항종양 면역 반응을 증강시킴으로써 치료되는 병태, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 제38항 내지 제82항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 350

제38항 내지 제82항 중 어느 한 항, 또는 제38항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 항바이러스 또는 항종양 면역 반응을 증강시킴으로써 치료되는 병태, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 M2 대식세포를 M1 또는 M1-유사 표현형 대식세포로 전환시키기 위한, 면역자극성 박테리아의 용도 또는 면역자극성 박테리아.

청구항 351

제349항 또는 제350항에 있어서, 질환, 장애 또는 병태는 암 및/또는 바이러스 또는 다른 병원체 감염인, 방법, 용도 또는 박테리아.

청구항 352

치료 생성물을 인코딩하는 RNA를 전달하는 방법으로서, 질환, 병태 또는 장애의 치료를 위해 제16항 내지 제25항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 353

제68항 내지 제82항 중 어느 한 항 또는 제68항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 질환, 병태 또는 장애의 치료를 위한 치료 생성물을 인코딩하는 RNA를 전달하는 데 사용하기 위한, 면역자극성 박테리아의 용도, 또는 면역자극성 박테리아.

청구항 354

제352항 또는 제353항에 있어서, 질환, 장애 또는 병태는 암 및/또는 바이러스 또는 다른 병원체 감염인, 방법, 용도 또는 박테리아.

청구항 355

제231항 내지 제310항 중 어느 한 항의 박테리아를 약학적으로 허용 가능한 비히클에 포함하는 약학적 조성물.

청구항 356

제355항에 있어서, 백신으로서, 액체, 분말 또는 정제로서 제형화되는, 약학적 조성물.

청구항 357

제231항 내지 제313항, 제355항 및 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 질환, 병태, 감염 또는 암을 치료하거나 예방하는(발증시킬 위험을 감소시키는) 데 사용하기 위한, 박테리아 또는 약학적 조성물.

청구항 358

질환, 병태, 감염 또는 암을 치료하거나 예방하는(발증시킬 위험을 감소시키는) 방법으로서, 제231항 내지 제313항, 제355항 및 제356항 중 어느 한 항의 박테리아 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 359

RNA를 전달하는 방법으로서, 제231항 내지 제310항 및 제355항 내지 제357항 중 어느 한 항의 박테리아 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 360

제231항 내지 제310항 및 제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, RNA를 전달하는 데 사용하기 위한, 박테리아.

청구항 361

제359항 또는 제360항에 있어서, RNA는 mRNA인, 방법 또는 박테리아.

청구항 362

제231항 내지 제310항 및 제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 생성물은 치료 생성물이고, 박테리아 내 플라스미드는 생성물을 인코딩하여, 박테리아에 의해 번역되지 않는 mRNA를 생성하는, 박테리아.

청구항 363

RNA를 대상체에게 전달하는 방법으로서, 제362항의 박테리아를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 364

제362항에 있어서, RNA를 대상체에게 전달하는 데 사용하기 위한, 박테리아.

청구항 365

RNA를 대상체에게 전달하는 데 사용하기 위한 박테리아로서, 이종성 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하며,

이종성 생성물을 인코딩하는 핵산은 박테리아에 의해 인식되는 프로모터에 연결되고;

생성물을 인코딩하는 핵산은 박테리아에 의해 인식되지 않는 번역을 위한 진핵 서열을 포함하며, 이로써 박테리아는 RNA를 생성하나 RNA를 번역하지 않는, 박테리아.

청구항 366

제365항에 있어서, 제1항 내지 제310항 중 어느 한 항의 면역자극성 박테리아이고, RNA를 인코딩하는 핵산은 치료 생성물을 인코딩하는, 박테리아.

청구항 367

제365항 또는 제366항에 있어서, 박테리아는 항원 또는 단백질에 대한 면역 반응을 이끌어내기 위해 병원체 또

는 종양으로부터의 항원 또는 단백질을 인코딩하는, 박테리아.

청구항 368

비-인간 종으로부터의 변형된 인터페론 유전자 자극제(STING) 단백질로서, 비-인간 STING은 인간 STING과 비교하여 더 낮은 NF-κB 신호전달 활성, 및 선택적으로 인간 STING과 비교하여 더 높은 유형 I 인터페론(IFN) 경로 신호전달 활성을 갖는 것이며,

비-인간 STING 단백질은 돌연변이 또는 돌연변이들을 포함하도록 변형되어, 세포기질 핵산의 부재 하에 증가된 활성을 갖거나 항시적으로 작용하고;

돌연변이는 아미노산의 삽입, 결실, 및/또는 대체이며;

STING 단백질은 선택적으로 TRAF6 결합 부위의 결실 또는 방해를 갖는, 변형된 STING 단백질.

청구항 369

비-인간 종으로부터의 변형된 인터페론 유전자 자극제(STING) 단백질, 또는 키메라 인간 STING 단백질 및 이의 변형으로서, 인코딩된 STING 단백질의 항시적 활성화 및/또는 증강된 민감도, 또는 내인성 리간드에 대한 증가된 친화도 또는 결합을 초래하는 기능-획득(GOF)과 관련된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 이로써 STING 단백질은 아미노산 또는 아미노산들의 삽입, 결실, 및 대체 중 하나 이상에 의해 변형되며;

STING 단백질은 인간 STING과 비교하여, IFN-베타 신호전달 활성, 및 활성화된 B 세포(NF-κB) 신호전달 활성의 약독화된 핵 인자 카파-경쇄-인핸서를 갖고;

돌연변이 또는 돌연변이들은 IFN-베타 생성을 유도하는 데 있어서 증가된 STING 활성 또는 항시적 활성을 초래하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 370

제368항 또는 제369항에 있어서, 인간 STING 단백질은 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 서열을 포함하거나, 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 아미노산의 서열과 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 이의 인간 대립유전자(allelic) 변이체인, 변형된 STING 단백질.

청구항 371

제368항 내지 제370항 중 어느 한 항에 있어서,

STING 단백질은 제1 종으로부터의 STING 단백질 내 C-말단 테일(CTT) 영역으로부터 제2 종으로부터의 STING 단백질의 CTT로의 대체를 포함하는 키메라이며;

제2 종의 STING 단백질은 인간 STING의 NF-κB 신호전달 활성보다 더 낮은 NF-κB 신호전달 활성을 갖고;

CTT 내 TRAF6 결합 부위는 선택적으로 결실되는, 변형된 STING 단백질.

청구항 372

제368항 내지 제371항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이 또는 돌연변이들은 자가-염증성 질환 STING-연관 혈관병증(SAVI: STING-associated vasculopathy)과 관련된 것에 상응하는 임의의 것인, 변형된 STING 단백질.

청구항 373

키메라인 변형된 인터페론 유전자 자극제(STING) 단백질로서, 제1 종으로부터의 STING 단백질 내 CTT(C-말단 테일) 영역으로부터 제2 종으로부터의 STING 단백질의 CTT로의 대체를 포함하며,

제2 종의 STING 단백질은 인간 STING의 NF-κB 신호전달 활성보다 더 낮은 NF-κB 신호전달 활성을 갖고;

CTT 내 TRAF6 결합 부위는 선택적으로 결실되는, 변형된 STING 단백질.

청구항 374

제368항 내지 제373항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 STING 단백질은 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 서열을 포함하거나, 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 아미노산의 서열과 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 이의

인간 대립유전자 변이체인, 변형된 STING 단백질.

청구항 375

제368항 내지 제373항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 종은 인간이고, 제2 종은 태즈메이니아 데빌, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 따오기, 실러캔스(coelacanth), 마우스, 및 은상어 중에서 선택되는, 변형된 STING 단백질.

청구항 376

제368항 내지 제375항 중 어느 한 항에 있어서, 유형 I IFN 신호전달 활성은 야생형 인간 STING 단백질의 활성의 적어도 또는 적어도 약 30%인, 변형된 STING 단백질.

청구항 377

제368항 내지 제376항 중 어느 한 항에 있어서, NF-κB 신호전달 활성은 야생형 인간 STING NF-κB 신호전달 활성보다 30% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 또는 5% 미만인, 변형된 STING 단백질.

청구항 378

제368항 내지 제377항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 종 또는 제2 종은 태즈메이니아 데빌, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 따오기, 실러캔스, 마우스, 및 은상어 중에서 선택되는, 변형된 STING 단백질.

청구항 379

제368항 내지 제378항 중 어느 한 항에 있어서, STING의 변형은 인간 STING을 기준으로 이와 정렬에 의해 인터페론병증에서 발생하는 돌연변이에 상응하는 돌연변이 또는 돌연변이들이고, 여기서 정렬이 발휘되는 인간 STING의 서열은 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시되는, 변형된 STING 단백질.

청구항 380

제368항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 테일(CTT)로부터 인간 STING의 NF-κB 신호전달 활성과 비교하여 감소된 NF-κB 신호전달 활성을 갖는 STING 단백질로부터의 CTT로의 대체를 포함하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 381

제380항에 있어서, CTT의 대체는 태즈메이니아 데빌, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 따오기, 실러캔스, 마우스, 또는 은상어 STING 단백질로부터의 것인, 변형된 STING 단백질.

청구항 382

제380항에 있어서, CTT의 대체는 태즈메이니아 데빌, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 따오기, 실러캔스, 마우스, 또는 은상어 STING 단백질로부터의 것이고, 이는 인간 STING CTT를 대체하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 383

제381항 또는 제382항에 있어서, CTT의 대체는 하기 종 중에서 선택되고, 하기 서열을 갖는, 변형된 STING 단백질:

태즈메이니아 데빌 RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF SEQ ID NO: 371,

마모셋 EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLF SEQ ID NO: 372,

소 EREVTMGSTETSVMPGSSVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF SEQ ID NO: 373,

고양이 EREVTVGSVGTSMVRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVF SEQ ID NO: 374,

타조 RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQISESDLPQPLRSDCL SEQ ID NO: 375,

야생돼지 EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQEPELLISGMEQPLPLRSDIF SEQ ID NO: 376,

박쥐 EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTLHQEPELLISGMDQPLPLRTDIF SEQ ID NO: 377,

바다소 EREEVTVGSVGTSVVPSPSSPSTSSLSQEPKLLISGMEQPLPLRTDVF SEQ ID NO: 378,

따오기 CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQPLRSDCF SEQ ID NO: 379,

실러캔스

(변이체 1) QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVC SEQ ID NO: 380,

실러캔스

(변이체 2) QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKSGF SEQ ID NO: 381,

은상어 LTEYPVAEPSNANETDCMSSEPHLMISDDPKPLRSYCP SEQ ID NO: 383, 및

마우스 EKEEVTMNAPMTSVAPPPSVLSQEPRLLISGMDQPLPLRTDLI SEQ ID NO: 384,

또는 이와 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 이러한 각각의 서열의 대립유전자 변이체.

청구항 384

제382항 또는 제383항에 있어서, 인간 CTT는 서열 EKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS(SEQ ID NO: 370)를 포함하거나, 이와 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 대립유전자 변이체인, 변형된 STING 단백질.

청구항 385

제373항 내지 제384항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 STING 단백질은, 인간 STING CTT가 태즈메이니아 데빌 STING으로부터의 CTT로 대체되는 키메라인, 변형된 STING 단백질.

청구항 386

제385항에 있어서, 태즈메이니아 데빌 STING으로부터의 C-말단 테일(CTT)은 서열: RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF(SEQ ID NO: 371)를 포함하거나, 이와 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 대립유전자 변이체인, 변형된 STING 단백질.

청구항 387

제368항 내지 제386항 중 어느 한 항에 있어서, TRAF6 결합 부위의 결실 또는 방해를 포함하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 388

제387항에 있어서, STING 단백질은 인간 STING 단백질이고, TRAF6 결합 부위는 C-말단에 아미노산 잔기 DFS를 포함하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 389

제368항 내지 제388항 중 어느 한 항에 있어서, 유형 I 인터페론 신호전달 활성을 증가시키거나, 세포기질 핵산의 부재 하에 활성을 항시적으로 만드는 변형을 포함하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 390

제389항에 있어서, 변형은 인간 STING을 기준으로 이와 정렬에 의해, 인터페론병증에서 발생하는 돌연변이에 상응하고, 여기서 인간 STING 단백질은 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 서열을 갖는, 변형된 STING 단백질.

청구항 391

제368항 내지 제390항 중 어느 한 항에 있어서, 변형은 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 인간 STING의 서열을 기준으로, S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A,

R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, 및 S324A/S326A 중 하나 이상에 상응하는 하나 이상의 아미노산 대체인, 변형된 STING 단백질.

청구항 392

제391항에 있어서, 임의의 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 인간 STING의 서열을 기준으로, C206Y 또는 R284G에 상응하는 대체를 포함하는, 변형된 STING 단백질.

청구항 393

제392항에 있어서, 태즈메이니아 데빌, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 따오기, 실러캔스, 마우스, 또는 은상어 STING 단백질인, 변형된 STING 단백질.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 우선권의 이익은 2020년 8월 12일에 출원되고 출원인이 Actym Therapeutics, Inc.이며 발명자가 Laura Hix Glickman, Christopher D. Thanos, Alexandre Charles Michel Iannello, Chris Rae, 및 Haixing Kehoe이고 발명의 명칭이 "IMMUNOSTIMULATORY BACTERIA DELIVERY PLATFORM"인 미국 임시 출원 일련 번호 63/064,869호에 대해 주장된다.

[0002] 우선권의 이익은 또한 2021년 5월 13일에 출원되고 출원인이 Actym Therapeutics, Inc.이며 발명자가 Laura Hix Glickman, Christopher D. Thanos, Alexandre Charles Michel Iannello, Chris Rae, 및 Haixing Kehoe이고 발명의 명칭이 "IMMUNOSTIMULATORY BACTERIA DELIVERY PLATFORM"인 미국 임시 출원 일련 번호 63/188,443호에 대해 주장된다.

[0003] 우선권의 이익은 또한 2021년 5월 13일에 출원되고 출원인이 Actym Therapeutics, Inc.이며 발명자가 Laura Hix Glickman, Christopher D. Thanos, Alexandre Charles Michel Iannello, Chris Rae, Haixing Kehoe, Bret Nicholas Peterson, 및 Chingnam Cheung이고 발명의 명칭이 "IMMUNOSTIMULATORY BACTERIA DELIVERY PLATFORMS AND THEIR USE FOR DELIVERY OF THERAPEUTIC PROTEINS"인 미국 출원 번호 17/320,200호에 대해 주장된다.

[0004] 이 출원은 2020년 11월 12일에 출원되고 2021년 5월 20일에 WO 2021/097144로서 공개된 출원인이 Actym Therapeutics, Inc.이며 발명자가 Christopher D. Thanos, Laura Hix Glickman, Alexandre Charles Michel Iannello, Chris Rae, Haixing Kehoe, Bret Nicholas Peterson, 및 Chingnam Cheung이고 발명의 명칭이 "IMMUNOSTIMULATORY BACTERIA DELIVERY PLATFORMS AND THEIR USE FOR DELIVERY OF THERAPEUTIC PRODUCTS"인 동시계류중인 국제 특허 출원 PCT/US2020/060307호에 관한 것이다.

[0005] 이 출원은 또한 출원인이 Actym Therapeutics, Inc.이며 발명자가 Christopher D. Thanos, Laura Hix Glickman, Justin Skoble, Alexandre Charles Michel Iannello, 및 Haixing Kehoe이고 발명의 명칭이 "IMMUNOSTIMULATORY BACTERIA ENGINEERED TO COLONIZE TUMORS, TUMOR-RESIDENT IMMUNE CELLS, AND THE TUMOR MICROENVIRONMENT"인 2020년 2월 27일에 출원되고 2020년 9월 3일에 WO 2020/176809호로서 공개된 동시계류중인 국제 특허 출원 번호 PCT/US2020/020240호 및 2020년 3월 19일에 출원되고 2020년 8월 27일에 미국 공보 US 2020-0270613 A1호로서 공개된 동시계류중인 미국 특허 출원 일련 번호 16/824,500호에 관한 것이다.

[0006] 이 출원은 또한 2018년 7월 11일에 출원되고 2019년 1월 17일에 WO 2019/014398호로서 공개된 국제 특허 출원 PCT/US2018/041713호, 및 2018년 7월 11일에 출원되고 2019년 1월 17일에 미국 공보 2019/0017050 A1호로서 공개되고 현재 허용된 동시계류중인 미국 특허 출원 일련 번호 16/033,187호에 관한 것이며, 이는 각각 발명의 명칭이 "ENGINEERED IMMUNOSTIMULATORY BACTERIAL STRAINS AND USES THEREOF"이다.

[0007] 이 출원은 또한 2019년 7월 11일에 출원되고 2020년 1월 16일에 WO 2020/014543호로서 공개된, 발명의 명칭이 "ENGINEERED IMMUNOSTIMULATORY BACTERIAL STRAINS AND USES THEREOF"인 국제 특허 출원 PCT/US2019/041489호에 관한 것이다.

[0008] 각각의 이러한 출원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이 출원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있고, 이러한 박테리아는 본원에 참조로서 포함된다. 허용된다면, 이러한 출원 각각의 주제는 그 전문이 참조로서 포함된다.

[0009] **전자적으로 제공된 서열 목록의 참조에 의한 포함**

[0010] 서열 목록의 전자 버전은 본원에 출원되고, 이의 내용은 그 전문이 참조로서 포함된다. 전자 파일은 2021년 8월 12일에 생성되었으며, 크기가 868 킬로바이트이고, 명칭이 1708SEQPC0.txt이다.

[0011] **기술분야**

[0012] 보체 비활성화에 대한 내성을 증가시키며, 면역 세포 사멸을 감소시키고, 적응 면역력을 촉진하고, T-세포 기능을 증강시킴으로써 예를 들어, 바람직하지 못한 염증 반응 및 독성을 감소시키고, 항종양 활성을 향상시키도록 변형된 게놈을 갖는 약독화된 면역자극성 박테리아가 제공된다. 항암 용도를 위한 포식 세포의 콜로니화의 증가는 종양 미세환경 및 종양으로의 인코딩된 치료 생성물의 전달을 향상시키고, 다른 경로 중에서도 면역자극성 박테리아의 전신 투여를 허용한다. 적절한 투여에 의한 백신으로서 사용하기 위해, 박테리아는 병원체에 의해 콜론화된 조직을 포함하여 포식 세포를 콜론화할 수 있다.

배 경 기 술

[0013] 암 면역요법 분야는 항-CTLA-4, 항-PD-1 및 항-PD-L1 면역 체크포인트 항체의 임상 성공에 의해 입증되는 바와 같이 큰 진전을 이루었다(예를 들어, 문헌[Buchbinder 등 (2015) *J. Clin. Invest*. 125:3377-3383]; 문헌[Hodi 등 (2010) *N. Engl. J. Med*. 363(8):711-723]; 및 문헌[Chen 등 (2015) *J. Clin. Invest*. 125:3384-3391] 참조). 종양은 주로 면역억제성 환경을 발달시켰다. 종양은 면역 감시를 피하고, 항종양 면역력 세포가 면역력을 억제시키도록 재프로그래밍하고, 최근 암 요법에 대한 내성을 계속 돌연변이화시키는 다수의 기전을 개시한다(예를 들어, 문헌[Mahoney 등 (2015) *Nat. Rev. Drug Discov*. 14(8):561-584] 참조). 현재의 면역요법의 자가면역-연관 독성을 제한하는 한편, 면역 관용(immune tolerance) 및 회피를 극복하는 면역요법 및 암 요법을 설계하는 것은 면역-종양학 분야에 도전한다. 그러므로, 추가 및 혁신적인 면역요법 및 다른 요법이 필요하다.

발명의 내용

[0014] 종양, 특히 종양 체류 면역 세포를 효과적으로 콜로니화하는 면역자극성 박테리아의 능력으로 인해, 그리고 항종양 면역 반응을 초래하는 인코딩된 페이로드로 인해 암 치료제인 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 종양 및 종양 미세환경을 콜로니화하는 능력 때문에, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경 및 종양에서 희박한 또는 부재하는 T-세포 침윤을 갖는 면역 결핍(immune desert)(면역-배제(immune-excluded)) 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다. 이는 간질 장벽(stromal barrier)을 갖는 종양을 포함한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 면역요법에 내성이거나 비반응성인 소위"콜드(cold)" 종양을 "핫(hot)" 종양으로 변환시킬 수 있다.

[0015] 이들 면역자극성 박테리아는 본원에 기재된 게놈 변형을 포함하며, 따라서 이는 예컨대 편모의 제거, *msbB*$^{-}$/*pagP*$^{-}$ 표현형, 뿐만 아니라 추가 돌연변이, 예컨대 컬리 핌브리애의 제거, 및 또한 다른 돌연변이, 예컨대 *ansB*$^{-}$ 표현형으로 인해 TLR2/4/5 약독화된다. 이러한 박테리아는 생체내에서 증식할 수 있다. 박테리아에서 플라스미드(들)에 인코딩된 페이로드는 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 것이다. 특히, 이러한 생성물은 유형 I IFN의 발현을 항시적으로 만드는 기능-획득 돌연변이를 포함한다. 이러한 면역자극성 박테리아는 또한 IL-15와 같은 사이토카인 또는 사이토카인들을 특히 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체로서 인코딩할 수 있고, 종양-연관 항원 및/또는 이중특이적 T-세포 연계자 항체를 인코딩할 수 있다. 암 요법을 위해, 박테리아는 전신 투여될 수 있다.

[0016] 또한, 예컨대 근육내 주사, 흡입, 및 다른 이러한 직접 경로에 의해 조직 내로의 투여를 위한 백신으로서 사용되고/되거나 제형화될 수 있는 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 이러한 박테리아는 생체내에서 비복제성인 것으로 설계되고, 그러므로 영양학적 영양 요구체, 예컨대 *thyA*$^{-}$를 포함하며, 따라서 이는 활성 티미딜레이트 신타제를 발현하지 않고 이는 박테리아에서 인식되는 프로모터의 제어 하에 페이로드를 인코딩한다. 이는 단백질 페이로드를 백신화된 숙주로 전달하는 것으로 의도된다면, 인코딩된 페이로드는 서열을 포함하거나 이들이 박테리아 숙주에서 번역되도록 설계된다. 이들이 RNA를 전달하는 것으로 의도된다면, 인코딩 핵산은 박테리아 리보솜이 이러한 RNA를 번역하지 않을 수 있으나 진핵 리보솜이 이를 번역할 수 있도록 설계된다. 이는 예를 들어, 인코딩 핵산에서 IRES를 포함함으로써 수행될 수 있다. 백신의 페이로드는 면역화 항원 또는 단백질, 예컨대 바이러스 또는 박테리아 병원체로부터의 항원을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 페이로드는 또한 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 면역자극성 단백질, 예컨대 생성물, 예컨

대 STING, 특히 변형된 STING, 및 또한 선택적으로, 사이토카인, 예컨대 IL-15, 예컨대 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체를 포함할 수 있다. 백신은 적합한 투여 경로를 위해 제형화되고, 에어로졸 및 에멀젼, 정제 및 분말을 포함한다.

[0017] 게놈 변형, 및 하나 이상의 치료 생성물, 예컨대 항암 치료제 또는 관련 치료를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 게놈 변형은 종양 미세환경 및 종양-체류 면역 세포에서 축적되는 면역자극성 박테리아를 초래하고, 이러한 장소에서 면역자극성 박테리아는 인코딩된 치료 생성물을 발현한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 대상체에서 강력한 항암 반응을 자극하거나 유도하거나 초래하는 하나 또는 복수의 보완 생성물을 인코딩하였다.

[0018] 항종양 반응과 항바이러스 반응 사이의 면역 반응의 유사성 때문에, 본원에제공된 면역자극성 박테리아는 또한 감염성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 항바이러스 또는 항박테리아 치료제, 예컨대 바이러스 또는 박테리아 생성물의 저해제, 또는 바이러스 또는 박테리아 생성물의 발현의 저해제, 또는 바이러스 또는 박테리아 항원을 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아 및 치료적 항병원체 생성물로부터의 면역반응과 또한 면역자극성 단백질 및 다른 이러한 치료제의 조합은 감염성 질환, 특히 바이러스 감염, 예컨대 만성 바이러스 감염 및 잠재 바이러스 감염과 연관된 질환에 대해 백신화하고/하거나 이를 치료하기 위한 치료적 면역자극성 박테리아를 제공한다. 관심 있는 것은 만성 바이러스 감염, 예컨대 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상 포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-세포 백혈병 바이러스(HTLV), 호흡기 융합 바이러스(RSV), 홍역 바이러스, 및 대상체를 만성적으로 감염시키는 다른 이러한 바이러스에 의한 감염이다. 면역자극성 박테리아는 또한 마찬가지로 급성 감염, 예컨대 만성 인플루엔자, *피. 긴기발리스*, 및 코로나바이러스, 예컨대 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 및 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2로서, COVID-19를 야기함)에 의한 초기 감염의 치료에 사용될 수 있다. 표적화된 병원체성 박테리아는 또한 예를 들어 *에스케리키아, 스타필로콕커스, 슈도모나스*, 및 *포르피로모나스*의 종을 포함할 수 있다.

[0019] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 병원체로부터의 항원 또는 항원들, 예컨대 바이러스 항원을 인코딩할 수 있고, 감염을 예방하거나 기존의 감염을 치료하기 위한 백신으로서 사용된다. 항원은 면역보호 반응을 이끌어내기 위해 또는 병원체로부터 비롯되는 질환을 개선하기 위해 당업자에게 알려진 임의의 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 이러한 면역자극성 박테리아는 면역 세포, 예컨대 항원-제시 세포에서 축적되는 능력으로 인해 병원체, 예컨대 바이러스에 대한 T-세포 반응을 프라이밍할 수 있다. 예를 들어, 본원에 상세히 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 중에는 T-세포의 기능을 억제시키는 효소인 아스파라기나제 II가 결핍된 것이 있다. 본원에 기재되고 제공된 임의의 면역자극성 박테리아가 사용될 수 있다. 예를 들어, 예컨대 활성 효소의 발현을 무효화시키기 위해 박테리아 게놈을 변형시킴으로써 아스파라기나제 II 활성을 무효화시키는 것은 항원 또는 항원 조합을 인코딩하는 데 사용될 수 있는 것으로 본원에 기재되고 제시된다. 생성된 박테리아는 항병원체, 예컨대 항바이러스, T-세포 반응을 촉진한다. 예컨대 병원체, 박테리아 또는 바이러스 또는 다른 것으로부터의 항원의 발현과 면역 세포, 예컨대 항원-제시 세포에서 축적하는 능력을 갖는 다른 것의 조합은 병원체에 의한 감염으로부터의 보호를 제공한다. 예를 들어, 면역자극성 박테리아는 바이러스 항원, 예컨대 바이러스 계열 중에서 또는 바이러스 계열들에 걸쳐 공유되는 필수 바이러스 코어 단백질로부터의 항원을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 코로나바이러스, 예컨대 SARS-COV2의 경우, 뉴클레오캡시드 및/또는 비구조적 M 단백질로부터의 항원은 고도로 보존되고 덜 돌연변이화된 코어 단백질에 대한 $CD8^+$ T-세포 반응을 증강시켜, 이로써 넓은 pan-코로나바이러스 보호를 제공하여 효과적인 백신 및 치료를 제공할 수 있다. 면역화 및/또는 치료에 사용되는 이러한 코로나 바이러스 및 코로나 바이러스 계열로부터의 단백질 및 항원은 알려져 있고, 예시적인 것은 본원에 기재되어 있으며 당업자에게 알려져 있다. 스파이크(spike) 단백질, 이의 일부, 및 변형된 스파이크 단백질에 더하여, 다른 단백질은 이러한 목적을 위해 식별화되었다. 예를 들어, 문헌[Cohen *et al.*, (2021) *Cell Reports Medicine 2*:1000354]를 참조한다.

[0020] 면역자극성 박테리아는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제를 인코딩할 수 있다. 이러한 치료제는 바이러스 유전자 및 단백질, 예컨대 복제 및/또는 패키징에 필요한 단백질의 저해제를 포함하거나, 면역자극성 박테리아는 표적 세포 내로의 바이러스 진입을 용이하게 하거나 이를 제공하는 수용체 또는 수용체들과 바이러스의 결합 또는 상호작용을 방지하는 치료제를 인코딩할 수 있다. 일부 구현예에서, 인코딩된 치료적 단백질, 예컨대 항원 또는 항원 단백질의 발현은 원핵 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 다른 구현예에서, 단백질은 진핵 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있다. 프로모터의 선택은 이것이 예컨대 숙주에서 번역되는 mRNA의 전달을 위해 본원에 기재된 바와 같이 투여 전에 박테리아에서 발현되어야 하는지, 또는 단백질이 전달 후에 숙주 세포, 예

컨대 면역 세포에서 발현되어야 하는지의 여부에 의존한다.

[0021] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 게놈 변형, 예컨대 비활성 인코딩된 생성물을 초래하는 결실, 방해, 및 다른 변경, 예컨대 유전자의 모두 또는 일부의 배향을 변화시키는 것을 포함하여, 기능적 유전자 생성물은 발현되지 않는다. 면역자극성 박테리아 중에는 변형되어, 생성된 박테리아가 *msbB*$^-$/*purI*$^-$인 것이 제공된다. 일부 구현예에서, 박테리아는 *msbB*$^-$ 및 *purI*$^-$이며, 이로써 *msbB* 및/또는 *purI* 유전자의 적어도 코딩 부분의 전장이 결실된다. 박테리아의 게놈은 또한 변형될 수 있어서, 박테리아는 편모가 결여된다. 이는 편모를 정상적으로 발현하는 박테리아에서 수행된다. 이러한 박테리아에서, 예를 들어 *살모넬라* 내 *fliC* 및 *fljB* 유전자, 또는 *fliC* 및 *fljB*와 동등한 다른 종 내의 유전자는 결실되거나 다르게는 변형될 수 있어서, 기능적 유전자 생성물이 발현되지 않는다. 박테리아는 또한, 이것이 아데노신 영양요구체이고/이거나 *msbB*$^-$/*pagP*$^-$가 되도록 변형될 수 있다. 또한, 면역자극성 박테리아 및 이를 함유하는 약학적 조성물이 제공되며, 박테리아는 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않아 박테리아는 *ansB*$^-$이다. 인코딩된 아스파라기나제 활성의 무효화는 T-세포 생존력/활성을 향상시키거나 보유시킨다. 백신으로서 사용되는 치료적 박테리아, 예컨대 비활성화된 또는 약독화된 박테리아는 아스파라기나제 활성을 무효화시키는 박테리아 게놈을 변형시킴으로써 향상될 수 있다. 이러한 백신의 예는 BCG(바실러스 칼메트-게렝(Bacillus Calmette-Guerin)) 백신 및 관련 백신이고, 이는 결핵에 대해 면역화하는 데 사용된다. BCG 백신은 다양한 효능을 갖는 것으로 알려져 있다; 아스파라기나제의 무효화는 이러한 백신의 효능을 향상시킬 수 있는데, 왜냐하면 내인성 박테리아 아스파라기나제가 T-세포 활성을 저해하거나 감소시키기 때문이다.

[0022] 진핵생물 프로모터의 제어 하에 치료 생성물 또는 치료 생성물의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 박테리아의 게놈은 하기 중에서 선택되는 변형, 예컨대, 1, 2, 또는 그 이상의 변형을 함유할 수 있다:

[0023] a) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 펜타-아실화된 지질다당류(LPS)를 생산하도록 변형되었으며,

[0024] 면역자극성 박테리아의 게놈은 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해에 의해 변형되어 박테리아는 펜타-아실화된 지질다당류를 생산하도록 변형되었고;

[0025] 헥사-아실화된 지질다당류는 야생형 박테리아와 비교하여 적어도 10배만큼 실질적으로 감소되거나, 부재함;

[0026] b) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 톨-유사 수용체(TLR) 2, TLR4, 및/또는 TLR5에 의해 약독화된 인식을 가짐;

[0027] c) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 컬리 핌브리애 및/또는 셀룰로스의 합성을 활성화시키지 않음;

[0028] d) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 분비되는 아스파라기나제의 합성을 활성화시키지 않음;

[0029] e) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 퓨린, 아데노신, 및/또는 ATP에 대해 영양요구성임;

[0030] f) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 편모가 결여됨;

[0031] g) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 종양-체류 골수성 세포를 특이적으로 감염시키도록 변형되었음;

[0032] h) 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 결실 또는 방해로서, 박테리아는 종양-체류 골수성 세포를 특이적으로 감염시키도록 변형되었고 종양-체류 골수성 세포에서 복제할 수 없음; 및

[0033] i) 막에서 지질단백질 발현을 저하시키거나 무효화하기 위한 *lppA* 및 *lppB* 중 어느 하나 또는 둘 다의 결실 또는 방해로서, 인코딩된 치료 단백질의 발현이 종양 미세환경 및/또는 종양-체류 면역 세포에서 증가됨.

[0034] 예를 들어, 면역자극성 박테리아는 a), d), 및 f)의 결실, 삽입, 및 대체를 포함한 변형, 또는 변형 c) 및 d), 또는 변형 a), c), d), e), 및 f), 또는 변형 a), c), d), e), f), 및 i), 또는 변형 a), d) f), 및 i), 또는 변형 c), d), 및 i), 또는 변형 f) 및 i), 또는 변형 a) 내지 i), 또는 변형 a), b), d), 및 f), 또는 변형 a), b), c), 및 d), 및 변형 a) 내지 i)의 다른 조합을 함유한다. 결실 또는 방해는 활성 유전자 생성물이 발현

되지 않는 유전자의 임의의 변형을 포함한다.

[0035] 특히, 유전자 또는 유전자들의 모두 또는 충분한 부분의 삽입에 의한 것을 포함한 결실 또는 방해에 의해 게놈이 변형되어 박테리아가 TLR2, TLR4, 및 TLR5에 의한 약독화된 인식을 갖는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 이러한 박테리아는 낮은 독성을 갖고, 종양 미세환경 및 종양-체류 골수성 세포, 예컨대 대식세포에 축적되며/이를 콜로니화한다. 이러한 박테리아는 치료 생성물, 특히 보완 생성물, 예컨대 사이토카인과 기능-획득/항시적 활성 STING 단백질, STING 키메라, 및 기능-획득(GOF) 돌연변이를 갖는 키메라 STING 단백질을 포함한 변형된 STING 폴리펩타이드의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다. 사이토카인은 예를 들어, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(본원에서 IL-15Rα/IL-15sc, 또는 IL-15/IL-15Rα, 또는 IL-15 복합체로 지칭됨), 또는 IL-15, 또는 IL-12, 또는 다른 항종양 면역력 자극 사이토카인 또는 케모카인을 포함한다. 박테리아는 추가로 다른 생성물, 예컨대 항종양 항체를 인코딩할 수 있다. 생성물의 조합은 본원에 기재되고 제공된다. 항종양 반응을 자극시키거나 촉진하고/하거나 치료 생성물을 전달하는 생성물의 조합은 본원의 개시내용 전반에 걸쳐 기재되며, 이러한 조합은 박테리아가 낮은 독성을 갖고 종양, 종양 미세환경, 및/또는 종양-체류 면역 세포, 예컨대 대식세포를 효과적으로 콜로니화하도록 게놈이 변형된 면역자극성 박테리아에 의해 전달된다. 이러한 박테리아의 예는, 이것이 편모를 갖지 않도록 변형되고 예컨대 이것이 박테리아를 *msbB*$^-$/*pagP*$^-$로 되게 함으로써 펜타-아실화된 지질 A와 함께 지질다당류(LPS)를 함유하도록 변형된 *살모넬라, 리스테리아* 및 *이. 콜라이*와 같은 종의 것이다. 박테리아는 추가로 컬리 핌브리애의 무효화에 의해 변형될 수 있고/있거나 예컨대 박테리아가 *csgD*$^-$이도록 이를 변형시킴으로써 감소된 또는 무효화된 셀룰로스 생성 및 생물막 형성을 가질 수 있다. 이러한 변형을 갖는 박테리아는 어떠한 최대 내약 용량(MTD: maximum tolerated dose)도 갖지 않고, 높은 종양 콜로니화를 나타내는 것으로 본원에 제시된다.

[0036] 모든 구현예에서, 면역자극성 박테리아는 또한 편모를 인코딩하는 유전자의 결실 또는 방해를 포함하거나 추가로 포함할 수 있어서, 박테리아는 플라젤린$^-$(예컨대 *fliC*$^-$/*fljB*$^-$)이고 편모를 생성하지 않으며, 야생형 박테리아는 편모를 갖는다. 면역자극성 박테리아는 퓨린에 대해 영양요구성, 예컨대 아데노신에 대해 영양요구성, 또는 아데노신, 아데닌, 및/또는 ATP에 대해 영양요구성일 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한 *purI*$^-$일 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한 *pagP*$^-$일 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제$^-$(*asd*$^-$)일 수 있으며, 예컨대 박테리아는 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제(*asd*)를 인코딩하는 내인성 유전자의 모두 또는 일부의 방해 또는 결실로 인해 *asd*$^-$이며, 이로써, 내인성 *asd*는 발현되지 않는다. 박테리아는 박테리아 프로모터의 제어 하에 플라스미드 상에서 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제(*asd*)를 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한 *msbB*$^-$일 수 있거나, *pagP*$^-$/*msbB*$^-$일 수 있다. 예를 들어, 면역자극성 박테리아는 *asd*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$(예컨대 *fliC*$^-$/*fljB*$^-$), 및 *pagP*$^-$일 수 있거나, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$(*fliC*$^-$/*fljB*$^-$), 및 *pagP*$^-$일 수 있다. 일부 구현예에서, 면역자극성 박테리아는 *ansB*$^-$, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$(예컨대 *fliC*$^-$/*fljB*$^-$), 및 *pagP*$^-$이다.

[0037] 진핵생물 프로모터의 제어 하에 치료 생성물을 인코딩하거나 복수의 진핵생물 프로모터의 제어 하에 또는 단일 프로모터의 제어 하에 복수의 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 면역자극성 박테리아의 게놈은 유전자 또는 유전자들의 충분한 부분의 결실에 의해 또는 유전자 또는 유전자들의 방해에 의해 변형되어, 박테리아는 *ansB*$^-$, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$(예컨대 *fliC*$^-$/*fljB*$^-$), 및 *pagP*$^-$ 중 하나 이상이다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 또한, 유전자 *lppA*(*lpp1*) 및/또는 *lppB*(*lpp2*)를 갖는 것을 포함하며, 이는 인코딩된 지질단백질(들)의 발현을 무효화하거나 실질적으로 감소시키기 위해 결실되거나 방해된 주요 외막지질단백질 Lpp1(LppA) 및 Lpp2(LppB)를 각각 인코딩한다. 특히, 면역자극성 박테리아는 *lppA*$^-$ 및 *lppB*$^-$이다. 진핵생물 조절 서열의 제어 하에 항암 치료제 또는 항병원체 치료제를 인코딩하는 플라스미드를 함유하고 *lppA*$^-$ 및 *lppB*$^-$인 면역자극성 박테리아가 제공된다. 예를 들어, 면역자극성 박테리아는 *ansB*$^-$, *asd*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, 플라젤린$^-$(예컨대 *fliC*$^-$/*fljB*$^-$), *pagP*$^-$, *lppA*$^-$, 및/또는 *lppB*$^-$일 수 있다.

[0038] 본원의 구현예에서, 치료 생성물은 항암 치료제 또는 암 요법에 사용되는 치료제이다. 인코딩된 생성물(들)은 분비 신호를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 발현될 때 치료 생성물은 분비되고, 예컨대

종양-체류 면역 세포로부터 분비된다.

[0039] 임의의 면역자극성 박테리아는 또한, 결실되거나 비활성화된 *살모넬라* 병원성 섬 1(SPI-1: 살모넬랑 병원성 섬 1) 침범에 관여하는 하나 이상의 유전자 또는 오페론을 가질 수 있어서, 면역자극성 박테리아는 상피 세포를 침범하거나 감염시키지 않는다. 예를 들어, 하나 이상의 유전자/오페론은 *avrA*, *hilA*, *hilD*, *invA*, *invB*, *invC*, *invE*, *invF*, *invG*, *invH*, *invI*, *invJ*, *iacP*, *iagB*, *spaO*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *orgA*, *orgB*, *orgC*, *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *sicA*, *sicP*, *sipA*, *sipB*, *sipC*, *sipD*, *sirC*, *sopB*, *sopD*, *sopE*, *sopE2*, *sprB*, 및 *sptP* 중에서 선택된다.

[0040] 면역자극성 박테리아에서 플라스미드는 저(low) 복제수 또는 중(배지) 복제수로 존재할 수 있다. 플라스미드는 중-내지-저 복제수 복제 원점, 예컨대 저 복제수 복제 원점을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 플라스미드는 더 고-복제수로 존재한다. 일반적으로, 중 복제수는 150 미만 또는 약 150 미만이고 20 초과 또는 약 20 초과이거나, 20 또는 25 내지 150이고; 저 복제수는 25 미만, 또는 20 미만, 또는 약 25 미만, 또는 약 20 미만의 복제수이다. 특히, 저 내지 중 복제수는 약 150 미만의 복제수, 또는 150 미만의 복제수이고; 저 복제수는 약 25 미만의 복제수, 또는 25 미만의 복제수이다.

[0041] 인코딩된 치료 생성물은 핵산 및 단백질을 포함한다. 플라스미드는 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩할 수 있다. 예시적인 생성물은 사이토카인, 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질, 및 공동자극성 수용체 또는 리간드를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 추가의 예시적 조합은 아래에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 공동자극성 분자는 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 세포질 도메인 중 모두 또는 일부가 결여되어, 절두된 분자는 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포로의 항시적 면역-자극성 신호전달을 할 수 있고, 결실된 또는 절두된 세포질 도메인 또는 이의 결실된 부분으로 인해 항원-제시 세포(APC)로의 역조절 신호를 할 수 없다.

[0042] 인코딩된 치료 생성물은 진핵생물 숙주에 의해 인식되는 조절 서열, 예를 들어, 박테리아 또는 플라스미드를 포함하는 세포로부터의 분비를 발휘하기 위한 분비 신호를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 면역자극성 박테리아가 2개 이상의 생성물을 인코딩하는 구현예에서, 각각의 생성물의 발현은 별개의 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 대안적으로, 2개 이상의 생성물은 단일 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있고, 각각의 생성물은 예를 들어, 내보 리보솜 진입 부위(IRES), 또는 2A 펩타이를 인코딩하는 핵산에 의해 분리되어, 각각의 인코딩된 치료 생성물의 별개의 발현을 발휘한다. 예시적인 2A 펩타이드는 T2A, F2A, E2A, 또는 P2A이며, 이는 치료 생성물을 인코딩하는 핵산을 플랭킹(측면)하여, 단일 프로모터의 제어 하에 발현되는 치료 생성물의 별도의 발현을 발휘할 수 있다. 치료 생성물은 진핵생물 프로모터, 예컨대 RNA 폴리머라제 II(RNAP) 프로모터, 또는 RNA 폴리머라제 III 프로모터의 제어 하에 발현된다. 이는 바이러스 프로모터인 RNA 폴리머라제 II 프로모터, 또는 포유류 RNA 폴리머라제 II 프로모터, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 헤르페스 바이러스 프로모터, 아데노바이러스 프로모터, 신장 인자-1(EF-1) 알파 프로모터, UBC 프로모터, PGK 프로모터, CAGG 프로모터, 아데노바이러스 2 또는 5 후기 프로모터, EIF4A1 프로모터, CAG 프로모터, 또는 CD68 프로모터를 포함한다. 플라스미드는 다른 진핵생물 조절 서열, 예컨대 종결인자 및/또는 SV40 중에서 선택되는 프로모터, 인간 성장 호르몬(hGH), 소 성장 호르몬(bGH), MND(골수증식성 육종(myeloproliferative sarcoma) 바이러스 인핸서와 함께 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하는 합성 프로모터), 닭 베타-글로불린, 및 rbGlob(토끼 글로불린) 유전자를 추가로 포함하여, 치료 생성물(들)의 발현을 제어할 수 있다. 다른 서열은 polyA 테일, 우드척 간염 바이러스(WHP) 전사후 조절 요소(WPRE), 및 B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE)를 포함한다.

[0043] 인코딩된 치료 생성물은 본원 및 원래의 청구범위에 기재된 임의의 것, 예컨대 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 부분인 단백질 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 유형 I IFN은 인터페론-α 및 인터페론-β를 포함한다. 변이체는 대상체에서 발현될 때, 유형 I IFN의 항시적 발현을 유발하는 것을 포함한다. 이는 유형 I IFN의 발현을 초래하기 위해 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드(CDN)를 필요로 하지 않는 기능-획득(GOF) 변이체를 포함한다. 이러한 단백질의 예는 STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, IRF-8, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, 및 SNRNP200 중에서 선택되는 단백질, 및 증가된 활성을 갖거나 유형 I 인터페론(IFN)의 항시적 발현을 초래하는 이의 변이체이다. 변이체는 STING, RIG-I, IRF-3, 또는 MDA5의 변이체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 세린(S) 또는 트레오닌(T) 잔기(들)는 바이러스 감염의 결과 인산화되고, 아스파르트산(D) 잔기로 대체되어, 생성된 변이체는 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 인산모방체, 및 당업자에게 알려져 있고/있거나 본원에 기재된 임의의 것을 포함한다. 변이체는 예를 들어, 돌연변이가 하기와 같인 선택되는 것을 포함한다: a) STING에서, SEQ ID NO: 305-309를 기준

으로 하기 중에서 선택되는 하나 이상: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, N154S/R284G, 및 S324A/S326A; b) MDA5에서, SEQ ID NO: 310을 기준으로 하기 중에서 선택되는 하나 이상: T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F, 및 A452T; c) RIG-I에서, SEQ ID NO: 311을 기준으로, E373A 및 C268F 중 하나 또는 둘 다; 및 d) IRF-3에서, SEQ ID NO: 312를 기준으로, S396D, 예컨대 SEQ ID NO: 305-309를 기준으로 하기 중에서 선택되는 하나 이상의 아미노 대체(들)를 함유하는 변이체 STING: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, N154S/R284G, 및 S324A/S326A, 및 이의 보존적 대체 및 이의 조합.

[0044] 면역자극성 박테리아는 또한 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질을 인코딩할 수 있다. 이는 사이토카인, 케모카인, 또는 공동자극성 분자를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 이의 예는 하기 중 하나 이상에서 선택되는 단백질이다: IL-2, IL-7, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-36 감마, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, IL-18, IL-21, IL-23, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, CCL3, CCL4, CCL5, T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하거나 이를 발휘하거나 강화시키는 단백질, CD40, CD40 리간드(CD40L), CD28, OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 4-1BB 리간드(4-1BBL), B7-CD28 계열의 구성원, CD47 길항제, 항-IL-6 항체 또는 IL-6 결합 유인 수용체, TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼계열의 구성원. CD40, CD40 리간드, CD28, OX40, OX40 리간드, 4-1BB, 및 4-1BB 리간드 중에서 선택되는 공동자극성 분자는 절두될 수 있어서, 분자는 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 세포질 도메인 또는 이의 일부가 결여되고; 절두된 유전자 생성물은 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고, 결실되거나 부분적으로 결실된, 또는 절두된 세포질 도메인으로 인해 항원-제시 세포(APC)로의 역조절 신호를 할 수 없어서, 면역억제성 리버스 신호전달을 무효화한다. 다른 이러한 단백질은 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 예컨대 항-TGF-베타 항체 또는 이의 단편, 항-TGF-베타 수용체 항체 또는 이의 단편, 가용성 TGF-베타 길항제 폴리펩타이드, 또는 TGF-베타 결합 유인 수용체이다.

[0045] 플라스미드는 치료 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab', $F(ab')_2$, 단일-사슬 Fv(scFv), Fv, dsFv, 나노체, 이중체(diabody) 단편, 또는 단일-사슬 항체를 인코딩할 수 있다. 예는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, VEGF, VEGFR2, 또는 IL-6의 길항제를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0046] 플라스미드는 발현이 증강된 항종양 또는 다른 활성을 초래하는 보완 생성물을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 변형된, 예컨대 항시적 활성 및/또는 키메라 STING 단백질과 사이토카인, 예컨대 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15Rα-IL-15sc)의 조합은 상승작용 활성을 갖는다.

[0047] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 면역 반응, 면역화 또는 면역보호가 요망되는 항원을 인코딩함으로써 백신으로서 사용될 수 있다. 본원에서 면역자극성 박테리아는 백신으로서 사용하기 위해 또는 치료제의 전달을 위해 RNA, 예컨대 mRNA 또는 다른 형태를 전달하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 박테리아는 박테리아 또는 박테리아에 의해 인식되는 다른 원핵 프로모터의 제어 하에 관심 생성물, 예컨대 치료 생성물, 예컨대 병원체로부터의 항원을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다. 인코딩 핵산 카세트는 박테리아 리보솜에 의한 번역을 차단하거나 저해하거나 방지하지만 진핵 리보솜, 예컨대 인간 세포에 존재하는 리보솜에 의한 번역을 허용하거나 제공하거나 증강시키는 조절 서열 또는 다른 서열을 포함한다. 박테리아는, 이것이 예컨대 박테리아를 *시험관내에서의* 성장을 위해 DAP를 필요로 하는 asd^- 또는 성장을 위해 티미딘 모노포스페이트 전구체를 필요로 하는 $ThyA^-$로 되게 함으로써 진핵생물에서 성장하거나 복제할 수 없도록 변형되지만, 이것이 *시험관내에서* 배양될 수 있어서 인코딩된 RNA를 생성한다. 당업자는 내인성 유전자를 예컨대 결실, 삽입, 대체, 전위(transposition), 또는 임의의 이러한 변형에 의해 변형시킴으로써 유전자 또는 생성물을 비활성화시킬 수 있으며, 따라서 활성 효소가 생성되지 않는다. 살모넬라로부터의 예시적인 *ThyA* 유전자에 대해서는 SEQ ID NO: 464, 및 인코딩된 단백질에 대해서는 SEQ ID NO: 465를 참조한다. 면역화를 위해 단백질 및/또는 항원을 인코딩하는 RNA는 플라스미드에서 인코딩되지만, 인코딩 핵산은 번역 신호/서열을 포함하며, 따라서 박테

리아는 이러한 RNA를 번역할 수 없다. 생성된 박테리아는 인코딩된 RNA를 숙주 식세포 내로 전달하며, 여기서 이러한 RNA는 숙주 세포 리보솜에 의해 번역된다. *ThyA*$^-$인 면역자극성 박테리아는 티미딜레이트 신타제의 생성의 비활성화 또는 무효화를 초래하는 게놈 변형, 예컨대 삽입, 결실, 대체 또는 다른 변화를 가지며, 이는 DNA 생합성 전구체(dTTP로의 전구체)인 dTMP로의 dUMP의 환원적 메틸화를 촉매화한다.

[0048] 다른 영양소 및 필수 생성물에 대한 △*ThyA* 영양 요구체는 asd 비활성화/결실 대신에 또는 이에 더하여 도입될 수 있다. 성장에 필요한 유전자 또는 유전자 생성물, 예컨대 영양소를 생성하는 유전자의 다른 결실 또는 비활성화는 asd 대신에 또는 이에 더하여 사용될 수 있고, 예를 들어 *thyA*를 포함한다(*예를 들어*, 문헌[Loessner *et al.* (2006) *FEBS Lett 265*:81-88] 참조). 이러한 생성물의 생성을 위한 박테리아 게놈의 생성 또는 발현의 무효화 또는 다른 약독화 돌연변이는 투여 후 생체내에서 박테리아 세포 사망 시 인코딩된 거대분자의 방출을 초래한다. Asd는 박테리아 세포벽 합성을 위한 필수 효소이다; ThyA는 DNA 합성에 필요한 효소이다. 각각의 유전자의 돌연변이는 균주를 디아미노피멜산(DAP) 또는 티미딘 모노포스페이트 전구체에 대한 영양 요구성으로 만든다. 보완 기질의 부족 시, 이러한 박테리아는 DAP-부재(less) 또는 티민부재 사망에 의해 사멸되어, 박테리아 단백질 및 플라스미드의 방출을 초래한다. Asd의 비활성화 또는 무효화는 거대분자의 방출을 초래한다; ThyA(△*ThyA* 박테리아를 생성하기 위해) 발현/활성의 무효화 또는 비활성화는 티미딘 고갈 시 단백질 및 플라스미드를 포함한 거대분자의 방출을 초래하지 않는다(문헌[Leossner *et al.* (2006) *FEBS Lett 265*:81-88]). 그러므로, △*ThyA*는 생체내에서 숙주 세포로의 플라스미드의 전달에 유리한데, 왜냐하면 박테리아는 이의 내용물을 너무 일찍 방출하지 않을 것이기 때문이다. 본원에 제공된 박테리아가 이러한 박테리아를 소모하는 골수성 세포, 예컨대 식세포, 예컨대 마크로페이트(macrophate), 수지상 세포, 단핵구 및 중성구를 감염시키거나 이에 축적되기 때문에, 무손상(intact) △*ThyA* 박테리아는 표적화된 세포 내부에서 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 방출한다.

[0049] 박테리아는 이것이 약독화되도록, 예컨대 본원의 박테리아는 톨-유사 수용체(TLR: toll-like receptor) 2, 4 및 5에 의한 반응이 이러한 게놈 변형이 없는 박테리아와 비교하여 감소되도록 게놈-변형되고, 선택적으로 보체에 의한 비활성화를 감소시키기 위해 *rck*(보체 사멸화(complement killing)에 대한 내성)를 인코딩하고, 필요하다면 이러한 박테리아가 식세포, 예컨대 조직-체류 대식세포를 주로 또는 단독으로 감염시키게 하는 변형을 포함한다. 게놈 변형, 예컨대 TLR 2,4,5에 의한 반응을 감소시키는 변형의 조합은 인간 항원-제시 세포에 의한 유형 I IFN의 생성에 필요한 것으로 본원에 제시된다.

[0050] 톨-유사 수용체(TLR) 2, 4 및 5에 의한 반응이 게놈 변형이 없는 박테리아와 비교하여 감소되도록 게놈 변형을 함유하는 박테리아가 본원에 제공된다. 이러한 변형은 펜타-아실화된 LPS 및 편모의 무효화를 초래하는 것, 예컨대 편모가 결여된 *pagP*$^-$/*msbB*$^-$ 박테리아, 및 또한 아스파라기나제 II가 결핍되거나 이를 생성하거나 발현하지 않는 것, 예컨대 *ansB*$^-$인 것을 포함한다. 박테리아는 또한 추가의 게놈 변형, 예컨대 박테리아가 필요한 영양소 또는 인자에 대해 영양 요구성이 되는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있으며, 따라서 이러한 박테리아는 진핵 숙주에서 복제할 수 없으나, 예컨대 티미딜레이트 신타제(△*ThyA*), 또는 Asd를 생성하거나 발현할 수 없게 하는 게놈 변형에 의해 영양소 또는 인자, 티미딘에 대한 이러한 영양 요구성(△*ThyA*)과 함께 공급될 때 *시험관내에서* 복제할 수 있다.

[0051] 이들 속성 중 일부 또는 모두를 조합하는 본원에 제공된 박테리아는 항암 생성물을 포함한 치료 생성물 및 항원을 이의 의도된 용도에 따라 발현시키는 데 사용된다. 암을 갖는 대상체에게의 투여를 위해, 종양-체류 골수성 세포에 축적되는 박테리아는 항암 치료제, 예컨대 면역 반응의 자극을 초래하고/하거나 면역억제의 저해를 초래하거나, 종양을 치료하는 생성물을 인코딩하는 생성물, 및 상승작용적으로 작용하여 암을 치료할 수 있는 생성물의 조합을 인코딩한다. 식세포에 축적되거나 이를 감염시키는 본원에 제공된 박테리아는 또한 암을 갖지 않는 대상체를 위해 예컨대 항원을 전달하거나 인코딩함으로써 또는 RNA를 전달함으로써 백신으로서 사용될 수 있다. 특성과 생성물, 및 용도의 다양한 구현예 및 조합은 본원 개시내용 전반에 걸쳐 기재된다.

[0052] 일부 구현예에서, 박테리아는 생성물을 인코딩하는 핵산을 함유하는 플라스미드를 포함하거나, 생성물을 인코딩하는 RNA를 포함하며, 여기서 핵산 또는 RNA에 의해 인코딩되는 생성물은 항원 서열 또는 병원성 바이러스, 박테리아, 기생충으로부터의 서열이거나, 종양 항원이고, 이로써 숙주에서 인코딩된 항원의 발현 시, 숙주는 병원성 바이러스, 박테리아, 기생충, 또는 종양 항원에 대한 면역-보호 반응 또는 면역화 반응을 발달시키거나, 인코딩된 생성물은 치료 생성물이며; 항원 서열(들)의 발현은 원핵 프로모터의 제어 하에 있어서, 항원(들)을 인코딩하는 RNA는 박테리아에서 생성되고; 항원을 인코딩하는 핵산은 박테리아 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지만, 진핵 숙주 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지 않는 조절

서열을 포함하며, 이로써 번역은 박테리아에서 전사로부터 디커플링되며; 생성된 박테리아는 진핵 대상체에게 투여될 때 식세포를 감염시키는 데 있어서 선택적이고, 핵산을 RNA가 번역되는 식세포 내로 전달한다.

[0053] RNA를 생성하기 위해 *시험관내에서* 배양되는 박테리아는 투여 시, 식세포를 감염시키고 이의 내용물을 전달하지만, 이는 생존 가능하지 않고/않거나 복제되지 않아서, RNA, 예컨대 mRNA를 숙주 세포에 제공하며, 이는 RNA를 번역하여 인코딩된 생성물, 예컨대 면역원성 단백질 또는 항원을 생성한다. RNA는 일반적으로 mRNA이며, 또한 다른 형태의 RNA, 예컨대 RNAi, 또는 eRNA(원형 RNA) 및 다른 치료적 형태일 수 있다. 이러한 목적에 사용되는 면역자극성 박테리아는 RNA를 인코딩하는 플라스미드를 높은 또는 더 높은(일반적으로 150 이상) 복제수로 포함하여, 전달되는 RNA의 양을 증가시킬 수 있다. 다양한 구현예가 본원에 기재되며, 청구되고, 예시된다. mRNA는 종양 또는 감염의 치료를 위한 병원체 단백질, 병원체 항원, 종양-항원, 치료 생성물 및 이의 조합을 인코딩할 수 있다. mRNA는 합성, 예컨대 면역화를 위해 설계된 것일 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공보 제20190351040호, 및 면역화 또는 치료를 위한 mRNA를 기재하는 다른 것 참조). 생성된 박테리아는 요법 또는 면역화를 위한 백신이다. 페이로드는 면역화 항원/단백질과 협력하여 T-세포를 활성화시키기 위해 유형 I 인터페론(IFN)을 유도하는 면역자극성 단백질인 아쥬반트인 생성물을 포함할 수 있다.

[0054] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 하기 중에서 선택되는 2개 이상의 치료 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다: a) 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질; b) 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 단백질, 또는 유형 I IFN의 발현을 증가시키도록 증가된 활성을 갖는 이의 변이체, 또는 유형 I IFN의 항시적 발현을 초래하는 이의 변이체 중 하나 이상; 및 c) 항암 항체 또는 이의 항원-결합 부분. 예를 들어, 면역자극성 단백질은 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 세포질 도메인 또는 이의 충분한 부분이 결여된 공동자극성 분자일 수 있어서, 절두된 공동자극성 분자는 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고, 항원 제시 세포(APC)에 역조절 신호를 할 수 없다. 일부 구현예에서, 면역자극성 박테리아는 단일 프로모터의 제어 하에 있을 수 있으며, 사이토카인, 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질, 공동자극성 분자, 및 항암 항체 또는 이의 항원-결합 부분 중에서 선택되는 적어도 2개의 치료 생성물을 인코딩한다. 예를 들어, 생성물 중 적어도 2개 또는 모두를 인코딩하는 핵산의 발현은 단일 프로모터의 제어 하에 있고, 각각의 생성물을 인코딩하는 핵산은 2A 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 의해 분리되어, 번역 시, 각각의 생성물은 별개로 발현된다. 각각의 생성물을 인코딩하는 핵산은 세포로부터의 발현된 생성물의 분비를 지시하는 서열을 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0055] 2개 이상의 치료 생성물을 인코딩하는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 적어도 하나의 생성물은 a)로부터 선택되고, 적어도 하나는 b)로부터 선택되며, a)는 IL-2, IL-7, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-23, IL-36 감마, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15/IL-15Rα, IL-15 복합체, 또는 다른 변이체로도 지칭됨), IL-18, 변형되어 IL-2Ra에 결합하지 않는 IL-2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, 인터페론-α, 인터페론-β, CCL3, CCL4, CCL5, T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하거나 이를 발휘하거나 강화시키는 단백질, CD40, CD40 리간드(CD40L), OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 4-1BB 리간드(4-1BBL), B7-CD28 계열의 구성원, TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 또는 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼계열의 구성원이고; b)는 STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, 및 SNRNP200이다. 이는 또한 TGF-베타 저해성 항체, TGF-베타 결합 유인 수용체, 항-IL6 항체, 또는 IL-6 결합 유인 수용체 중 하나 이상을 인코딩할 수 있다.

[0056] 인코딩된 치료 생성물의 조합의 예는 치료 생성물의 하기 조합 중 임의의 것이다: IL-2 및 IL-12p70; IL-2 및 IL-21; IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(Δcyt가 결실된 세포질 도메인인 4-1BBLΔcyt 포함); IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); IL-15/IL-15Rα 및 IL-12p70; IL-15/IL-15Rα 및 IL-21; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); IL-12p70 및 IL-21; IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); IL-12p70 및 STING GOF 변이체; IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); IL-12p70 및 IL-18; IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-12p70; TGF-β 유인 수용

체, IL-2, 및 IL-21; TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-21; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체 및 IL-12p70; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-18; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); TGF-β 유인 수용체 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-12p70; 항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-21; 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 및 절두된 세포질 도메인을 갖는 4-1BBL 포함); 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-21; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 항-CTLA-4 항체 및 IL-12p70; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-18; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 항-CTLA-4 항체 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-2, 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-2 및 IL-21; CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-21; CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-18; CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함)); 및 CD40 작용제 및 STING GOF 변이체.

[0057] 생성물의 다른 조합은 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 기능-획득 돌연변이 또는 돌연변이들을 갖는 STING 키메라를 포함하는 IL-15 및 STING 기능-획득 변이체, 또는 기능-획득 돌연변이 또는 돌연변이들을 갖는 STING 키메라를 포함하는 IL-15Rα-IL-15sc 및 STING 기능-획득 변이체를 포함한다. 다른 생성물 또는 이의 조합은 이중특이적 T-세포 연계자(BiTE®); BiTe® 및 STING 단백질, 예컨대 본원에 기재된 바와 같이 변형된 GOF STING 단백질 또는 STING 키메라; BiTe® 및 IL-15; BiTe® 및 IL-15Rα-IL-15sc; BiTe®, IL-15 및 STING 단백질, 예컨대 변형된 GOF STING 단백질 또는 키메라 STING 단백질; 및 BiTe® IL-15Rα-IL-15sc, 및 STING 단백질, 예컨대 변형된 GOF STING 단백질 또는 키메라 STING 단백질을 포함하며, 여기서, BiTe® 표적은 예를 들어, DLL3, EGFR, Her2, CEA, 메소텔린, PSMA, EpCAM, CD74, 폴레이트 수용체, Nectin4, EphA2, CA-IX, B7H3, Siglec-15, Muc1, 루이스 Y 항원, 및 다른 이러한 종양 항원/ 종양 표적을 포함한다.

[0058] 또한, 종양 항원(들) 및 STING 기능-획득 변이체 또는 STING 키메라를 함유하는 치료 조성물; 종양 항원(들)과 IL-15의 치료 조성물; 종양 항원(들)과 IL-15Rα-IL-15sc의 치료 조성물; 종양 항원(들), IL-15, 및 STING 기능-획득 변이체 또는 STING 키메라의 치료 조성물; 및 종양 항원(들), IL-15Rα-IL-15sc, 및 STING 기능-획득 변이체 또는 STING 키메라의 치료 조성물이 제공된다. 이러한 생성물은 면역자극성 박테리아에서 인코딩될 수 있다. 종양 항원은 본원에서(예를 들어 실시예 35에서) 임의로 나열되거나 기재되거나 당업계에 알려져 있을 수 있다.

[0059] 생성물의 조합은 또한, 항원과 면역 자극성 단백질의 조합을 포함한다. 항원은 종양 항원일 수 있거나, 항원은 면역화 항원, 예컨대 병원성 항원일 수 있으며, 여기서 병원체는 예를 들어, 질환 및 장애를 야기하는 박테리아, 원생동물, 바이러스, 및 프리온, 및 다른 프리온-유사 입자를 포함한다. 항원은 본원에서 임의로 나열되거나 기재되거나 당업계에 알려져 있을 수 있다. 조합은 예를 들어, 하나 이상의 항원과 IFNα2; 하나 이상의 항원과 IFN-β; 하나 이상의 항원, IFNα2 및 IFN-β; 하나 이상의 항원과 돌연변이 S396D를 갖는 IRF3 GOF 변이체; 및 하나 이상의 항원, IFNα2, 및 돌연변이 S396D를 갖는 IRF3 GOF 변이체의 조합을 포함한다.

[0060] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 인코딩되는 다른 생성물 및 생성물의 조합은 IFNα2와 돌연변이 S396D를 갖는 IRF3 GOF 변이체; IFNα2와 IFN-β; FLT-3L(FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드; 예를 들어, SEQ ID NO: 436 참조); 시알리다제(예를 들어, SEQ ID NO: 435); IL-12p70 단독의 IL-12 p35 하위단위; 아주린; 막 앵커링(anchored)/테터링된(tethered) 사이토카인 또는 분자, 예를 들어, IL-2, IL-12, IL-12p35, IL-21, IL-15, IL-15Rα-IL-15sc, 또는 FLT-3L; 또는 TLR8 작용제의 조합을 포함하지만 이로 제한되지 않으며, 예를 들어, 여기서 TL38 작용제는 polyU 또는 polyU/G, microRNA이거나, miR-21이다.

[0061] 또한, 본원에 기재된 임의의 것을 포함하여 변형된 비-인간 인터페론 유전자 자극제(STING) 단백질, 및 STING 단백질 키메라, 뿐만 아니라 전달 비히클, 약학적 조성물, 이러한 STING 단백질을 인코딩하거나 함유하는 세포, 및 이의 용도, 및 암의 치료 방법이 제공된다. 특히, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 본원에 기재된 바와 같이 변형된 비-인간 STING 단백질, 비-인간 STING 단백질, 및 STING 키메라를 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아에 의해 인코딩되는 이러한 STING 단백질은 본원에 제공되고 전반에 걸쳐 기재된다. 본원에서 하기의 성분이 제공된다:

[0062] 변형된 비-인간 STING 단백질로서, 비-인간 STING 단백질은 인간 STING 단백질보다 더 낮은 NF-κB 활성화, 및 선택적으로 야생형(WT) 인간 STING 단백질과 비교하여 더 높은 유형 I 인터페론 활성화 활성을 갖는 것이다. 이러한 비-인간 STING 단백질은, 이것이 증가된 활성을 갖거나 세포기질 핵산 신호전달의 부재 하에 항시적으로 작용하도록 돌연변이 또는 돌연변이들을 포함하도록 변형된다. 돌연변이는 전형적으로, 인간에서 인터페론병증에서 발생하는 아미노산 돌연변이, 예컨대 인간 STING에 대해 상기 기재된 것이다. 상응하는 돌연변이는 비-인간 종 STING 단백질 내로 도입되며, 여기서 상응하는 아미노산 잔기는 정렬에 의해 식별된다. 또한 일부 구현예에서, STING 단백질의 C-말단 테일(CTT) 내 TRAF6 결합 부위는 결실되어, NF-κB 신호전달 활성을 감소시킨다.

[0063] 변형된 STING 단백질, 특히 키메라인 인간 STING 단백질이 제공되며, 여기서 하나의 종, 예컨대 인간으로부터의 STING 단백질 내 CTT(C-말단 테일) 영역은 인간 STING보다 더 낮은 NF-κB 신호전달 활성 및/또는 더 높은 유형 I IFN 신호전달 활성을 갖는 또 다른 종의 STING 단백질로부터의 CTT로 대체된다. 또한, TRAF6 결합 부위는 이러한 키메라에서 선택적으로 결실된다.

[0064] 본원의 개시내용 전반에 걸쳐 제시된 바와 같은 돌연변이를 또한 포함하는 2의 변형된 STING 단백질이다.

[0065] 전달 비히클, 예컨대 면역자극성 박테리아, 및 예를 들어, 임의의 1 내지 3의 변형된 STING 단백질을 인코딩하는 엑소좀, 나노입자, 미니셀, 세포, 리포솜, 리소좀, 종양용해 바이러스, 및 다른 바이러스 벡터를 포함하는 본원에 제공되거나 당업자에게 알려진 임의의 것이 또한 제공된다.

[0066] 전달 비히클, 예컨대 면역자극성 박테리아, 예를 들어, STING 단백질이 인간 STING과 비교하여 감소된 NF-κB 신호전달 활성, 및 선택적으로 인간 STING과 비교하여 증가된 유형 I 인터페론 자극/신호전달 활성을 갖는 비-인간 종으로부터의 비변형된 STING을 인코딩하는 엑소좀, 나노입자, 미니셀, 세포, 리포솜, 리소좀, 종양용해 바이러스, 및 다른 바이러스 벡터를 포함하는 본원에 제공되거나 당업자에게 알려진 임의의 것이 또한 제공된다.

[0067] 세포(인간이라면 비-접합체), 예컨대 세포 요법에 사용되는 세포, 예컨대 T-세포 및 줄기세포, 및 본원에 기재된 바와 같은 임의의 1 내지 3의 STING 단백질을 생성하는 데 사용되는 세포가 또한 제공된다. 또한, STING 단백질, 또는 전달 비히클, 또는 세포, 또는 이의 조합을 함유하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0068] 본원에 기재된 바와 같은 임의의 면역자극성 박테리아를 투여함으로써 암의 치료 및 병원체 또는 암에 대한 백신화를 위한 용도 및 방법이 본원에 제공된다.

[0069] NF-κB 활성(신호전달 활성), 및 활성을 자극시키는 유형 I 인터페론 또는 STING의 활성을 자극시키는 인터페론-β를 평가하기 위한 검정 및 방법은 본원에 기재되고 또한 당업자에게 알려져 있다. 방법은 예를 들어, 문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) *Cell Reports 27*:1165-1175]에 기재된 것을 포함하며, 이는 특히, 인간을 포함한 다양한 종으로부터의 STING 단백질의 인터페론-β 및 NF-κB 신호전달 활성을 기재하여, 인간 STING보다 더 낮은 NF-κB 활성을 갖는 다양한 종으로부터의 STING 단백질, 및 또한 인간 STING과 필적할 만하거나 더 높은 인터페론-β 활성을 갖는 것을 식별한다. de Oliveira Mann 등(2019)은 CTT 도메인을 포함하여 각각의 종에서 종 정렬을 제공하고 STING의 도메인을 식별한다(또한 de Oliveira Mann 등 (2019)에 대한 보조 정보 참조).

[0070] 비-인간 STING 단백질은 하기 종으로부터의 STING 단백질일 수 있으나 이로 제한되지 않는다: 태즈메이니아 데빌(*사르코필루스 하리시이(Sarcophilus harrisii)*; SEQ ID NO: 349), 마모셋(*칼리트릭스 야쿠스(Callithrix jacchus)*; SEQ ID NO: 359), 소(*보스 타우루스(Bos taurus)*; SEQ ID NO: 360), 고양이(*펠리스 카투스(Felis catus)*; SEQ ID NO: 356), 타조(*스트루티오 카멜루스 오스트랄리스(Struthio camelus australis)*; SEQ ID NO: 361), 따오기(*니포니아 니폰(Nipponia nippon)*; SEQ ID NO: 362), 실러캔스(*라티메리아 칼룸내(Latimeria chalumnae)*; SEQ ID NO: 363-364), 야생돼지(*수스 스크로파(Sus scrofa)*; SEQ ID NO: 365), 박쥐(*로우세투스 애깁티아쿠스(Rousettus aegyptiacus)*; SEQ ID NO: 366), 바다소(*트리케쿠스 마나투스 라티로스트리스(Trichechus manatus latirostris)*; SEQ ID NO: 367), 은상어(*칼로린쿠스 밀리이(Callorhinchus milii)*; SEQ ID NO: 368), 및 마우스(*무스 무스쿨루스(Mus musculus)*; SEQ ID NO: 369). 이러한 척추동물 STING 단백질은 인간 세포에서 면역 신호전달을 쉽게 활성화시키며, 이는 STING 신호전달의 분자 기전은 척추동물에서 공유됨을 나타낸다(문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) *Cell Reports* 27:1165-1175] 참조).

[0071] 골수성 세포, 예컨대 종양-체류 및 조직-체류 대식세포를 감염시키는 능력, 및 생존력을 적어도 제한된 시간 동안 보유하는 능력, 및/또는 유형 I IFN의 발현을 초래하기 위해 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드(CDN)를 필요로 하지 않는 기능-획득(GOF) 변이체와 같이 유형 I IFN 및/또는 다른 면역-자극 생성물을 초래하는 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 전달하는 능력 덕택에, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 M2 표현형을 갖는 대식세포를, 면역억제성 특성이 감소되거나 무효화되고 면역-자극성, 항종양 또는 항-바이러스 특성이 증강되거나 첨가된 M1 또는 M1-유사 대식세포로 전환시킬 수 있는 것으로 본원에 제시된다. 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 여기서 박테리아에 의한 인간 대식세포를 포함한 대식세포의 감염은 M2 대식세포를 M1 표현형 또는 M1-유사 표현형 대식세포로 전환시킨다. 대식세포에서의 발현이 M2 대식세포, 예컨대 인간 M2 대식세포로부터 M1 또는 M1-유사 표현형의 전환을 초래하거나 전환시키는 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 이러한 특성을 갖는 면역자극성 박테리아는, 종양-체류(암을 갖는 대상체에서), 및 조직-체류 골수성 세포의 감염을 초래하는 게놈 변형을 함유하는 본원에 제공된 임의의 박테리아를 포함한다. 이러한 게놈 변형은 편모의 결여를 초래하는 것, 및 다른 것, 예컨대 *pagP*$^{-}$/*msbB*$^{-}$인 박테리아를 초래하는 것을 포함하며, 야생형 박테리아는 편모를 갖는다. 다른 변형은 아스파라기나제 활성의 무효화를 초래하는 것, 예컨대 골수성 세포를 감염시켜 T-세포 활성을 증강시키는 박테리아에서 *ansB*$^{-}$인 박테리아를 초래하는 변형, 및 지질다당류(LPS)를 변경시키는 다른 변형을 포함한다. 본원에 제공된 이러한 면역자극성 박테리아는 면역억제성 포식성 대식세포를, *현장에서* 항원을 CD8+ T-세포에 교차-제시할 수 있고 림프절로 이동하여 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 프라이밍할 수 있는 면역자극성 포식성 대식세포로 전환시킨다.

[0072] M2 대식세포로부터 M1 대식세포의 일부 또는 모든 특징의 프로파일을 갖는 M1 또는 M1-유사 표현형으로의 전환을 용이하게 하거나 초래하거나 전환시키는 대식세포 내 치료 생성물을 인코딩하는 면역자극성 박테리아가 포함된다. 치료 생성물의 예는 유형 I 인터페론(IFN)의 발현, 특히 항시적 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 것이다. 이는, 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 일부이고, 유형 I IFN의 발현을 초래하기 위해 세포기질 핵산, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 환식 디뉴클레오타이드(CDN)를 필요로 하지 않는 치료 생성물의 기능-획득(GOF) 변이체, 예컨대 본원에 기재되고 제공된 바와 같은 변이체 및 비-인간 STING 단백질, STING 키메라, 및 기능-획득 돌연변이를 갖는 STING 키메라를 포함한다. 박테리아는 본원에 나열된 종, 예컨대 *살모넬라* 종 및 균주를 포함하여 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

[0073] 또한, 원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결된 핵산을 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 여기서: 핵산은 원핵 세포에 의한 번역에 필요한 서열이 결여된 RNA를 포함하고, 이로써 RNA는 박테리아에서 생성되지만, 단

백질로 번역되지 않는다. 예를 들어, RNA는 샤인-달가노 서열이 결여되어 있으며, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 및/또는 번역 판독물 2A 펩타이드를 포함한다. IRES 서열은 원핵 리보솜에 의한 번역을 방지하지만, 진핵 리보솜에 의한 번역을 제공한다. 박테리아는 다시스트론성 작제물로부터 별개의 생성물을 생성하기 위해 2A 펩타이드가 T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 중 하나 이상인 면역자극성 박테리아를 포함한다.

[0074] 또한, RNA를 진핵 세포, 예컨대 골수성 세포에 전달하기 위한 전달 비히클일 수 있는 본원에 기재된 바와 같은 면역자극성 박테리아가 제공된다. 이러한 박테리아는 원핵 프로모터에 작동 가능하게 연결된 핵산을 포함하며, 여기서: 핵산 및 원핵 프로모터는 일반적으로 플라스미드 상에서 인코딩되지만, 일부 구현예에서 박테리아 게놈에서 인코딩되며; 핵산은 박테리아 리보솜에 의한 번역에 필요한 서열이 결여된 RNA를 포함하고, 이로써 RNA는 박테리아에서 생성되며, 여기서: RNA는 샤인-달가노 서열이 결여되고, 내부 리보솜 진입 서열(IRES), 또는 번역 판독물 2A 펩타이드를 포함한다. 치료적 단백질(또는 비(非)박테리아 단백질)을 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결될 때 원핵 프로모터는 박테리아 프로모터 또는 파지 프로모터, 예컨대 박테리오파지 프로모터일 수 있다. 파지 프로모터를 인식하는 RNA 폴리머라제는 박테리아 게놈에서 인코딩될 수 있거나, 박테리아에서의 발현을 위해 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있다. 예시적인 원핵 프로모터는 서열이 임의의 SEQ ID NO: 393-396으로 각각 표시된 프로모터 중 전부 또는 충분한 부분(작동 가능하게 연결된 핵산의 전사를 개시하기에 충분함)을 포함하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업자에게 알려진 임의의 것을 포함한다:

[0075] attatgtcttgacatgtagtgagtgggctggtataatgcagcaag (SEQ ID NO:393),

[0076] ttatgcttgacgctgcgtaaggtttttgttataatacaccaag (SEQ ID NO:394), 또는

[0077] attatgtcttgacatgtagtgagtgggctggtaaatgcagcaag (SEQ ID NO:395), 또는

[0078] gatcccggagttcatgcgtgatgcaatgaaagtgccgttctacttcggtgggacctcactgcttatcgttgttgtcgtgattatg gactttatggctcaagtgcaaactctgatgatgtccagtcagtatgagtctgcattgaagaaggcgaacctgaaaggctacg gccgttaattggtcgcctgagaagttacggagagtaaaaatgaaagttcgtgcttccgtcaagaaattatgccgtaactgcaa aatcgttaagcgtgatggtgtcatccgtgtgatttgcagtgccgagccgaagcataaacagcgccaaggctgatttttcgca tatttttcttgcaaagttgggttgagctggctagattagccagccaatcttttgtatgtctgtacgtttccatttgagtatcctgaaa acgggcttttcagcatggtacgtacatattaaatagtaggagtgcatagtggcccgtatagcaggcattaacattcctgatca gaaacacgccgtgatcgcgttaacttcgatctacggtgtcggcaagacccgttctaaagccatcctggctgcagcgggtat cgctgaaaatgttaagatcctctagatttaagaaggagatatacat (*Salmonella* rpsm promoter; SEQ ID NO:396).

[0079] 이러한 면역자극성 박테리아는 본원에 기재된 바와 같은 게놈 변형을 포함하며, 이로써 박테리아는 조직-체류 골수성 세포 및/또는 종양-체류 골수성 세포를 감염시키거나 종양을 갖지 않는 대상체에서는 식세포, 예컨대 대식세포를 감염시킨다. 박테리아는 세포를 감염시키고 RNA를 전달하며, 이러한 RNA는 진핵 숙주 세포에서 번역된다. 이러한 박테리아의 예는 예컨대 편모를 생성하는 데 관여하는 유전자의 결실 또는 방해에 의해 편모가 결여되도록 변형된 것을 포함한다. 박테리아는 게놈 변형이 없을 때 편모를 갖는 종 및 균주이다.

[0080] 또한, 인코딩된 치료 생성물, 예컨대 단백질이 향상된 약리학적 특성, 예컨대 약동학적 또는 약력학적 특성, 예컨대 증가된 혈청 반감기를 부여하는 모이어티에 연결되는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 그러므로, 인코딩된 치료 생성물이 Fc 도메인, 또는 반감기 연장 모이어티, 예컨대 인간 혈청 알부민, 또는 이의 일부를 포함하는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 반감기 연장 방식 또는 방법은 예를 들어, PEG화, 글리코실화의 변형, 시알릴화, PAS화(약 100 내지 200개 잔기 길이인 PAS 아미노산의 중합체에 의한 변형), ELP화(예를 들어, 문헌[Floss 등 (2010) *Trends Biotechnol.* 28(1):37-45] 참조), HAP화(글리신 동종중합체에 의한 변형), 인간 혈청 알부민에의 융합, GLK에의 융합, CTP에의 융합, GLP 융합, 인간 면역글로불린(IgG)의 불변 단편(Fc) 도메인에의 융합, 트랜스페린에의 융합, 비-구조화된 폴리펩타이드, 예컨대 XTEN(rPEG로도 지칭되며, A, E, G, P, S, 및 T를 함유하는 부정확한 반복 펩타이드 서열의 유전적 융합임; *예를 들어,* 문헌[Schellenberger 등 (2009) *Nat. Biotechnol.* 27(12):1186-1190] 참조), 인간 면역글로불린(IgG), 및 크기를 증가시키거나, 유체역학적 반경을 증가시키거나, 변화를 변경하거나, 청소보다는 재순환을 위해 수용체를 표적화하는 다른 이러한 변형과 융합, 및 이러한 변형과 융합의 조합을 포함한다.

[0081] 또한, 인코딩된 치료 생성물이 B7 단백질 막횡단 도메인을 포함하거나 치료 생성물이 내인성 또는 첨가된 GPI 앵커로 인해 GPI-앵커링되는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 인코딩된 치료 생성물은 콜라겐에의 융합을 포함

할 수 있다.

[0082] 임의의 그리고 모든 구현예에서, 면역자극성 박테리아는 임의의 적합한 종일 수 있다. 특정 유전자 및 유전자 변형을 참조하는 경우, 유전자 및 변형은 예시적인 종으로서 *살모넬라*를 참조한 유전자 및 변형에 상응하는 것이다. 종 및 균주는 예를 들어, *리케치아(Rickettsia), 클레브시엘라(Klebsiella), 보르데텔라(Bordetella), 네이쎄리아(Neisseria), 애로모나스(Aeromonas), 프란치셀라(Francisella), 코리네박테리움(Corynebacterium), 시트로박터(Citrobacter), 클라미디아(Chlamydia), 해모필루스(Haemophilus), 브루셀라(Brucella), 미코박테리움(Mycobacterium), 미코플라즈마(Mycoplasma), 레지오넬라(Legionella), 로도콕커스(Rhodococcus), 슈도모나스(Pseudomonas), 헬리코박터(Helicobacter), 바실러스(Bacillus),* 및 *에리시펠로트릭스(Erysipelothrix)의 균주를 포함한다.* 예를 들어, *리케치아 리케치애(Rickettsia rickettsiae), 리케치아 프로와제키이(Rickettsia prowazekii), 리케치아 쯔쯔가무시(Rickettsia tsutsugamuchi), 리케치아 무세리(Rickettsia mooseri), 리케치아 시비리카(Rickettsia sibirica), 보르데텔라 브론키셉티카(Bordetella bronchiseptica), 네이쎄리아 메닌지티디스(Neisseria meningitidis), 네이쎄리아 고노로애(Neisseria gonorrhoeae), 애로모나스 유크레노필라(Aeromonas eucrenophila), 애로모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida), 프란치셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 코리네박테리움 슈도투베르쿨로시스(Corynebacterium pseudotuberculosis), 시트로박터 프룬디이(Citrobacter freundii), 클라미디아 뉴모니애(Chlamydia pneumoniae), 해모필루스 솜누스(Haemophilus somnus), 브루셀라 아보르투스(Brucella abortus), 미코박테리움 인트라셀룰라레(Mycobacterium intracellulare), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 로도콕커스 에퀴(Rhodococcus equi), 슈도모나스 애루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 헬리코박터 무스텔래(Helicobacter mustelae), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 에리시펠로트릭스 루시오파시애(Erysipelothrix rhusiopathiae), 예르시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica), 로칼리마애 퀸타나(Rochalimaea quintana),* 및 *애그로박테리움 투메르파시움(Agrobacterium tumerfacium)*을 포함한다.

[0083] TLR2, TLR4 및 TLR5 신호전달이, 게놈 변형이 없는 박테리아와 비교하여 감소되는 게놈 변형을 포함하는 게놈 변형된 박테리아가 본원에 제공되며, 여기서:

[0084] 박테리아는, 필요한 영양소 또는 인자에 대한 영양 요구성이어서 이것이 진핵 숙주에서 복제될 수 없으나 영양소 또는 인자가 공급될 때 *시험관내에서* 복제될 수 있게 하는 게놈 변형을 추가로 포함하며;

[0085] 박테리아는 핵산을 함유하는 플라스미드를 포함하거나, 항원 서열 또는 병원성 바이러스, 박테리아 또는 기생충으로부터의 서열을 인코딩하거나, 종양 항원을 인코딩하는 RNA를 포함하며, 이로써 숙주에서 인코딩된 항원의 발현 시, 숙주는 병원성 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 대해 면역보호 반응을 발달시키고;

[0086] 항원 서열(들)의 발현은 원핵 프로모터의 제어 하에 있어서, 항원(들)을 인코딩하는 RNA는 박테리아에서 생성되며;

[0087] 항원을 인코딩하는 핵산은 박테리아 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지만 진핵 숙주 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지 않는 조절 서열을 포함하며, 이로써 번역은 박테리아에서 전사로부터 디커플링되고;

[0088] 생성된 박테리아는 진핵 대상체에게 투여될 때 식세포를 감염시키고, 핵산을 RNA가 번역되는 식세포 내로 전달한다.

[0089] 항원을 인코딩하는 핵산 서열(들)은 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 포함할 수 있으며, 이로써 숙주 세포 번역은 용이하게 되거나 증강되고 박테리아 번역은 저해되거나 방지된다. IRES는 혈관 내피 성장 인자 및 유형 1 콜라겐 유도적 단백질(VCIP; 예를 들어, SEQ ID NO: 434 참조)일 수 있고, 항원을 인코딩하는 핵산(들)은 VCIP IRES 또는 박테리아 번역을 저해하는 다른 IERS를 포함할 수 있다. IRES 또는 VCIP IRES는 프로모터의 3' 및 항원(들) 코딩 서열의 5'인 위치에서 플라스미드에 포함될 수 있다.

[0090] 병원체는 박테리아 또는 바이러스일 수 있거나, 인코딩된 항원은 종양 항원일 수 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 만성 바이러스 감염 및 급성 감염을 포함한 바이러스 감염 또는 박테리아 감염을 예방하거나 치료하기 위한 백신일 수 있다. 감염은 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상 포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-세포 백혈병 바이러스(HTLV), 호흡기 융합 바이러스(RSV), 홍역 바이러스, 및 대상체를 만성적으로 감염시키는 다른 바이러스에 의한 감염으로부터의 것일 수 있다. 감염성 병원체는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 또는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2로서, COVID-19를 야기함)일 수 있다.

[0091] 병원체는 *에스케리키아, 스타필로콕커스, 슈도모나스*, 또는 *포르피로모나스*의 종일 수 있거나, 병원체는 *피. 긴기발리스*, SARS-CoV, 또는 *이. 콜라이*일 수 있다.

[0092] 이러한 면역자극성 박테리아에서 플라스미드는 면역자극성 단백질 또는 다른 아쥬반트를 추가로 인코딩할 수 있거나, 면역자극성 단백질 또는 다른 치료 단백질의 조합을 인코딩할 수 있다. 면역자극성 단백질은 STING 단백질, 예컨대 기능-획득 돌연변이를 포함하는 것, 또는 키메라 STING 단백질인 것일 수 있다. 박테리아는 치료 생성물의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 포함할 수 있다. 면역자극성 단백질(들) 및/또는 다른 치료 단백질은 플라스미드 상에서 박테리아에 의해 인식되는 원핵 프로모터의 제어 하에 항원과 함께 다시스트론성 서열의 일부로서 인코딩될 수 있거나; 면역자극성 단백질(들) 및/또는 다른 치료 단백질은 플라스미드 상에서 진핵 숙주에 의해 인식되는 진핵 프로모터의 제어 하에 인코딩될 수 있다. 원핵 프로모터는 박테리아 프로모터 또는 박테리아 파지 프로모터일 수 있고, 진핵 숙주는 인간일 수 있다.

[0093] 면역자극성 박테리아는 원핵 프로모터의 제어 하에 발현되는 항원(들) 및 임의의 다른 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함할 수 있으며, 이는 시험관내에서 박테리아를 배양함으로써 생성된다. 면역자극성 박테리아는 박테리아가 편모가 결여되고 펜트-아실화된 LPS를 생성하게 하는 게놈 변형을 포함할 수 있고/있거나, 박테리아는 *asd*$^{-}$, 및/또는 아데노신 영양 요구체, 및/또는 *csgD*$^{-}$ 및/또는 *ansB*$^{-}$일 수 있다.

[0094] 박테리아는 TLR8 작용제를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0095] 박테리아는 *msbB*$^{-}$/*pagP*$^{-}$일 수 있고/있거나, 편모가 결여될 수 있고/있거나, *asd*$^{-}$일 수 있다.

[0096] 박테리아는 *에스케리키아, 리스테리아*, 또는 *살모넬라*의 종 또는 균주일 수 있다. 예를 들어, 박테리아는 *살모넬라 티피무리움* 균주일 수 있고, 비변형된 *살모넬라* 균주는 야생형 균주이거나, 약독화된 균주이다. 면역자극성 박테리아는 균주 AST-100(VNP20009 또는 YS1646)로부터, 또는 균주 ATCC 14028로부터, 또는 균주 ATCC 14028의 모든 식별 특징을 갖는 균주로부터 유래될 수 있다.

[0097] 본원에 기재된 바와 같이, 면역자극성 박테리아는 결실, 삽입, 방해, 및 다른 변형 중 하나 이상인 하나 이상의 게놈 변형을 유전자에 함유할 수 있으며, 이로써 유전자에 의해 인코딩되는 생성물은 생성되지 않거나, 생성된 대로 이거나, 비활성이다.

[0098] 또한, 본원에 기재되거나 제공된 임의의 면역자극성 박테리아를 약학적으로 허용 가능한 비히클에 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 약학적 조성물은 백신으로서, 예를 들어 액체, 분말 또는 정제로서 제형화될 수 있다. 또한, 질환, 병태, 감염 또는 암을 치료하거나 예방하기 위한(이를 발증시킬 위험을 감소시키기 위한) 박테리아 또는 약학적 조성물의 방법 및 용도, 뿐만 아니라 RNA, 예컨대 mRNA를 전달하기 위한 박테리아의 용도, 및 본원의 박테리아를 투여하는 단계를 포함하는 RNA를 대상체에게 전달하는 방법이 제공된다.

[0099] 또한, 생성물 또는 생성물들을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 박테리아가 제공되며, 여기서 생성물(들)은 치료 생성물(들)이고, 박테리아 내 플라스미드는 생성물(들)을 인코딩하여, 박테리아에 의해 번역되지 않는 mRNA를 생성한다.

[0100] 박테리아는 본원에 기재된 변형으로 인해 약독화되거나, 저독성 또는 무독성으로 되게 할 수 있다. 박테리아의 예는 *살모넬라*의 종, 예컨대 *살모넬라 티피무리움* 균주이다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 보체 사멸화에 대한 내성을 인코딩하는 유전자(*rck*), 예컨대 *살모넬라 rck* 유전자를 내인성적으로 인코딩하고 발현하거나, 인코딩하고 발현하도록 변형되는 것을 포함한다. 예를 들어, 치료적 *이. 콜라이*는 이것이 전신 투여될 수 있도록 *rck*를 인코딩하도록 변형된다. 또한, 본원에 기재된 바와 같이 그리고 청구범위에 제시된 바와 같이, 특히 인간에서 전달 비히클, 세포, 약학적 조성물, 방법, 용도 및 암의 치료가 제공된다. 또한, 치료를 위한 대상체의 선택을 위한 동반 진단 및 방법, 및 치료의 모니터링 방법이 제공된다. 이는 아래 및 또한 청구범위에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본 섹션에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0101] **도 1a 내지 도 1c**는 플라스미드 pATI-1.75 및 pATI-1.76에서의 삽입물을 도시한다(각각 도 1a 및 도 1b). 도 1c는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열이 진핵 세포, 예컨대 골수성 세포에서 번역을 위해 코작(Kozak) 서열로 대체됨을 도시한다.

도 2는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 태즈메이니아 데빌 STING(SEQ ID NO: 349) 단백질의 정렬을 도

시한다.

도 3은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 마모셋 STING(SEQ ID NO: 359) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 4는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 소 STING(SEQ ID NO: 360) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 5는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 고양이 STING(SEQ ID NO: 356) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 6은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 타조 STING(SEQ ID NO: 361) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 7은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 따오기 STING(SEQ ID NO: 362) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 8은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 실러캔스 STING(SEQ ID NO: 363) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 9는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 306) 및 제브라피쉬 STING(SEQ ID NO: 348) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 10은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 305) 및 야생돼지 STING(SEQ ID NO: 365) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 11은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 305) 및 박쥐 STING(SEQ ID NO: 366) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 12는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 305) 및 바다소 STING(SEQ ID NO: 367) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 13은 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 305) 및 은상어 STING(SEQ ID NO: 368) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 14는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 305) 및 마우스 STING(SEQ ID NO: 369) 단백질의 정렬을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 개요

[0103] A.정의

[0104] B.암 요법을 위한 면역자극성 박테리아의 개요

[0105] 1.박테리아 암 면역요법

[0106] 2.종양 미세환경을 표적화하는 선행 요법

[0107] a.자가 T-세포 요법의 한계

[0108] b.바이러스 백신 플랫폼

[0109] c.박테리아 암 요법

[0110] i.*리스테리아*

[0111] ii.*살모넬라* 종

[0112] iii.VNP20009

[0113] iv.야생형 균주

[0114] 3.기존의 박테리아 암 면역요법의 한계

[0115] C.종양-체류 골수성 세포에서 치료 지수를 증가시키고 축적을 증가시키기 위한 면역자극성 박테리아의 변형 및 증강

[0116] 1.LPS 생합성 경로에서 유전자의 결실

[0117] a.*msbB* 결실

[0118] b.*pagP* 결실 또는 비활성화

[0119] 2.영양소 영양요구성

[0120] a.*purI* 결실/방해

[0121] b.아데노신 영양요구성

[0122] c.티미딘 영양요구성

[0123] 3.플라스미드 유지 및 전달

[0124] a.*asd* 결실

[0125] b.*endA* 결실/방해

[0126] 4.플라젤린 넉아웃 균주

[0127] 5.적응 면역력을 촉진하고 T-세포 기능을 증강시키기 위한 박테리아의 조작

[0128] L-아스파라기나제 II (*ansB*) 결실/방해

[0129] 6.컬리 핌브리애 *csgD* 결실을 생성하는 데 필요한 *살모넬라* 유전자에서의 결실/방해

[0130] 7.보체에 대한 내성의 향상

[0131] *Rck* 발현

[0132] 8.*살모넬라* 및 다른 그람-음성 박테리아에서 지질단백질 발현에 필요한 유전자의 결실

[0133] 9.강력한 면역자극성 박테리아로서, 이의 게놈은 항종양 요법에 대해 최적화되고 복수의 치료 생성물을 포함한 치료 생성물을 인코딩한다

[0134] 10.진핵 숙주에서의 발현을 위해 mRNA 및 다른 형태의 RNA를 포함한 RNA를 전달하는 백신 및 박테리아

[0135] 11.항병원체 치료 및 백신으로서 사용하기 위한, 그리고 항암 치료 및/또는 예방을 위한, 병원체로부터의 항원 및 또한 종양으로부터의 항원을 포함한 특정 항원에 대한 박테리아 백신

[0136] 12.M2 표현형 대식세포로부터 M1 및 M1-유사 표현형 대식세포로의 전환

[0137] D.종양 미세환경에서 면역 반응을 자극시키는 유전자 페이로드를 인코딩하는 증강된 치료 지수를 갖는 면역자극성 박테리아

[0138] 1.면역자극성 단백질

[0139] a.사이토카인 및 케모카인

[0140] b.공동자극성 분자

[0141] 2.면역 반응 및/또는 유형 I IFN을 자극시키는 항시적 활성 단백질, 비-인간 STING 단백질, STING 키메라, 및 변형된 형태

[0142] a.항시적 STING 발현 및 기능-획득 돌연변이

[0143] b.항시적 IRF3 발현 및 기능-획득 돌연변이

[0144] c.증가된 또는 항시적 활성을 갖는 비-인간 STING 단백질과 이의 변이체, 및 증가된 또는 항시적 활성을 갖는 STING 키메라와 이의 변이체

[0145] d.세포기질성 DNA/RNA 센서 및 이의 항시적 변이체로서 작용하는 다른 유전자 생성물

[0146] i. RIG-I

[0147] ii.MDA5/IFIH1

[0148] iii.IRF7

[0149] e.다른 유형 I IFN 조절 단백질

[0150] 3.항체 및 항체 단편

[0151] a.TGF-β

[0152] b.이중특이적 scFvs 및 T-세포 연계자

[0153] c.항-PD-1, 항-PD-L1 및 항-CTLA-4 항체

[0154] i.항-PD-1/항-PD-L1 항체

[0155] ii.항-CTLA-4 항체

[0156] d.추가 예시적인 체크포인트 표적

[0157] 4.면역조절성 단백질의 조합은 상승작용 효과 및/또는 보체 효과를 가질 수 있다

[0158] 5.전구약물을 활성화시키는 분자

[0159] 6.병용 요법을 전달하는 면역자극성 박테리아

[0160] E.항바이러스 치료제로서의 그리고 다른 감염성 병원체에 대한 치료제로서의 면역자극성 박테리아

[0161] F.박테리아 전달을 위한 치료 생성물을 인코딩하는 예시적인 플라스미드의 작제

[0162] 1.단백질의 이종성 발현을 위한 항시적 프로모터

[0163] 2.다수의 치료 생성물 발현 카세트

[0164] a.단일 프로모터 작제물

[0165] b.이중/다중 프로모터 작제물

[0166] 3.조절 요소

[0167] a.전사-후 조절 요소

[0168] b.폴리아데닐화 신호 서열 및 종결인자

[0169] c.인핸서

[0170] d.분비 신호

[0171] e.박테리아 적합도의 향상

[0172] 4.복제 원점 및 플라스미드 복제수

[0173] 5.CpG 모티프 및 CpG 섬

[0174] 6.플라스미드 유지/선택 구성요소

[0175] 7.DNA 핵 표적화 서열

[0176] G.백신 및 치료제로서 사용하기 위한 예시적인 박테리아 균주 및 작용 기전

[0177] 1.예시적인 면역자극성 박테리아 - 현장에서의 암 백신화 작용 기전(MOA)

[0178] 2.말초 암 백신화를 위한 예시적인 면역자극성 박테리아 및 작용 기전

[0179] 3.병원체 백신화를 위한 예시적인 면역자극성 박테리아 및 MOA

[0180] H. 약학적 생성, 조성물, 및 제형

[0181] 1.제조

[0182] a.세포 은행 제조

[0183] b.약물 성분 제조

[0184] c.약품 제조

[0185] 2.조성물

[0186] 3.제형

[0187] a.액체, 주사제, 에멀젼

[0188] b.건조된 열안정성 제형

[0189] 4.다른 투여 경로를 위한 조성물

[0190] 5.투여량 및 투여

[0191] **6.포장 및 제조 물품**

[0192] **I. 치료 방법 및 용도**

[0193] **1.치료를 위한 환자 선택 및 치료 모니터링을 위한 진단**

[0194] **a.환자 선택**

[0195] **b.면역자극성 박테리아의 활성을 평가하거나 검출하기 위한 진단은 치료의 효과성을 나타낸다**

[0196] **2.종양**

[0197] **3. 투여**

[0198] **4.모니터링**

[0199] **J. 실시예**

[0200] **A.정의**

[0201] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명(들)이 속하는 기술 분야의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서 전체에 걸쳐 언급된 모든 특허, 특허 출원, 공개된 애플리케이션 및 간행물, GenBank 서열, 데이터베이스, 웹사이트 및 다른 공개된 자료는 달리 명시되지 않는 한 그 전체가 참조로 포함된다. 본원에서 복수의 용어 정의가 있는 경우에는 이 섹션의 정의가 우선한다. URL 또는 다른 식별자 또는 주소에 대한 참조가 있는 경우 이러한 식별자는 변경될 수 있으며 인터넷에서 특정 정보가 왔다 갔다 할 수 있지만 인터넷 검색을 통해 동등한 정보를 찾을 수 있다. 이에 대한 참조는 해당 정보의 적용성 및 공개 배포를 증명한다.

[0202] 본원에 사용된 바와 같이, "치료 박테리아"는 인간과 같은 대상체에게 투여될 때 항암 또는 항종양 요법과 같은 요법에 영향을 미치는 박테리아이다.

[0203] 본원에 사용된 바와 같이, "면역자극성 박테리아"는 대상체에게 도입될 때 면역특혜 조직 및 세포, 예컨대 종양, 종양 미세환경 및 종양-체류 면역 세포에 축적되고, 면역자극성이거나 면역 자극을 초래하는 생성물을 복제 및/또는 발현하는 치료 박테리아이다. 예를 들어, 면역자극성 박테리아는 감소된 독성 또는 병원성 및/또는 독성 또는 병원성을 감소시키는 인코딩된 생성물 덕분에 숙주에서 약독화되는데, 이는 주로 면역 특권이 있는 환경, 예컨대 종양 미세환경(TME)을 제외하고는 면역자극성 박테리아가 생성물을 복제 및/또는 발현할 수 없기 때문이다(또는 감소된 복제/생성물 발현을 가짐). 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 생성물 또는 생성물들을 인코딩하도록, 그리고/또는 이를 면역자극성으로 만드는 속성 또는 특성을 나타내도록 변형된다. 면역자극성 박테리아는 또한, 내인성 생성물 또는 생성물들이 발현되지 않게 하는 게놈 변형을 추가로 포함한다. 박테리아는 이러한 생성물(들)에서 결실되는 것이라고 할 수 있다. 당업자는 유전자가 트랜스포존의 전위 또는 삽입을 포함한 결실, 방해, 삽입, 및 유전자 생성물을 무효화시키는 임의의 다른 변화에 의해 비활성화될 수 있음을 인식한다. 이는 트랜스포존의 전위 또는 포함을 포함한 삽입, 결실, 및/또는 방해에 의해 달성될 수 있다. 비활성화되는 유전자의 예는 예를 들어, *msbB*, *pagP*, *ansB*, 컬리 핌브리애를 인코딩하는 유전자(들), 박테리아에서 편모가 결여되는 편모를 인코딩하는 유전자, 및 본원에 기재되고/되거나 당업자에게 알려진 다른 변형을 포함한다. 당업자는 또한, 다양한 박테리아 종의 상응하는 유전자가 상이한 명칭을 가질 수 있음을 이해한다. 면역자극성 박테리아에서의 인코딩된 생성물, 특성 및 속성은 예를 들어 하기 중 적어도 하나를 포함하지만 이로 제한되지 않는다: 사이토카인, 케모카인 또는 공동자극성 분자와 같은 면역자극성 단백질; 세포기질성 DNA/RNA 센서 또는 이의 기능-획득 또는 항시적으로 활성인 변이체(예를 들어, STING, IRF3, IRF7, MDA5, RIG-I); 예를 들어 TREX1, PD-1, CTLA-4 및/또는 PD-L1과 같은 면역 체크포인트를 표적화하거나, 방해하거나, 저해하는 siRNA(shRNA 및 microRNA) 또는 CRISPR와 같은 RNAi; 항-면역 체크포인트 항체, 항-IL-6 항체, 항-VEGF 항체 또는 TGF-β 저해 항체와 같은 항체 및 이의 단편; 이중특이적 T-세포 연계자(BiTE® 항체)와 같은 다른 항체 작제물; TGF-β, 또는 TGF-β 길항 폴리펩타이드에 결합하기 위한 유인물로 작용하는 가용성 TGF-β 수용체; 및 IL-6 결합 유인 수용체. 면역자극성 박테리아는 또한 면역억제성인 대사산물 또는 아데노신과 같은 면역억제성 경로에 있는 대사산물에 대해 박테리아를 영양요구성으로 만드는 변형을 포함할 수 있다.

[0204] 본원에 사용된 바와 같이, 균주 명칭 VNP20009(예를 들어, 국제 PCT 출원 공개 번호 WO 99/13053 참조, 또한 미국 특허 번호 6,863,894 참조), YS1646 및 41.2.9는 상호 교환적으로 사용되며 각각 American Type Culture Collection(ATCC)에 기탁되어 있으며 수탁 번호 202165로 표기된 균주를 지칭한다. VNP20009는 *msbB* 및 *purI*에

결실을 포함하고 야생형 *에스. 티피무리움* 균주 ATCC #14028에서 생산된 *살모넬라 티피무리움*의 변형된 약독화 균주이다.

[0205] 본원에 사용된 바와 같이, 균주 명칭 YS1456 및 8.7은 상호 교환적으로 사용되며, 각각은 American Type Culture Collection(ATCC)에 기탁되고 수탁 번호 202164로 표기된 균주를 지칭한다(미국 특허 번호 6,863,894 참조).

[0206] 본원에 사용된 바와 같이, 박테리아가 특정 균주로부터 "유래"된다는 언급은 이러한 균주가 출발 물질로서 역할을 할 수 있고 특정 박테리아를 초래하도록 변형될 수 있음을 의미한다.

[0207] 본원에 사용된 바와 같이, "발현 카세트"는 치료 생성물 또는 다른 단백질과 같은 페이로드를 인코딩하는 개방 리딩 프레임(ORF)을 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결된, 유전자 발현을 위한 조절 서열을 포함하는 핵산 작제물을 지칭한다.

[0208] 본원에 사용된 바와 같이, 2A 펩타이드는 진핵생물 세포에서 번역 동안 폴리펩타이드의 절두를 매개하는 18-22개의 아미노산(aa) 길이의 바이러스 올리고펩타이드이다."2A"라는 명칭은 바이러스 게놈의 특정 영역을 지칭하며, 상이한 바이러스 2A는 일반적으로 이것이 유래된 바이러스의 이름을 따서 명명되었다. 이의 예는 F2A(수족구병 바이러스 2A), E2A(말 비염 A 바이러스), P2A(돼지 테스코바이러스-1 2A) 및 T2A(*토세아 아시그나*(*Thosea asigna*) 바이러스 2A)이다. 예를 들어, 인코딩 서열에 대해서는 Liu 등(2017) *Scientific Reports* 7:2193, 도 1을 참조한다. SEQ ID NO: 327-330을 또한 참조한다. 이러한 펩타이드는 일반적으로 DxExNPGP의 핵심 서열 모티프를 공유하며, 많은 수의 바이러스 계열에서 발생한다. 이는 리보솜이 펩타이드 결합을 만드는 데 실패하도록 하여 다단백질(polyprotein)을 분해하는 데 도움을 준다. 2A 펩타이드는 다수의 단백질이 단일 개방 리딩 프레임(ORF)으로부터 발현되는 다시스트론성/다중시스트론성 벡터를 제공한다. 본원의 목적을 위해, 2A 펩타이드는 천연 발생하는 것, 및 이의 임의의 변형된 형태, 예를 들어 본원에 개시된 것을 포함하여 임의의 천연 발생 2A 펩타이드와 적어도 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 것을 포함하며, 이는 복수(2개 이상)의 개방 리딩 프레임을 포함하는 전사체로부터 단일 폴리펩타이드가 전사 및 번역되게 한다.

[0209] 본원에 사용된 바와 같이, "인터페론병증"은 인터페론의 발현을 조절하거나 유도하는 경로에 관여하는 유전자 생성물의 돌연변이에 의한 인터페론의 상향조절과 관련된 장애를 지칭한다. 생성물의 활성은 일반적으로 세포기질 DNA 또는 RNA 또는 뉴클레오타이드와 같은 매개체에 의해 조절되며; 단백질 생성물이 돌연변이되면 활성은 항시적이다. 유형 I 인터페론병증은 중증 형태의 아이카르디-구티에르 증후군(AGS: Aicardi-Goutieres Syndrome)과 경증의 가족성 아동 루푸스(FCL: Familial Chilblain Lupus)를 포함한 다양한 스펙트럼을 포함한다. 이러한 특성을 갖는 돌연변이된 생성물을 인코딩하는 핵산 분자는 정상 활성을 갖는 대립유전자의 생성물과 비교하여 생성물에서 기능-획득을 초래하는 돌연변이를 선택하는 것과 같이 *시험관내에서* 생성될 수 있거나, 본원에 기재된 질환-연관 기능-획득 돌연변이와 비교하여 추가의 기능-획득을 갖는다.

[0210] 본원에 사용된 바와 같이, "기능-획득 돌연변이"는 돌연변이가 없는 동일한 단백질과 비교하여 단백질의 활성을 증가시키는 것이다. 예를 들어, 단백질이 수용체인 경우 리간드에 대한 친화도가 증가할 것이며; 이것이 효소라면 항시적 활성을 포함하여 활성이 증가할 것이다. 특히, STING, IRF3, IRF7, MDA5, RIG-I와 같은 생성물에 관하여, 항시적으로 활성인 생성물은 이의 활성화 리간드, 예컨대 STING의 경우 cGAS의 부재 하에, 그리고/또는 세포기질 핵산, 예컨대 DNA, RNA, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드, 환식 뉴클레오타이드 및/또는 환식 디뉴클레오타이드 또는 다른 핵산 분자의 부재 하에 유형 I 인터페론의 생성을 유발하는 활성 생성물이다. 세포기질에서 이러한 핵산 분자는 바이러스 또는 박테리아 감염 및/또는 방사선 또는 다른 이러한 노출로부터 발생하여, 이러한 병원체에 대한 숙주 내 면역 반응의 활성화를 유발한다.

[0211] 본원에 사용된 바와 같이, "복제 원점"은 염색체, 플라스미드, 또는 바이러스에서 복제가 개시되는 DNA 서열이다. 박테리아 플라스미드와 작은 바이러스를 포함한 작은 DNA의 경우 단일 기원으로 충분하다.

[0212] 복제 원점은 선택한 복제 원점에 따라 벡터 복제수를 결정한다. 예를 들어, 발현 벡터가 저-복제수 플라스미드 pBR322에서 유래된 경우 복제수는 약 15-20 복제/세포이고, 고-복제수 플라스미드 pUC에서 유래된 경우 복제수는 500-700 복제/세포일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 세포 내 플라스미드의 중-복제수는 약 150 또는 150 미만이고, 저-복제수는 5-30, 예를 들어 20 또는 20 미만이다. 중 내지 저 복제수는 150 복제수/세포 미만이다. 셀. 고-복제수는 150 복제수/세포 초과이다.

[0213] 본원에 사용된 바와 같이, "CpG 모티프"는 중앙 CpG를 플랭킹하는 적어도 하나의 염기(3' 및 5' 쪽)에 의해 둘러싸인 비메틸화된 중앙 CpG를 포함하는 염기 패턴이다("p"는 연속적인 C 및 G 뉴클레오타이드 사이의 포스포디

에스테르 연결부를 지칭함). CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드는 길이가 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드이고 비메틸화된 CpG를 포함하는 올리고데옥시뉴클레오타이드이다. 적어도 5' CG 3'의 C는 비메틸화된다.

[0214] 본원에 사용된 바와 같이, "RIG-I 결합 서열"은 5' 트리포스페이트(5'ppp) 구조를 직접 지칭하거나, 또는 폴리(dA-dT) 서열로부터 RNA pol III에 의해 합성되는 것으로, 이는 RIG-I와의 상호 작용으로 인해 RIG-I 경로를 통해 유형 I IFN을 활성화시킬 수 있다. RNA는 적어도 4개의 A 리보뉴클레오타이드(A-A-A-A)를 포함하고; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상을 포함할 수 있다. RIG-I 결합 서열은 polyA로의 전사를 위해 박테리아의 플라스미드에 도입된다.

[0215] 본원에 사용된 바와 같이, "사이토카인"은 세포 신호전달에 중요한 작은 단백질(약 5-20 kDa)의 광범위하고 느슨한 범주이다. 사이토카인은 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인 및 종양 괴사 인자를 포함한다. 사이토카인은 면역 반응에서 세포간 소통을 돕고 염증, 감염 및 외상 부위로의 세포의 이동을 자극하는 세포 신호전달 분자이다.

[0216] 본원에 사용된 바와 같이, "케모카인"은 케모카인 수용체에 결합하고 천연 공급원으로부터 단리된 단백질, 뿐만 아니라 재조합 수단 또는 화학적 합성에 의해 합성적으로 제조된 단백질을 포함하는 화학유인체(주화성) 사이토카인을 지칭한다. 예시적인 케모카인은 IL-8, IL-10, GCP-2, GRO-α, GRO-β, GRO-ɣ, ENA-78, PBP, CTAP III, NAP-2, LAPF-4, MIG (CXCL9), CXCL10(IP-10), CXCL11, PF4, SDF-1α, SDF-1β, SDF-2, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1α (CCL3), MIP-1β(CCL4), MIP-1ɣ (CCL9), MIP-2, MIP-2α, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, MIP-5, MDC, HCC-1, ALP, 렁카인(lungkine), Tim-1, 에오탁신(eotaxin)-1, 에오탁신-2, I-309, SCYA17, TRAC, RANTES(CCL5), DC-CK-1, 림포탁틴(lymphotactin), 및 프랙탈카인(fractalkine), 및 당업자에게 알려진 다른 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 케모카인은 염증 부위로의 면역 세포의 이동, 뿐만 아니라 면역 세포의 성숙화 및 적응 면역 반응의 생산에 관여한다.

[0217] 본원에 사용된 바와 같이, "면역자극성 단백질"은 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 나타내거나 촉진하는 단백질이다. 이러한 단백질의 예는 사이토카인, 케모카인, 및 공동자극성 분자, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, IFN-α, IFN-β, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(본원에 제시된 IL-15/IL-15Rα, IL-15Rα-IL-15sc, IL-15 복합체, 및 다른 변이체로도 본원에서 지칭됨), IL-36 감마, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, CXCL9, CXCL10(IP-10), CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, 잠재적인 T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하는 분자, CD40, CD40 리간드(CD40L), OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 4-1BB 리간드(4-1BBL), 결실된 세포질 도메인 또는 부분적으로 결실된(절두된) 세포질 도메인을 갖는 4-1BBL(1BBLΔcyt), B7-CD28 계열의 구성원, 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼계열의 구성원이다.

[0218] 면역자극성 단백질 중에는 항원 제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 각각 완전 또는 부분 세포질 도메인 결실을 갖는 예를 들어, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 및 OX40L과 같은 절두된 공동자극성 분자가 존재한다. 이러한 절두된 유전자 생성물, 예컨대 세포질 도메인의 결실 또는 부분 결실을 갖는 것은, 이것이 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있도록 절두되지만, 결실된 또는 절두된 세포질 도메인으로 인해 APC에 역조절 신호를 할 수 없다.

[0219] 본원에 사용된 바와 같이, "세포질 도메인 결실"은, 단백질의 세포질, 또는 세포내, 도메인을 포함하는 아미노산 잔기 중 모두 또는 일부의 결실이며, 여기서 결실은 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포로의 항시적 면역자극성 신호전달을 발휘하기에 충분하고, APC로의 역조절 신호전달을 저해하기에 충분하다. 예를 들어, 인간 4-1BBL(TNFSF9라고도 함)의 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 342의 아미노산 잔기 1-28을 포함한다. 인간 CD80의 세포질 도메인은 단백질의 아미노산 잔기 264-288을 포함하며; 인간 CD86의 세포질 도메인은 단백질의 아미노산 잔기 269-329를 포함하고; 인간 CD27L(CD70으로도 알려져 있음)의 세포질 도메인은 단백질의 아미노산 잔기 1-17을 포함하며; 인간 B7RP1(ICOSLG 또는 ICOS 리간드로도 알려져 있음)의 세포질 도메인은 단백질의 아미노산 잔기 278-302를 포함하고; 인간 OX40L(TNFSF4 또는 CD252로도 알려져 있음)의 세포질 도메인은 단백질의 아미노산 잔기 1-23을 포함한다.

[0220] 본원에 사용된 바와 같이, "유인 수용체"는 특정 성장 인자 또는 사이토카인에 특이적이고 효율적으로 결합할 수 있지만 의도된 수용체 복합체를 구조적으로 신호화하거나 활성화시킬 수 없는 수용체이다. 유인 수용체는 리간드에 결합하고 이것이 이의 동족(cognate) 수용체에 결합하는 것을 방지함으로써 저해제로서 작용한다.

[0221] 예를 들어, TGF-β 계열 수용체는 이량체화된 리간드의 존재 하에 헤테로머 복합체를 형성하는 세포-표면 세린

/트레오닌 키나제 수용체 유형 I(TβRI 또는 TGFβR1) 및 유형 II(TβRII 또는 TGFβR2), 뿐만 아니라 유형 III 수용체 베타글리칸(TβRIII 또는 TGFβR3)을 포함한다. TGF-β가 이의 수용체에 결합하는 것을 방지하는 TGF-β에 대한 가용성 유인 수용체는 TβRI, TβRII, 또는 TβRIII(β글리칸)의 가용성 세포외 도메인(TGF-β 결합 영역)을 포함하며, 이는 다른 분자, 예컨대 Fc 도메인과 융합될 수 있다. 추가로, BAMBI(골형성 단백질(BMP: bone morphogenetic protein) 및 액티빈(activin) 막-결합된 저해제)는 유형 I 수용체와 구조적으로 관련이 있고, 수용체 활성화를 저해하는 유인으로서 작용한다. TGFβR2 및 막횡단 영역을 포함하지만 신호전달에 필요한 세포질 도메인이 결여된 우성 음성(dominant negative) TGFβR2(DN-TGFβR2)가 또한 TGF-β 유인 수용체로서 사용될 수 있다(예를 들어, 국제 특허 공보 WO 2018/138003호 참조).

[0222] 본원에 사용된 바와 같이, 공동자극성 분자 작용제는 공동자극성 분자에 결합 시 이를 활성화시키거나 이의 활성을 증가시키는 분자이다. 예를 들어, 작용제는 작용제 항체일 수 있다. CD40 작용제 항체는 예를 들어, CP-870,893, 다세투주맙(dacetuzumab), ADC-1013(미타잘리맙(mitazalimab)), 및 Chi Lob 7/4를 포함한다.

[0223] 본원에 사용된 바와 같이, 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로는 DNA, RNA, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드, 환식 뉴클레오타이드 및/또는 환식 디뉴클레오타이드 또는 다른 핵산 분자의 존재에 의해 개시되어 유형 I 인터페론의 생성을 유발하는 것이다. 세포기질 내 핵산 분자는 바이러스나 박테리아 또는 방사선이나 다른 이러한 노출로부터 발생하여, 숙주에서 면역 반응의 활성화를 유발한다.

[0224] 본원에 사용된 바와 같이, "유형 I 인터페론 경로 단백질"은 내재성 면역 반응, 예컨대 유형 I 인터페론의 유도를 유도하는 단백질이다.

[0225] 본원에 사용된 바와 같이, "세포기질성 DNA/RNA 센서"는 면역 반응 매개자, 예컨대 유형 I 인터페론의 발현을 유발하는 세포기질성 DNA/RNA 센서 경로의 부분인 단백질이다."세포기질성 DNA/RNA 센서"는 유형 I 인터페론 경로 단백질을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 그리고 당업자에게 알려진 바와 같이, 세포기질 DNA는 cGAS에 의해 감지되어, cGAMP의 생성 및 후속적인 STING/TBK1/IRF3 신호전달, 및 유형 I IFN 생성을 유발한다. 박테리아 환식 디뉴클레오타이드(CDN, 예컨대 박테리아 환식 디-AMP)가 또한 STING을 활성화시킨다. 그러므로, STING은 유형 I 인터페론을 유도하는 면역조절성 단백질이다. 5'-트리포스페이트 RNA 및 이중 가닥 RNA는 RIG-I 및 MDA-5 단독, 또는 MDA-5/LGP2에 의해 감지된다. 이는 미토콘드리아 MAVS(미토콘드리아 항바이러스-신호전달 단백질)의 중합을 유발하고, 또한 TANK-결합 키나제 1(TBK1) 및 인터페론 조절 인자 3(IRF3)을 활성화시킨다. 이러한 경로에서 단백질은 면역자극성 단백질이고, 내재성 면역 반응 매개자, 예컨대 유형 I 인터페론의 발현을 유발한다. DNA/RNA 센서 경로에서 면역조절성 단백질은, 이것이 증가된 활성을 갖거나 세포기질 핵산 및/또는 활성화/자극성 리간드의 부재 하에 항시적으로 작용하여 면역 반응, 예컨대 유형 I 인터페론의 발현을 유발하도록 변형될 수 있다.

[0226] 본원에 사용된 바와 같이, 내재성 면역 단백질 STING의"카르복시-말단 테일" 또는 "C-말단 테일"(CTT)은, 야생형 STING 단백질에서 가요성 링커 영역에 의해 cGAMP-결합 도메인에 의해 부착되는 STING 단백질의 C-말단 부분을 지칭한다. CTT는 IRF3 결합 부위, TBK1 결합 부위 및 TRAF6 결합 부위를 포함한다. STING은 TANK-결합 키나제 1(TBK1)에 의한 STING 단백질 C-말단 테일(CTT)의 인산화를 통해 인터페론 베타(IFN-β) 생성의 유도를 촉진한다. STING과 TBK1 사이의 상호작용은 STING의 카르복시-말단 테일(CTT)에 있는 8개 아미노산 잔기의 진화적으로 보존된 스트레치에 의해 매개된다. TRAF6은 STING에서 K63-연결 유비퀴틴 사슬의 형성을 촉매하여, 전사 인자 NF-κB의 활성화와 대체 STING-의존 유전자 발현 프로그램의 유도를 유발한다. CTT에서 TRAF6 결합 부위의 결실 또는 방해는 NF-κB 신호전달의 활성화를 감소시킬 수 있다. 인간 STING CTT(또는 이의 일부)를 낮은 NF-κB 활성화를 갖는 종의 STING 단백질로부터의 CTT(또는 이의 상응하는 부분)로 치환하면, 생성된 변형된 인간 STING 단백질에 의한 NF-κB 활성화를 저하시킬 수 있다. STING CTT는 STING 인산화 및 IRF3 모집에 필요한 서열 모티프를 함유하는 약 40개 아미노산의 비구조화된 스트레치이다(문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) *Cell Reports* 27:1165-1175] 참조). 인간 STING 잔기 S366은 인터페론 신호전달을 활성화하는 내재성 면역 어댑터 단백질 중에서 공유되는 LxIS 모티프의 일부인 1차 TBK1 인산화 부위로 식별되었다(문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) Cell Reports 27:1165-1175] 참조). 인간 STING CTT는 TBK1 결합에 필요한 잔기 L374를 포함하는 제2 PxPLR 모티프를 함유하며; LxIS 및 PxPLR 서열은 척추동물 STING 대립유전자 중에서 보존된다(문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) *Cell Reports* 27:1165-1175] 참조). 예시적인 STING CTT 서열, 및 IRF3, TBK1 및 TRAF6 결합 부위는 하기 표에 제시되어 있다:

종	C-말단 테일(CTT) 서열	SEQ ID NO.	IRF3 결합 부위	TBK1 결합 부위	TRAF6 결합 부위
인간	EKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMS QEPELLISGMEKPLPLRTDFS	370	PELLIS	PLPLRT	DFS
태즈메이니아 데빌	RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLS QEPQLLISGMEQPLSLRTDGF	371	PQLLIS	PLSLRT	DGF
마모셋	EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMS QEPELLISGMEKPLPLRSDLF	372	PELLIS	PLPLRS	DLF
소	EREVTMGSTETSVMPGSSVLS QEPELLISGLEKPLPLRSDVF	373	PELLIS	PLPLRS	DVF
고양이	EREVTVGSVGTSMVRNPSVLS QEPNLLISGMEQPLPLRTDVF	374	PNLLIS	PLPLRT	DVF
타조	RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQIS ESDLPQPLRSDCL	375	LSLQIS	PQPLRS	DCL
야생돼지	EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQ EPELLISGMEQPLPLRSDIF	376	PELLIS	PLPLRS	DIF
박쥐	EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTL HQEPELLISGMDQPLPLRTDIF	377	PELLIS	PLPLRT	DIF
바다소	EREEVTVGSVGTSVVPSPSSPS TSSLSQEPKLLISGMEQPLPLRT DVF	378	PKLLIS	PLPLRT	DVF
따오기	CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLH STELNLQISESDLPQPLRSDCF	379	LNLQIS	PQPLRS	DCF
실러캔스 (변이체 1)	QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLS TEPQLMISDTDAPHTLKRQVC	380	PQLMIS	PHTLK R	QVC
실러캔스 (변이체 2)	QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLS TEPQLMISDTDAPHTLKSGF	381	PQLMIS	PHTLKS	GF
제브라피쉬	DGEIFMDPTNEVHPVPEEGPV GNCNGALQATFHEEPMSDEPT LMFSRPQSLRSEPVETTDYFNP SSAMKQN	382	PTLMFS	PQSLRS	EPVETT DY
은상어	LTEYPVAEPSNANETDCMSSE PHLMISDDPKPLRSYCP	383	PHLMIS	PKPLRS	YCP
마우스	EKEEVTMNAPMTSVAPPPSVL SQEPRLLISGMDQPLPLRTDLI	384	PRLLIS	PLPLRT	DLI

[0227]

[0228] 본원에 사용된 바와 같이, "종양-체류 면역 세포에서 더 적은 세포 사멸을 유도"하거나"면역 세포에서 더 적은 세포 사멸을 유도"하도록 변형된 박테리아는 변형이 없는 박테리아보다 독성이 적거나 독성이 없는 박테리아와 비교하여 독성이 감소한 박테리아이다. 이러한 변형의 예는 식세포에서 파이롭토시스(pyroptosis)를 무효화하고 박테리아의 지질다당류(LPS) 프로파일을 변경하는 변형이다. 이러한 변형에은는 플라젤린 유전자, *pagP*, 또는 *hilA*, 간상체 단백질(예를 들어, *prgJ*), 침 단백질(예를 들어, *prgI*) 및 QseC와 같은 SPI-1 경로의 하나 이상의 구성요소의 방해 또는 결실을 포함한다.

[0229] 본원에 사용된 바와 같이, "종양-체류 면역 세포를 우선적으로 감염시키도록 변형된" 또는 "면역 세포를 우선적으로 감염시키도록 변형된"박테리아는 면역 세포 이외의 세포를 감염시키는 이의 능력을 감소시키는 게놈에 변형을 갖는다. 이러한 변형의 예는 유형 3 분비 시스템 또는 유형 4 분비 시스템을 방해하는 변형 또는 박테리아가 비면역 세포를 침범하는 능력에 영향을 미치는 다른 유전자 또는 시스템을 방해하는 변형이다. 예를 들어, 변형은 SPI-1 구성요소의 방해/결실을 포함하는데, 이는 상피 세포와 같은 세포의 감염에 필요하지만 *살모넬라*에 의한 식세포와 같은 면역 세포의 감염에는 영향을 미치지 않는다.

[0230] 본원에 사용된 바와 같이, "변형"은 폴리펩타이드의 아미노산 서열, 또는 핵산 분자 내의 뉴클레오타이드 서열의 변형과 관련되며, 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 결실, 삽입 및 대체를 포함한다. 폴리펩타이드를 변형시키는 방법은 재조합 DNA 방법론을 사용하는 것과 같이 당업자에게 일상적이다.

[0231] 본원에 사용된 바와 같이, 박테리아 게놈, 또는 플라스미드, 또는 유전자에 대한 변형은 핵산의 결실, 대체 및 삽입을 포함한다.

[0232] 본원에 사용된 바와 같이, RNA 간섭(RNAi)은 표적화된 mRNA 분자를 중화시켜 표적화된 유전자의 번역 및 이의 발현을 저해함으로써 RNA 분자가 유전자 발현 또는 번역을 저해하는 생물학적 과정이다.

[0233] 본원에 사용된 바와 같이, RNAi를 통해 작용하는 RNA 분자는 표적화된 유전자의 발현의 침묵화로 인해 저해제로 지칭된다. 침묵화 발현은, 표적화된 유전자의 발현이 감소되거나, 억제되거나, 저해되는 것을 의미한다.

[0234] 본원에 사용된 바와 같이, RNAi를 통한 유전자 침묵화는 표적화된 유전자의 발현을 저해하거나, 억제시키거나, 방해하거나, 침묵화시킨다고 한다. 표적화된 유전자는 저해 RNA 내 서열에 상응하는 뉴클레오타이드의 서열을 함유하여, 저해 RNA는 표적 mRNA의 발현을 침묵화시킨다.

[0235] 본원에 사용된 바와 같이, 표적 유전자를 저해, 억제, 방해 또는 침묵시키는 것은 표적 유전자의 번역과 같은 발현을 변경하여 표적 유전자에 의해 인코딩되는 생성물의 활성 또는 발현이 감소되는 과정을 지칭한다. 감소는 완전 넉아웃 또는 부분 넉아웃을 포함하며, 이에 의해 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 및 본원의 투여를 참조하여 치료가 발휘된다.

[0236] 본원에 사용된 바와 같이, 소형 간섭 RNA(siRNA)는, 특정 서열에서 메신저 RNA(mRNA)에 결합하고 이의 분해를 촉진하여 단백질의 번역을"간섭"하는 데 사용될 수 있는 각각의 단부에 3' 돌출부(overhang)(2개 뉴클레오타이드)가 있는 일반적으로 약 21개 뉴클레오타이드 길이의 이중-가닥(ds) RNA의 작은 조각이다. 그렇게 함으로써, siRNA는 상응하는 mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 기초한 특정 단백질의 생성을 방지한다. 이 과정을 RNA 간섭(RNAi)이라고 하며 siRNA 침묵 또는 siRNA 녹다운이라고도 한다.

[0237] 본원에 사용된 바와 같이, 짧은 헤어핀 RNA 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는 RNA 간섭(RNAi)을 통해 표적 유전자 발현을 침묵시키는 데 사용될 수 있는 밀착 헤어핀 회전을 갖는 인공 RNA 분자이다. 세포에서 shRNA의 발현은 전형적으로 플라스미드의 전달에 의해, 또는 바이러스 또는 박테리아 벡터를 통해 달성된다.

[0238] 본원에 사용된 바와 같이, 종양 미세환경(TME)은 주변 혈관, 면역 세포, 섬유아세포, 골수-유래 염증 세포, 림프구, 신호전달 분자 및 세포외 기질(ECM)을 포함하여 종양이 존재하는 세포 환경이다. 존재하는 상태는 혈관생성 증가, 저산소증, 낮은 pH, 젖산 농도 증가, 피루브산 농도 증가, 간질액 압력 증가, 대사 생성물 또는 대사 변경, 예를 들어, 아데노신 수치 증가를 포함되지만 이로 제한되지 않으며, 이는 종양을 나타낸다.

[0239] 본원에 사용된 바와 같이, 면역 결핍 종양 또는 면역-배제 종양은 종양 침윤성 T-세포가 없는 종양이다. 면역 결핍 종양은 고형 종양이며, 여기서 최소 이펙터 면역 세포는 종양에 침윤하고, 종양에 존재한 면역 반응의 결여가 존재한다. 결핍 종양은 종양-침윤성 림프구가 없고, CD8+ T-세포는 실질(parenchyma), 기질(stroma), 및 종양 주변부를 포함한 종양으로부터 부재한다.

[0240] 본원에 사용된 바와 같이, "박토펙션"은 포유동물 세포와 같은 진핵생물 세포 내로의 유전자 또는 플라스미드 DNA의 박테리아-매개 전달을 지칭한다.

[0241] 본원에 사용된 바와 같이, 인간 유형 I 인터페론(IFN)은 면역계의 활성을 조절하는 인터페론 단백질의 하위군이다. 모든 유형 I IFN은 IFN-α 수용체와 같은 특정 세포 표면 수용체 복합체에 결합한다. 유형 I 인터페론은 무엇보다도 IFN-α 및 IFN-β를 포함한다. 골수성 세포는 주로 내재성 면역 반응에 관여하는 항바이러스 활성을 갖는 IFN-α 및 IFN-β의 주요 생성자이다. IFN-β의 2개 유형은 IFN-β1(IFNB1) 및 IFN-β3(IFNB3)이다.

[0242] 본원에 사용된 바와 같이, "M1 대식세포 표현형" 및 "M2 대식세포 표현형"은 대식세포 표현형이 나뉘는 2개의 광범위한 군을 지칭한다: M1(고전적으로 활성화된 대식세포)과 M2(대안적으로 활성화된 대식세포). M1 대식세포의 역할은 전염증성 사이토카인과 케모카인을 분비하고 항원을 제시하여, 이것이 긍정적인 면역 반응에 참여하고 면역 모니터로서의 기능을 하도록 하는 것이다. 이것이 생성하는 주요 전염증성 사이토카인은 IL-6, IL-12 및 TNF-알파이다. M2 대식세포는 아르기나제-I, IL-10, TGF-β 및 다른 항염증성 사이토카인을 주로 분비하며, 이는 염증을 감소시키는 기능을 하고 종양 성장 및 면역억제 기능에 기여한다. M1-유사 표현형을 갖는 대식세포는 전염증성 사이토카인을 분비하고 M2 대식세포의 면역억제 활성을 갖지 않는다. M2 대식세포를 M1 또는 M1-유사 표현형을 갖는 대식세포로 전환하면 M2 대식세포를 면역억제적이지 않지만 항종양 반응에 참여하는 것으로 전환한다. M1 또는 M1-유사 표현형을 갖는 대식세포로 전환된 M2 대식세포는 더 많은 전염증성 사이토카인/케모카인 및 수용체, 예를 들어, CD80 및 CCR7, 및 케모카인, 예를 들어, IFNɣ 및 CXCL10의 분비/발현을 나타낸다. M1 표현형 마커는 CD80, CD86, CD64, CD16 및 CD32 중 하나 이상을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. M1 대식세포에서 산화질소 합성효소(iNOS)의 발현도 표현형 마커로 작용할 수 있다. CD163 및 CD206은 M2 대식세포의 식별을 위한 주요 마커이다. M2-유형 세포에 대한 다른 표면 마커에는 CD68도 포함된다. M2 마커의 감소 또는 무효화, 및 M1 대식세포를 나타내는 사이토카인/케모카인의 증가는, M2 표현형에서 M1 또는 M1-유사 표현형으로의 전환을 반영한다. 아래 섹션과 M2에서 M1-유사 또는 M1 표현형 전환에 관한 작업예는 유도되는 예시적인 사이토카인 프로파일 및 마커를 설명한다.

[0243] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 또는 인코딩된 RNA가 유전자를 표적으로 한다는 언급은 이것이 임의의 기전에 의해 유전자의 발현을 저해하거나 억제시키거나 침묵시킨다는 것을 의미한다. 일반적으로, 이러한 핵산은 표적

화된 유전자에 대해 상보적인 부분을 적어도 포함하고, 이 부분은 상보적인 부분과 하이브리드를 형성하기에 충분하다.

[0244] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 또는 폴리펩타이드 서열을 언급할 때 "결실"은 표적 폴리뉴클레오타이드, 또는 폴리펩타이드, 또는 네이티브 또는 야생형 서열과 같은 서열과 비교하여 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 결실을 지칭한다.

[0245] 본원에 사용된 바와 같이, "삽입"은 핵산 또는 아미노산 서열을 언급할 때 표적, 네이티브, 야생형 또는 다른 관련 서열 내에 하나 이상의 추가 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 포함을 설명한다. 따라서, 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 삽입을 함유하는 핵산 분자는 서열의 선형 길이 내에 하나 이상의 추가 뉴클레오타이드를 함유한다.

[0246] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 및 아미노산 서열에 대한 "첨가"는 다른 서열과 비교하여 어느 한쪽 말단에 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 첨가하는 것을 설명한다.

[0247] 본원에 사용된 바와 같이, "치환" 또는 "대체"는 네이티브, 표적, 야생형 또는 다른 핵산 또는 폴리펩타이드 서열에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 분자 길이(뉴클레오타이드 또는 잔기의 수로 설명됨)의 변화 없이 대체 뉴클레오타이드 또는 아미노산으로 대체하는 것을 의미한다. 따라서, 분자에서 하나 이상의 치환은 분자의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 수를 변화시키지 않는다. 특정 폴리펩타이드와 비교한 아미노산 치환은 폴리펩타이드 서열의 길이에 따른 아미노산 잔기의 수로 표현될 수 있다.

[0248] 본원에 사용된 바와 같이, "~에 상응하는 위치에서" 또는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치가 서열 목록에 기재된 바와 같은 개시된 서열의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치에"상응한다"는 언급은, GAP 알고리즘과 같은 표준 정렬 알고리즘을 사용하여 동일성을 최대화하기 위해 공개된 서열과 정렬 시 식별되는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치를 지칭한다. 서열을 정렬함으로써, 당업자는 예를 들어 가이드로서 보존되고 동일한 아미노산 잔기를 사용하여 상응하는 잔기를 식별할 수 있다. 일반적으로, 상응하는 위치를 식별하기 위해, 아미노산의 서열은 가장 높은 차수의 일치가 수득되도록 정렬된다(예를 들어, *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; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 및 Carrillo *et al.* (1988) *SIAM J. Applied Math* 48:1073 참조).

[0249] 본원에 사용된 바와 같이, 서열의 정렬은 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 2개 이상의 서열을 정렬하기 위한 상동성의 사용을 지칭한다. 전형적으로, 50% 이상의 동일성에 의해 관련된 2개 이상의 서열이 정렬된다. 정렬된 서열 세트는 상응하는 위치에 정렬된 2개 이상의 서열을 지칭하며, 게놈 DNA 서열과 정렬된 EST 및 다른 cDNA와 같은 RNA로부터 유래된 정렬 서열을 포함할 수 있다. 관련 또는 변이체 폴리펩타이드 또는 핵산 분자는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 정렬될 수 있다. 이러한 방법은 전형적으로 일치를 최대화하고, 수동 정렬을 사용하는 것과 같은 방법을 포함하고, 이용 가능한 수많은 정렬 프로그램(예를 들어, BLASTP) 및 당업자에게 알려진 다른 것을 사용한다. 폴리펩타이드 또는 핵산의 서열을 정렬함으로써, 당업자는 가이드로서 보존되고 동일한 아미노산 잔기를 사용하여 유사한 부분 또는 위치를 식별할 수 있다. 추가로, 당업자는 또한 인간 서열과 비인간 서열 사이에서 상응하는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 잔기를 찾기 위한 가이드로서 보존된 아미노산 또는 뉴클레오타이드 잔기를 사용할 수 있다. 상응하는 위치는 또한 예를 들어 단백질 구조의 컴퓨터 시뮬레이션된 정렬을 사용하여 구조적 정렬을 기초로 할 수 있다. 다른 경우에 상응하는 영역이 식별될 수 있다. 당업자는 또한, 보존된 아미노산 잔기를 가이드로서 이용하여 인간 서열과 비인간 서열 사이에서 상응하는 아미노산 잔기를 찾을 수 있다.

[0250] 본원에 사용된 바와 같이, 항체와 같은 폴리펩타이드의 "특성"은 결합 특이성, 구조적 구성 또는 형태, 단백질 안정성, 단백질분해에 대한 내성, 형태적 안정성, 내열성 및 pH 조건에 대한 내성을 포함하지만 이로 제한되지 않는 폴리펩타이드에 의해 나타나는 임의의 특성을 지칭한다. 특성의 변화는 폴리펩타이드의 "활성"을 변경할 수 있다. 예를 들어, 항체 폴리펩타이드의 결합 특이성의 변화는 항원에 결합하는 능력 및/또는 다양한 결합 활성, 예컨대 친화도 또는 결합력, 또는 폴리펩타이드의 생체내 활성을 변경할 수 있다.

[0251] 본원에 사용된 바와 같이, 폴리펩타이드, 예컨대 항체의 "활성" 또는 "기능적 활성"은 폴리펩타이드에 의해 나타나는 임의의 활성을 지칭한다. 이러한 활성은 경험적으로 결정될 수 있다. 예시적인 활성은 예를 들어 항원-

결합, DNA 결합, 리간드 결합, 또는 이량체화를 통해 생체분자와 상호작용하는 능력, 또는 효소 활성, 예를 들어 키나제 활성 또는 단백질분해 활성을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 항체(항체 단편 포함)의 경우, 활성은 특정 항원에 특이적으로 결합하는 능력, 항원 결합 친화도(예를 들어, 높거나 낮은 친화도), 항원 결합 결합력(예를 들어, 높거나 낮은 결합력), 온-레이트(on-rate), 오프-레이트(off-rate), 항원 중화 또는 청소를 촉진하는 능력과 같은 이펙터 기능, 바이러스 중화, 및 병원체의 감염 또는 침입을 방지하는 능력과 같은 생체내 활성, 또는 청소를 촉진하거나 신체의 특정 조직이나 체액 또는 세포에 침투하는 능력을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 활성은 ELISA, 유세포분석, 표면 플라즈몬 공명, 또는 온-레이트 또는 오프-레이트를 측정하기 위한 동등한 검정, 면역조직화학 및 면역형광 조직학 및 현미경, 세포-기초 검정, 및 결합 검정(예를 들어, 패닝 검정)과 같은 인식된 검정을 사용하여 시험관내에서 또는 생체내에서 평가될 수 있다.

[0252] 본원에 사용된 바와 같이, "결합하다", "결합된" 또는 이의 문법적 변형은 다른 분자와의 임의의 매력적인 상호작용에 분자가 참여하여 두 분자가 서로 매우 근접한 안정한 회합을 이끄는 것을 의미한다. 결합은 비공유 결합, 공유 결합(예를 들어, 가역 및 비가역 공유 결합)을 포함하지만 이로 제한되지 않으며, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 및 약물을 포함한 화학적 화합물과 같은 저분자와 같으나 이로 제한되지 않는 분자 사이의 상호작용을 포함한다.

[0253] 본원에 사용된 바와 같이, "항체"는 면역글로불린 및 면역글로불린 단편을 의미하며, 천연이든 부분적으로든 완전히 합성이든, 예를 들어 재조합적으로 생성된 면역글로불린 분자의 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 적어도 일부를 함유하고, 항원 결합 부위를 형성하기에 충분하고 조립될 때 항원에 특이적으로 결합하는 이의 임의의 단편을 포함한다. 따라서, 항체는 면역글로불린 항원 결합 도메인(항체 결합 부위)과 상동성 또는 실질적으로 상동성인 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. 예를 들어, 항체는 2개의 중쇄(H 및 H'로 표시될 수 있음) 및 2개의 경쇄(L 및 L'로 표시될 수 있음)를 포함하는 항체를 지칭하며, 여기서 각각의 중쇄는 항원 결합 부위를 형성하기에 충분한 전장 면역글로불린 중쇄 또는 이의 일부(예를 들어, 중쇄는 V_H 사슬, V_H-C_H1 사슬 및 V_H-C_H1-C_H2-C_H3 사슬을 포함하지만 이로 제한되지 않음)일 수 있고, 각각의 경쇄는 항원 결합 부위를 형성하기에 충분한 전장 경쇄 또는 이의 일부일 수 있다(예를 들어, 경쇄는 V_L 사슬 및 V_L-C_L 사슬을 포함하지만 이로 제한되지 않음). 각각의 중쇄(H 및 H')는 하나의 경쇄(각각 L 및 L')와 쌍을 이룬다. 전형적으로, 항체는 가변 중쇄(V_H) 및/또는 가변 경쇄(V_L)의 전부 또는 적어도 일부를 최소한으로 포함한다. 항체는 또한 불변 영역의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0254] 본원의 목적을 위해, 용어 항체는 전장 항체 및 항-CTLA-4 항체 단편과 같은 항체 단편을 포함하는 이의 부분을 포함한다. 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, 이황화 결합 Fv(dsFv), Fd 단편, Fd' 단편, 단일 사슬 Fv(scFvs), 단일 사슬 Fab(scFab), 이중체, 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 중 임의의 것의 항원-결합 단편을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 항체는 또한 합성 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 다중-특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 인간 항체, 비-인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 인트라바디를 포함한다. 본원에 제공된 항체는 임의의 면역글로불린 부류(예를 들어, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY), 임의의 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2), 또는 하위 하위부류(예를 들어, IgG2a 및 IgG2b)의 구성원을 포함한다. 인간 치료용 항체는 일반적으로 인간 항체이거나 인간화되어 있다.

[0255] 본원에 사용된 바와 같이, "항체 단편(들)"은 (i) 가변 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 항체의 기능적 단편을 함유하고 Fc 부분이 없는 1가 및 단일특이적 항체 유도체; 및 (ii) BiTE® 항체(예컨대 탠덤 scFvs), 이중-친화도 재표적화 항체(DART),다른 이량체성 및 다량체성 항체, 이중체 및 단일 사슬 이중체(scDB)를 지칭한다. 따라서, 항체 단편은 예를 들어 Fab, Fab', scFab, scFv, Fv 단편, 나노체(예를 들어, *카멜루스 박트리아무스(Camelus bactriamus)*, *카멜루스 드로메다리우스(Camelus dromedarius)* 또는 *라마 파코스(Lama paccos)*에서 유래된 항체 참조)(예를 들어, 미국 특허 번호 5,759,808 및 Stijlemans 등 (2004) J. Biol. Chem. 279:1256-1261참조), V_{HH}, 단일-도메인 항체(dAb 또는 sdAb), 최소 인식 단위, 단일 사슬 이중체(scDb), BiTE® 항체, DART 항체, 및 항원에 결합하는 다른 항체 작제물을 포함한다. 전형적으로, 인용된 항체 단편의 분자량은 60 kDa 미만이다.

[0256] 본원에 사용된 바와 같이, "핵산"은 일반적으로 포스포디에스테르 연결부에 의해 함께 연결된 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)을 포함하는 2개 이상의 연결된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체를 지칭한다. "핵산"이라는 용어에는 또한 펩타이드 핵산(PNA), 포스포로티오에이트 DNA, 및 다른 이러한 유사체 및 유도체, 또는 이의 조합과 같은 핵산의 유사체가 포함된다. 핵산은 또한 예를 들어, 포스포디에스테르 결합 이외의 "백본" 결합, 예를 들어, 포스포트리에스테르 결합, 포스포라미데이트 결합, 포스포로티오에이트 결합,

티오에스테르 결합 또는 펩타이드 결합(펩타이드 핵산) 및 뉴클레오타이드 유사체를 함유하는 DNA 또는 RNA 유도체를 포함한다. 이 용어는 또한 뉴클레오타이드 유사체, 단일 가닥(센스 또는 안티센스) 및 이중 가닥 핵산으로부터 만들어진 RNA 또는 DNA의 등가물, 유도체, 변이체 및 유사체를 포함한다. 데옥시리보뉴클레오타이드에는 데옥시아데노신, 데옥시시티딘, 데옥시구아노신 및 데옥시티미딘이 포함된다. RNA의 경우 우라실 염기는 우리딘이다.

[0257] 본원에 사용된 바와 같이, 단리된 핵산 분자는 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 것이다. cDNA 분자와 같은 "단리된" 핵산 분자는 재조합 기술에 의해 생성될 때 다른 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없을 수 있거나 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 본원에 제공된 예시적인 단리된 핵산 분자는 본원에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함한다.

[0258] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 서열, 영역, 요소 또는 도메인과 관련하여 "작동 가능하게 연결된" 또는 "작동적으로 연결된"은 핵산 영역이 서로 기능적으로 관련되어 있음을 의미한다. 설명된 구성요소가 의도한 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있는 병치를 나타낸다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 이의 전사 또는 발현에 영향을 미치거나 영향을 미치는 경우 인코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 리더 펩타이드를 인코딩하는 핵산은 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결될 수 있고, 이로써 핵산은 전사되고 번역되어 기능적 융합 단백질을 발현할 수 있으며, 여기서 리더 펩타이드는 융합 폴리펩타이드의 분비에 영향을 미친다. 일부 예에서, 제1 폴리펩타이드(예를 들어, 리더 펩타이드)를 인코딩하는 핵산은 제2 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결되고, 핵산은 단일 mRNA 전사체로 전사되지만 mRNA 전사체의 번역은 발현되는 2개의 폴리펩타이드 중 하나를 초래할 수 있다. 예를 들어, 앰버 정지 코돈은 제1 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산과 제2 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 사이에 위치할 수 있으므로, 부분적인 앰버 억제 세포에 도입될 때 생성된 단일 mRNA 전사체는 제1 및 제2 폴리펩타이드를 함유하는 융합 단백질을 생성하도록 변역될 수 있거나, 제1 폴리펩타이드만을 생성하도록 번역될 수 있다. 또 다른 예에서, 프로모터는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 이로써 프로모터는 핵산의 전사를 조절하거나 매개한다.

[0259] 예를 들어 합성 핵산 분자 또는 합성 유전자 또는 합성 펩타이드와 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, "합성"은 재조합 방법 및/또는 또는 화학적 합성 방법에 의해 생성되는 핵산 분자, 또는 유전자, 또는 폴리펩타이드 분자를 지칭한다.

[0260] 본원에 사용된 바와 같이, 천연 발생 α-아미노산의 잔기는 인간에서 동족 mRNA 코돈과 함께 하전된 tRNA 분자의 특이적 인식에 의해 단백질에 통합되는 자연에서 발견되는 20개의 α-아미노산의 잔기이다.

[0261] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리펩타이드"는 공유 결합된 2개 이상의 아미노산을 지칭한다. 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0262] 본원에 사용된 바와 같이, "펩타이드"는 길이가 2 내지 약 40개 아미노산인 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0263] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산"은 아미노기 및 카르복실산기를 함유하는 유기 화합물이다. 폴리펩타이드는 2개 이상의 아미노산을 포함한다. 본원의 목적을 위해, 본원에 제공된 항체 및 면역자극성 단백질에 함유된 아미노산은 20개의 천연 발생 아미노산(하기 표 참조), 비-천연 아미노산, 및 아미노산 유사체(예를 들어, α-탄소는 측쇄를 가짐)를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 나타나는 폴리펩타이드의 다양한 아미노산 서열에서 발생하는 아미노산은 잘 알려진 3자 또는 1자 약어에 따라 식별된다(하기 표 참조). 다양한 핵산 분자 및 단편에서 발생하는 뉴클레오타이드는 당업계에서 일상적으로 사용되는 표준 단일 문자 지정으로 표기된다.

[0264] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산 잔기"는 이의 펩타이드 결합에서 폴리펩타이드의 화학적 소화(가수분해) 시 형성된 아미노산을 지칭한다. 본원에 기재된 아미노산 잔기는 일반적으로 "L" 이성질체 형태이다. 원하는 기능적 특성이 폴리펩타이드에 의해 유지되는 한 "D" 이성질체 형태의 잔기는 임의의 L-아미노산 잔기로 치환될 수 있다. NH_2는 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재하는 유리 아미노기를 지칭한다. COOH는 폴리펩타이드의 카르복실 말단에 존재하는 유리 카르복실기를 지칭한다. *J. Biol. Chem.*, 243:3557-59 (1968) 및 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822에 기재된 표준 폴리펩타이드 명명법에 따라, 아미노산 잔기에 대한 약어는 하기 표에 나와 있다:

대응 표

부호		
1-글자	**3-글자**	**아미노산**
Y	Tyr	티로신
G	Gly	글리신
F	Phe	페닐알라닌
M	Met	메티오닌
A	Ala	알라닌
S	Ser	세린
I	Ile	이소류신
L	Leu	류신
T	Thr	트레오닌
V	Val	발린
P	Pro	프롤린
K	Lys	리신
H	His	히스티딘
Q	Gln	글루타민
E	Glu	글루탐산
Z	Glx	글루탐산 및/또는 글루타민
W	Trp	트립토판
R	Arg	아르기닌
D	Asp	아스파르트산
N	Asn	아스파라긴
B	Asx	아스파르트산 및/또는 아스파라긴
C	Cys	시스테인
X	Xaa	미지의 것 또는 기타

[0265]

[0266] 본원에서 화학식으로 표시되는 아미노산 잔기의 모든 서열은 아미노 말단에서 카르복실 말단의 통상적인 방향으로 좌측에서 우측으로 배향된다. 어구 "아미노산 잔기"는 상기 대응표에 열거된 아미노산뿐만 아니라 변형된, 비천연 및 특이한 아미노산을 포함하는 것으로 정의된다. 아미노산 잔기 서열의 시작 또는 끝에 대시(dash)는 하나 이상의 아미노산 잔기의 추가 서열, 또는 NH_2와 같은 아미노 말단기, 또는 COOH와 같은 카르복실 말단기에 대한 펩타이드 결합을 나타낸다.

[0267] 펩타이드 또는 단백질에서, 아미노산의 적절한 보존적 치환은 당업자에게 알려져 있고 일반적으로 생성된 분자의 생물학적 활성을 변경하지 않고 이루어질 수 있다. 당업자는 일반적으로 폴리펩타이드의 비필수 영역에서 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는다는 것을 인식한다(예를 들어, Watson *et al.*, *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 참조).

[0268] 이러한 치환은 하기 표에 제시된 예시적인 치환에 따라 이루어질 수 있다:

예시적인 보존적 아미노산 치환

원래의 잔기	예시적인 보존적 치환(들)
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0269]

[0270] 다른 치환도 허용되며 경험적으로 또는 알려진 다른 보존적 또는 비보존적 치환에 따라 결정할 수 있다.

[0271] 본원에 사용된 바와 같이, "천연 발생 아미노산"은 폴리펩타이드에서 발생하는 20개의 L-아미노산을 지칭한다.

[0272] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비천연 아미노산"은 천연 아미노산과 유사한 구조를 갖지만 천연 아미노산의 구조 및 반응성을 모방하도록 구조적으로 변형된 유기 화합물을 의미한다. 따라서 비-천연 아미노산은 예를 들어 20개의 천연 발생 아미노산 이외의 아미노산 또는 아미노산 유사체를 포함하고 아미노산의 D-입체이성질체를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 예시적인 비천연 아미노산은 당업자에게 알려져 있으며, 2-아미노아디프산(Aad), 3-아미노아디프산(bAad), β-알라닌/β-아미노-프로피온산(Bala), 2-아미노부티르산(Abu), 4-아미노부티르산/피페리딘산(4Abu), 6-아미노카프로산(Acp), 2-아미노헵탄산(Ahe), 2-아미노이소부티르산(Aib), 3-아미노이소부티르산(Baib), 2-아미노피멜산(Apm), 2,4-디아미노부티르산(Dbu), 데스모신(Des), 2,2'-디아미노피멜산(Dpm), 2,3-디아미노프로피온산(Dpr), N-에틸글리신(EtGly), N-에틸아스파라긴(EtAsn), 하이드록시라이신(Hyl), 알로-하이드록시라이신(Ahyl), 3-하이드록시프롤린(3Hyp), 4-하이드록시프롤린(4Hyp), 이소데스모신(Ide), 알로-이소류신(Aile), N-메틸글리신, 사르코신(MeGly), N-메틸이소류신(MeIle), 6-N-메틸라이신(MeLys), N-메틸발린(MeVal), 노르발린(Nva), 노르류신(Nle) 및 오르니틴(Orn)을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0273] 본원에 사용된 바와 같이, DNA 작제물은 자연에서 발견되지 않는 방식으로 결합되고 병치된 DNA 단편을 함유하는 단일 가닥 또는 이중 가닥, 선형 또는 원형 DNA 분자이다. DNA 작제물은 인간 조작의 결과로 존재하며, 조작된 분자의 클론 및 다른 복사체를 포함한다.

[0274] 본원에 사용된 바와 같이, DNA 분절은 특정 속성을 갖는 더 큰 DNA 분자의 일부이다. 예를 들어, 특정 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 분절은 5'에서 3' 방향으로 읽을 때 특정 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 인코딩하는 플라스미드 또는 플라스미드 단편과 같은 더 긴 DNA 분자의 일부이다.

[0275] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 폴리뉴클레오타이드는 5' 말단에서 3' 말단으로 판독되는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 염기의 단일 또는 이중 가닥 중합체를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드는 RNA와 DNA를 포함하며 천연 공급원에서 단리되거나 시험관 내에서 합성되거나 천연 분자와 합성 분자의 조합으로부터 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 분자의 길이는 본원에서 뉴클레오타이드(약어 "nt") 또는 염기쌍(약어 "bp")으로 제공된다. 뉴클레오타이드라는 용어는 문맥이 허용하는 경우 단일 가닥 및 이중 가닥 분자에 사용된다. 용어가 이중 가닥 분자에 적용될 때 전체 길이를 나타내는 데 사용되며 용어 염기쌍과 동일한 것으로 이해될 것이다. 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드의 2개의 가닥은 길이가 약간 다를 수 있고 이의 말단이 엇갈릴 수 있음을 당업자는 인식할 것이며; 따라서 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 분자 내의 모든 뉴클레오타이드는 쌍을 이룰 수 없다. 이러한 쌍을 이루지 않은 단부는 일반적으로 길이가 20개 뉴클레오타이드를 초과하지 않는다.

[0276] 본원에 사용된 바와 같이, 재조합 방법에 의한 생성은 클로닝된 DNA에 의해 인코딩된 단백질을 발현하기 위한 분자 생물학의 잘 알려진 방법의 사용을 의미한다.

[0277] 본원에 사용된 바와 같이, "이종성 핵산"은 이것이 발현되는 세포에 의해 생체내에서 정상적으로 생성되지 않는 생성물(즉, RNA 및/또는 단백질)을 인코딩하는 핵산, 또는 이것이 일반적으로 발생하지 않거나 전사, 번역 또는 다른 조절 가능한 생화학적 과정에 영향을 주어 DNA와 같은 내인성 핵산의 발현을 변경하는 매개체를 매개하거나 인코딩하는 좌위 내의 핵산이다. DNA와 같은 이종성 핵산은 외래 핵산이라고도 한다. 당업자가 이것이 발현되는 세포에 대해 이종성 또는 외래인 것으로 인식하거나 고려할 수 있는 DNA와 같은 임의의 핵산은 본원에서 이종성 핵산에 포함되며; 이종성 핵산은 내인성으로도 발현되는 외인성으로 첨가된 핵산을 포함한다. 이종성 핵산은 일반적으로 이것이 도입된 세포에 내인성이지 않지만, 다른 세포로부터 얻거나 합성적으로 제조되거나 자연적으로 발생하지 않는 게놈 좌위에 도입되거나, 이의 발현은 천연 조절 서열 또는 서열들과 상이한 조절 서열들 또는 서열의 제어 하에 있다.

[0278] 본원에서 이종성 핵산의 예는, DNA/RNA 센서 경로의 단백질 또는 이의 기능-획득 또는 항시적으로 활성인 변이체, 또는 면역자극성 단백질, 예컨대 사이토카인, 케모카인 또는 공동자극성 분자를 인코딩하는 핵산을 포함하지만 이로 제한되지 않으며, 이는 종양 미세환경에서 항종양 면역력을 부여하거나 이에 기여한다. 항체 및 이의 단편, BiTEs®, 유인 수용체, 길항 폴리펩타이드 및 RNAi와 같이 종양 미세환경에서 항종양 면역력을 부여하거나 이에 기여하는 다른 생성물도 포함된다. 면역자극성 박테리아에서, 이종성 핵산은 일반적으로 도입된 플라스미드에 인코딩되지만, 박테리아 생성물의 발현을 변경하는 프로모터와 같은 박테리아의 게놈 내로 도입될 수 있다. DNA와 같은 이종성 핵산은 어떤 방식으로 치료 생성물을 인코딩하는 DNA의 발현을 매개할 수 있는 핵산을 포함하거나, 이는 어떤 방식으로 직접적으로 또는 간접적으로 치료제의 발현을 매개하는 펩타이드 또는 RNA와 같은 생성물을 인코딩할 수 있다.

[0279] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 요법은 질환 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에게 세포를 전달하는 것을 수반한다. 대상체에게 동종이계 또는 자가일 수 있는 세포는 *생체외에서*, 예컨대 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 의한 세포의 감염에 의해 변형되어, 대상체에게 도입될 때 생성물을 전달하거나 발현한다.

[0280] 본원에 사용된 바와 같이, 유전자 요법은 이러한 요법이 추구되는 장애 또는 병태를 가진 포유동물, 특히 인간의 표적 세포와 같은 특정 세포로 DNA와 같은 이종성 핵산의 전달을 포함한다. DNA와 같은 핵산은 DNA와 같은 이종성 핵산이 발현되고 이에 의해 인코딩된 치료제(들)가 생성되는 방식으로 선택된 표적 세포에 도입된다. 유전자 요법은 또한 결함이 있는 유전자를 대체하거나 포유동물 또는 이것이 도입된 세포에 의해 생성된 유전자 생성물을 보충하는 유전자 생성물을 인코딩하는 핵산을 전달하는 데 사용될 수 있다. 도입된 핵산은 포유동물 숙주에서 정상적으로 생성되지 않거나 치료적 유효량 또는 치료적으로 유용한 시간에 생성되지 않는 치료 화합물, 예컨대 성장 인자 또는 이의 저해제, 또는 종양 괴사 인자 또는 이의 저해제, 예컨대 이의 수용체를 인코딩할 수 있다. 치료 생성물을 인코딩하는 DNA와 같은 이종성 핵산은 생성물 또는 이의 발현을 증강시키거나 달리 변경하기 위해 감염된 숙주의 세포 내로 도입하기 전에 변형될 수 있다. 유전자 요법은 또한 저해제 또는 억제 인자 또는 다른 유전자 발현 조절자의 전달을 포함할 수 있다.

[0281] 본원에 사용된 바와 같이, "발현"은 폴리뉴클레오타이드의 전사 및 번역에 의해 폴리펩타이드가 생성되는 과정을 의미한다. 폴리펩타이드의 발현 수준은 예를 들어 숙주 세포로부터 생성된 폴리펩타이드의 양을 결정하는 방법을 포함하는 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 방법에는 ELISA, 겔 전기영동 후 쿠마시 블루 염색, 로우리 단백질 검정 및 브래드포드 단백질 검정에 의한 세포 용해물 내 폴리펩타이드의 정량화가 포함될 수 있지만 이로 제한되지 않는다.

[0282] 본원에 사용된 바와 같이, "숙주 세포"는 벡터를 수용, 유지, 재생산 및/또는 증폭하는 데 사용되는 세포이다. 숙주 세포는 또한 벡터에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드를 발현하는데 사용될 수 있다. 벡터에 함유된 핵산은 숙주 세포가 분열할 때 복제되어 핵산을 증폭시킨다.

[0283] 본원에 사용된 바와 같이, "벡터"는 벡터가 적절한 숙주 세포로 형질전환될 때 하나 이상의 이종성 단백질이 발현될 수 있는 복제 가능한 핵산이다. 벡터에 대한 언급은 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산이 일반적으로 제한 분해 및 리게이션에 의해 도입될 수 있는 벡터를 포함한다. 벡터에 대한 언급은 또한 변형된 항-CTLA-4 항체와 같은 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 포함한다. 벡터는 핵산의 증폭, 또는 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩타이드의 발현/디스플레이를 위해 숙주 세포 내로 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 도입하는 데 사용된다. 벡터는 전형적으로 에피솜으로 남아있지만, 유전자 또는 이의 일부가 게놈의 염색체 내로 통합되도록 설계될 수 있다. 효모 인공 염색체 및 포유동물 인공 염색체와 같은 인공 염색체인 벡터가 또

한 고려된다. 이러한 비히클의 선택 및 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 벡터는 또한 "바이러스 벡터" 또는 "바이러스성 벡터"를 포함한다. 바이러스 벡터는 외인성 유전자를 세포로 전달하기 위해(비히클 또는 셔틀로서) 외인성 유전자에 작동 가능하게 연결된 조작된 바이러스이다.

[0284] 본원에 사용된 바와 같이, "발현 벡터"는 이러한 DNA 단편의 발현에 영향을 미칠 수 있는 프로모터 영역과 같은 조절 서열과 작동 가능하게 연결된 DNA를 발현할 수 있는 벡터를 포함한다. 이러한 추가 분절은 프로모터 및 종결인자 서열을 포함할 수 있고, 선택적으로 하나 이상의 복제 원점, 하나 이상의 선택 가능한 마커, 인핸서, 폴리아데닐화 신호 등을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA에서 유래되거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내로 도입시 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터와 같은 재조합 DNA 또는 RNA 작제물을 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵 세포 및/또는 원핵 세포에서 복제 가능한 것과 에피솜으로 남아 있거나 숙주 세포 게놈에 통합되는 것을 포함한다.

[0285] 본원에 사용된 바와 같이, "1차 서열"은 폴리펩타이드의 아미노산 잔기의 서열, 또는 핵산 분자의 뉴클레오타이드의 서열을 의미한다.

[0286] 본원에 사용된 바와 같이, "서열 동일성"은 시험과 기준 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 사이의 비교에서 동일하거나 유사한 아미노산 또는 뉴클레오타이드 염기의 수를 지칭한다. 서열 동일성은 유사성 또는 동일성의 영역을 식별하기 위해 핵산 또는 단백질 서열의 서열 정렬에 의해 결정될 수 있다. 본원의 목적을 위해, 서열 동일성은 일반적으로 동일한 잔기를 식별하기 위한 정렬에 의해 결정된다. 정렬은 로컬 또는 글로벌일 수 있다. 비교된 서열 사이에서 일치, 불일치 및 갭이 식별될 수 있다. 갭은 동일하거나 유사한 문자가 정렬되도록 정렬된 서열의 잔기 사이에 삽입된 무효(null) 아미노산 또는 뉴클레오타이드이다. 일반적으로 내부 및 말단 갭이 존재할 수 있다. 갭 페널티를 사용할 때, 단부 갭에 대한 페널티 없이 서열 동일성이 결정될 수 있다(예를 들어, 말단 갭은 페널티를 받지 않음). 대안적으로, 서열 동일성은 갭을 고려하지 않고 동일한 위치의 수/총 정렬된 서열의 길이 x 100으로 결정될 수 있다.

[0287] 본원에 사용된 바와 같이, "글로벌 정렬"은 2개의 서열을 처음부터 끝까지 정렬하고, 각각의 서열의 각각의 문자를 한 번만 정렬하는 정렬이다. 서열 사이에 유사성 또는 동일성이 있는지의 여부에 관계없이 정렬이 생성된다. 예를 들어, "글로벌 정렬"을 기초로 하는 50% 서열 동일성은, 각각 길이가 100개 뉴클레오타이드인 2개의 비교 서열의 전체 서열 정렬에서 잔기의 50%가 동일함을 의미한다. 전체 정렬은 정렬된 서열의 길이가 동일하지 않은 경우에도 서열 동일성을 결정하는데 사용될 수 있음이 이해된다."단부 갭에 대한 페널티 없음"이 선택되지 않는 한, 서열의 말단 단부의 차이는 서열 동일성을 결정할 때 고려될 것이다. 일반적으로 글로벌 정렬은 대부분의 길이에 걸쳐 상당한 유사성을 공유하는 서열에 사용된다. 글로벌 정렬을 수행하기 위한 예시적인 알고리즘은 니들만-분쉬(Needleman-Wunsch) 알고리즘을 포함한다(Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453). 글로벌 정렬을 수행하기 위한 예시적인 프로그램은 공개적으로 사용 가능하며 국립 생명공학 정보 센터(NCBI) 웹사이트(ncbi.nlm.nih.gov/)에서 사용할 수 있는 글로벌 서열 정렬 툴 및 deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html에서 사용할 수 있는 프로그램을 포함한다.

[0288] 본원에 사용된 바와 같이, "로컬 정렬"은 2개의 서열을 정렬하지만, 유사성 또는 동일성을 공유하는 서열의 부분만을 정렬하는 정렬이다. 따라서 로컬 정렬은 하나의 서열의 하위분절이 다른 서열에 존재하는지 여부를 결정한다. 유사성이 없으면 정렬이 반환되지 않을 것이다. 로컬 정렬 알고리즘은 BLAST 또는 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 알고리즘을 포함한다(*Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)). 예를 들어, "로컬 정렬"을 기초로 하는 50% 서열 동일성은, 임의의 길이의 비교된 2개 서열의 전체 서열의 정렬에서 100개 뉴클레오타이드 길이의 유사성 또는 동일성 영역이 유사성 또는 동일성의 영역에서 동일한 50%의 잔기를 갖는다는 것을 의미한다.

[0289] 본원의 목적을 위해, 서열 동일성은 각각의 공급자에 의해 설정된 디폴트 갭 페널티와 함께 사용되는 표준 정렬 알고리즘 프로그램에 의해 결정될 수 있다. GAP 프로그램의 디폴트 매개변수는 하기를 포함할 수 있다: (1) Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 기재된 바와 같이 Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745-6763의 단항 비교 매트릭스(동일성에 대해 1의 값 및 동일하지 않음에 대해 0의 값을 함유함) 및 가중 비교 매트릭스; (2) 각각의 갭에 대해 3.0의 페널티 및 각각의 갭의 각각의 기호에 대해 추가의 0.10의 페널티; (3) 단부 갭에 대한 페널티 없음. 임의의 2개의 핵산 분자가 뉴클레오타이드 서열을 갖고 있는지, 또는 임의의 2개의 폴리펩타이드가 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%"동일한"아미노산 서열, 또는 퍼센트 동일성을 인용하는 다른 유사한 변형을 갖는지 여부는 로컬 정렬 또는 글로벌 정렬을 기초로 하는 알려진 컴

퓨터 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다(예를 들어, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software 참조, 수십 개의 알려지고 공개적으로 사용 가능한 정렬 데이터베이스 및 프로그램에 대한 링크 제공). 일반적으로, 본원의 목적을 위해 서열 동일성은 NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome)로부터 입수 가능한 니들만-분쉬 글로벌 서열 정렬 툴; LAlign (William Pearson implementing the Huang and Miller algorithm (*Adv. Appl. Math.* (1991) 12:337-357)); 및 deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html에서 입수 가능한 Xiaoqui Huang의 프로그램과 같은 글로벌 정렬을 기초로 한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 결정된다. 전형적으로, 비교되는 각각의 폴리펩타이드 또는 뉴클레오타이드의 전장 서열은 글로벌 정렬에서 각각의 서열의 전장에 걸쳐 정렬된다. 로컬 정렬은 또한 비교되는 서열이 실질적으로 동일한 길이일 때 사용될 수 있다.

[0290] 따라서, 본원에 사용된 용어 "동일성"은 시험과 기준 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 사이의 비교 또는 정렬을 나타낸다. 하나의 비제한적 예에서, "~과 적어도 90% 동일한"은 기준 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 90% 내지 100%의 동일성 백분율을 의미한다. 90% 이상의 수준에서의 동일성은 예시 목적으로 100개 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 시험 및 기준 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 길이가 비교된다고 가정할 때, 시험 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 중 10%(즉, 100개 중 10개) 이하가 기준 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 아미노산 또는 뉴클레오타이드와 상이하다는 사실을 나타낸다. 시험 및 기준 폴리뉴클레오타이드 사이에 유사한 비교가 이루어질 수 있다. 이러한 차이는 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 무작위로 분포된 점 돌연변이로 나타낼 수 있거나, 최대의 허용 가능한, 예를 들어 10/100개의 아미노산 차이(약 90% 동일성)까지 다양한 길이의 하나 이상의 위치에서 클러스터링될 수 있다. 차이는 또한 아미노산 잔기의 결실 또는 절두로 인한 것일 수 있다. 차이는 핵산 또는 아미노산 치환, 삽입 또는 결실로 정의된다. 비교된 서열의 길이에 따라, 약 85-90% 초과의 상동성 또는 동일성 수준에서 결과는 프로그램 및 갭 매개변수 세트와 무관할 수 있으며; 이러한 높은 수준의 동일성은 종종 소프트웨어에 의존하지 않고 쉽게 평가될 수 있다.

[0291] 본원에 사용된 바와 같이, "질환 또는 장애"는 감염, 후천적 상태 및 유전적 상태를 포함하지만 이로 제한되지 않는 원인 또는 병태로부터 초래되는 유기체의 병리학적 상태를 나타내며, 이는 식별 가능한 증상을 특징으로 한다.

[0292] 본원에 사용된 바와 같이, 질환 또는 병태를 가진 대상체를 "치료하는" 것은 대상체의 증상이 부분적으로 또는 전체적으로 완화되거나 치료 후 정적 상태를 유지하는 것을 의미한다.

[0293] 본원에 사용된 바와 같이, "치료"는 질환 또는 장애의 증상을 개선하는 임의의 효과를 지칭한다. 치료에는 예방, 요법 및/또는 치료가 포함된다. 치료는 또한 본원에 제공된 임의의 면역자극성 박테리아 또는 조성물의 임의의 약학적 사용을 포함한다.

[0294] 본원에 사용된 바와 같이, "예방"은 잠재적인 질환의 방지 및/또는 증상의 악화 또는 질환의 진행의 방지를 지칭한다.

[0295] 본원에 사용된 바와 같이, "방지" 또는 예방, 및 이의 문법적으로 동등한 형태는 질환 또는 상태가 발병할 위험 또는 확률이 감소되는 방법을 지칭한다.

[0296] 본원에 사용된 바와 같이, "약학적 유효 제제"는 예를 들어 마취제, 혈관수축제, 분산제, 및 저분자 약물 및 치료 단백질을 포함하는 통상적인 치료 약물을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 치료제 또는 생물활성제를 포함한다.

[0297] 본원에 사용된 바와 같이, "치료 효과"는 질환 또는 병태의 증상을 변경, 일반적으로 향상 또는 개선하거나 질환 또는 병태를 치유하는 대상체의 치료로 인한 효과를 의미한다.

[0298] 본원에 사용된 바와 같이, "치료적 유효량" 또는 "치료적 유효 용량"은 대상체에게 투여한 후 치료 효과를 발휘하기에 적어도 충분한 제제, 화합물, 물질 또는 화합물을 함유하는 조성물의 양을 지칭한다. 따라서, 질환이나 장애의 증상을 방지, 치유, 개선, 저지 또는 부분적으로 저지하는 데 필요한 양이다.

[0299] 본원에 사용된 바와 같이, "치료 효능"은 제제, 화합물, 물질, 또는 화합물을 함유하는 조성물이 투여된 대상체에서 치료 효과를 발휘하는 제제, 화합물, 물질, 또는 화합물을 함유하는 조성물의 능력을 지칭한다.

[0300] 본원에 사용된 바와 같이, "예방적 유효량" 또는 "예방적 유효 용량"은 대상체에게 투여될 때, 예를 들어, 의도된 예방 효과, 예컨대 질환 또는 증상의 발병 또는 재발을 방지 또는 지연시키거나, 질환 또는 증상의 발병 또

는 재발 가능성을 감소시키거나, 바이러스 감염의 발생을 감소시키는 것을 가질 제제, 화합물, 무질, 또는 화합물을 함유한느 조성물의 양을 지칭한다. 완전한 예방 효과는 1회 투여로 반드시 나타나는 것은 아니며, 일련의 투여 후에만 나타날 수 있다. 따라서, 예방적 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.

[0301] 본원에 사용된 바와 같이, 약학적 조성물 또는 다른 치료제의 투여와 같은 치료에 의한 특정 질환 또는 장애의 증상의 개선은, 영구적이든 일시적이든, 지속되거나 일시적이든 간에, 조성물 또는 치료제의 투여에 기인하거나 관련될 수 있는 증상의 임의의 약화를 지칭한다.

[0302] 본원에 사용된 바와 같이, "항암제" 또는 "항암 치료제"는 악성 세포 및 조직에 직접적으로 또는 간접적으로 방해적이거나 독성인 임의의 제제 또는 치료제를 지칭한다. 예를 들어, 항암제는 암세포를 죽이거나 그렇지 않으면 종양 또는 암세포의 성장을 저해하거나 손상시키는 제제를 포함한다. 예시적인 항암제는 화학요법제 및 면역요법제이다.

[0303] 본원에 사용된 바와 같이, "치료 활성"은 폴리펩타이드, 핵산 분자, 및 다른 치료 분자와 같은 치료제의 생체내 활성을 지칭한다. 일반적으로, 치료 활성은 질환 또는 병태의 치료와 관련된 활성이다.

[0304] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간과 같은 포유동물을 포함하는 동물을 지칭한다.

[0305] 본원에 사용된 바와 같이, 환자는 인간 대상체를 지칭한다.

[0306] 본원에 사용된 바와 같이, "동물"은 인간, 고릴라 및 원숭이를 포함하는 영장류; 마우스 및 래트와 같은 설치류; 닭과 같은 가금류; 염소, 소, 사슴 및 양과 같은 반추동물; 돼지 및 다른 동물과 같은 임의의 동물을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 비-인간 동물은 고려되는 동물로서 인간을 배제한다. 본원에 제공된 폴리펩타이드는 동물, 식물, 원핵생물 및 진균류와 같은 임의의 공급원으로부터 유래된다. 대부분의 폴리펩타이드는 포유류 기원을 포함하여 동물 기원이다.

[0307] 본원에 사용된 바와 같이, "조성물"은 임의의 혼합물을 의미한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 이의 조합일 수 있다.

[0308] 본원에 사용된 바와 같이, "조합"은 2개 이상의 항목 사이 또는 그 사이의 임의의 연관을 지칭한다. 조합은 2개의 조성물 또는 2개의 컬렉션과 같은 2개 이상의 개별 항목, 2개 이상의 항목의 단일 혼합물과 같은 이의 혼합물, 또는 이의 임의의 변형일 수 있다. 조합의 요소는 일반적으로 기능적으로 연관되거나 관련되어 있다.

[0309] 본원에 사용된 바와 같이, "병용 요법"은 2개 이상의 상이한 치료제의 투여를 지칭한다. 상이한 치료제는 개별적으로, 순차적으로, 간헐적으로 제공 및 투여될 수 있거나, 단일 조성물로 제공될 수 있다.

[0310] 본원에 사용된 바와 같이, "키트"는 활성화, 투여, 진단, 및 생물학적 활성 또는 특성의 평가를 포함하지만 이로 제한되지 않는 목적을 위해 다른 요소, 예컨대 병용을 위한 추가 제제 및 설명서 또는 이의 요소를 선택적으로 포함하는 포장된 조합이다.

[0311] 본원에 사용된 바와 같이, "단위 투여 형태"는 당업계에 알려진 바와 같이 인간 및 동물 대상체에 적합하고 개별적으로 포장된 물리적으로 분리된 단위를 지칭한다.

[0312] 본원에 사용된 바와 같이, "단일 용량 제형"은 직접 투여를 위한 제형을 지칭한다.

[0313] 본원에 사용된 바와 같이, "다중 용량 제형"은 다수 용량의 치료제를 함유하고 치료제의 여러 단일 용량을 제공하기 위해 직접 투여될 수 있는 제형을 지칭한다. 용량은 몇 분, 몇 시간, 몇 주, 며칠 또는 몇 달에 걸쳐 투여될 수 있다. 다중 용량 제형은 용량 조정, 용량 풀링 및/또는 용량 분할을 허용할 수 있다. 다중 용량 제형은 시간이 지남에 따라 사용되기 때문에 일반적으로 미생물 성장을 방지하기 위해 하나 이상의 방부제를 포함한다.

[0314] 본원에 사용된 바와 같이, "제조 물품"은 제조 및 판매되는 생성물이다. 본 출원 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, 이 용어는 포장 물품에 포함된 본원에 제공된 임의의 조성물을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0315] 본원에 사용된 바와 같이, "유체"는 흐를 수 있는 임의의 조성물을 지칭한다. 따라서 유체는 반고체, 페이스트, 용액, 수성 혼합물, 젤, 로션, 크림 및 다른 이러한 조성물의 형태인 조성물을 포함한다.

[0316] 본원에 사용된 바와 같이, 단리되거나 정제된 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편) 또는 이의 생물학적 활성 부분(예를 들어, 단리된 항원-결합 단편)은 세포 물질 또는 폴리펩타이드 또는 단백질이 유래되는 세포나 조직으로부터의 다른 오염성 단백질이 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다. 조제물은 이것이 순도를 평가하기 위해 당업자에

게 사용되는 표준 분석 방법, 예컨대 박층 크로마토그래피(TLC), 젤 전기영동 및 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)에 의해 결정될 때 쉽게 검출 가능한 불순물이 없는 것으로 보인다면 실질적으로 없는 것으로 결정될 수 있으거나, 추가 정제가 성분의 효소적 및 생물학적 활성과 같은 물리적 및 화학적 특성을 검출 가능하게 변경시키지 않도록 충분히 순수하다. 실질적으로 화학적으로 순수한 화합물을 생성하기 위한 화합물의 정제 방법은 당업자에게 알려져 있다. 그러나 실질적으로 화학적으로 순수한 화합물은 입체 이성질체의 혼합물일 수 있다. 이러한 경우, 추가 정제는 화합물의 비활성(specific 활성)을 증가시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "세포 추출물" 또는 "용해물"은 용해되거나 방해된 세포로부터 제조된 조제물 또는 분획을 지칭한다.

[0317] 본원에 사용된 바와 같이, "지속적 바이러스 감염"은, 바이러스가 청소되지 않지만 감염된 개체의 특정 세포에 남게 되는 감염이다. 지속적 감염은 숙주 세포를 급속하게 사멸화시키거나 심지어 과도한 손상을 입히지 않으면서 침묵 및 생산적인 감염 병기를 수반한다. 잠재, 만성, 및 느린 감염으로서 정의될 수 있는 중복형 지속적 바이러스-숙주 상호작용의 3개 유형이 존재한다. 지속적 바이러스 감염에 의해 야기되는 질환은 후천적 면역결핍 증후군(AIDS), AIDS-관련 합병증, 만성 간염, 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis)(만성 홍역 뇌염(chronic measles encephalitis)), 만성 파포바바이러스 뇌염(chronic papovavirus encephalitis)(진행성 다초점 백질뇌병증(progressive multifocal leukoencephalopathy)), 해면상 뇌병증(spongiform encephalopathy)(프리온에 의해 야기됨), 몇몇 헤르페스바이러스-유도 질환, 및 일부 신형성(neoplasia)을 포함한다. 이러한 감염 및 다른 감염을 야기하는 바이러스는 예를 들어, 헤르페스바이러스, 대상포진(varicella-zoster) 바이러스(VZV), 홍역 바이러스, 인간 T-세포 백혈병 바이러스(HTLV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 파포바바이러스, 인간 파보바이러스, 인간 유두종바이러스, 간염 바이러스, 아데노바이러스, 및 파보바이러스를 포함한다.

[0318] 본원에 사용된 바와 같이, "대조군"은, 시험 매개변수로 처리되지 않는 점을 제외하고는 또는 혈장 시료인 경우 이것이 관심 조건으로 영향을 받지 않는 정상 지원자로부터 유래될 수 있다는 점을 제외하고는 시험 시료와 실질적으로 동일한 시료을 지칭한다. 대조군은 내부 대조군일 수도 있다.

[0319] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "면역글로불린 도메인"을 포함하는 폴리펩타이드에 대한 언급은 하나 또는 복수의 면역글로불린 도메인을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0320] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "또는"은 대안만을 지칭하도록 명시적으로 나타내지 않는 한, 또는 대안이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 데 사용된다.

[0321] 본원에 사용된 바와 같이, 범위 및 양은 "약" 특정 값 또는 범위로 표현될 수 있다."약"에는 정확한 양도 포함된다. 따라서, "약 5개의 아미노산"은 "약 5개의 아미노산" 과 "5개의 아미노산"을 의미한다.

[0322] 본원에 사용된 바와 같이, "선택적인" 또는 "선택적으로"는 이후에 기재된 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않음을 의미하고, 이러한 설명은 상기 사건 또는 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 포함한다. 예를 들어, 선택적으로 변이체 부분은 해당 부분이 변이체 또는 비변이체임을 의미한다.

[0323] 본원에 사용된 바와 같이, 임의의 보호 기, 아미노산 및 다른 화합물에 대한 약어는 달리 지시되지 않는 한, 이의 보편적인 용법에 따라 인식된 약어, 또는 IUPAC-IUB 생화학적 명명법 위원회(*Biochem.* (1972) 11(9):1726-1732 참조)이다.

[0324] 제한이 아닌 개시의 명료성을 위해, 상세한 설명은 다음의 하위섹션으로 나뉜다.

[0325] **B.요법을 위한 면역자극성 박테리아의 개요**

[0326] 박테리아가 항암 활성을 가진다는 인식은 1800년대로 거슬러 올라가며, 당시 여러 의사들이 *스트렙토콕커스 피오게네스*에 감염된 환자의 종양 퇴행을 관찰하였다. William Coley는 말기 암 치료를 위해 박테리아를 사용한 제1 연구를 시작하였으며 *에스. 피오게네스*와 *세라티아 마르세센스(Serratia marcescens)*로 이루어진 백신을 개발하였고, 이는 육종, 암종, 림프종 및 흑색종을 포함한 다양한 암을 치료하는 데 성공적으로 사용되었다. 그 이후로, *클로스트리디움, 미코박테리움, 비피도박테리움, 리스테리아 모노사이토게네스* 및 *에스케리키아*를 비롯한 다수의 박테리아 종이 항암 백신의 공급원으로서 연구되어 왔다(예를 들어, 국제 PCT 출원 공개 번호 WO 1999/013053 및 WO 2001/025399; Bermudes *et al.* (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199; Patyar *et al.* (2010) *Journal of Biomedical Science* 17:21; 및 Pawlek *et al.* (2003) *Lancet Oncol.* 4:548-556 참조).

[0327] 치료 플랫폼으로서, 박테리아는 종양용해 바이러스와 같은 다른 요법와 비교하여 몇 가지 장점이 있다. 일부 박테리아 종은 경구 및 전신(정맥내; IV) 투여되도록 조작될 수 있으며, 이는 시험관내 및 생체내에서 쉽게 증식하며, 동결건조된 상태로 저장 및 수송될 수 있다. 박테리아 염색체는 엑손이 없기 때문에 쉽게 조작될 수 있으며, 수많은 균주에 대한 완전한 게놈이 완전히 특징화되었다(Felgner 등 (2016) *mBio* 7(5):e01220-16). 많은 유형의 박테리아가 바이러스보다 저렴하고 생성하기가 더 쉬우며, 조작된 박테리아의 적절한 전달은 숙주 세포 게놈에 영구적으로 통합되지 않고 상피 세포보다 골수성 세포를 우선적으로 감염시키고 필요하다면 항생제에 의해 신속하게 무효화되어 이를 안전하게 만들기 때문에 경구 전달보다 선호할 수 있다.

[0328] 이러한 유리한 특성을 이용하도록 변형된 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 본원에 제공된 박테리아는 종양 미세환경, 특히 종양-체류 면역 세포(골수성 세포), 예컨대 종양-연관 대식세포(TAM), 수지상 세포(DC) 및 골수-유래 억제 세포(MDSC)에서 감염 및 축적되도록 변형되고, 또한 높은 수준의 치료 단백질 및 조합, 특히 상보적 조합을 발현 및 전달하도록 설계된다. 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 암을 예방하고/치료하기 위한 백신으로서 그리고 또한 박테리아, 바이러스, 기생충 및 다른 병원체를 포함한 병원체에 대한 백신으로서 사용될 수 있다. 이러한 용도는 종양-체류 대식세포에 축적되고 또한 직접적으로, 예컨대 근육내 또는 흡입에 의해 투여될 때 식세포에 축적되며, 지속 가능한 면역 반응 및 면역력을 촉진하는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 능력에 의존한다. 암의 치료에 사용되는 박테리아의 특성은 또한, 백신으로서의 이의 용도에 유리하다. 이러한 특성은 TLR2, TLR4 및 TLR5 반응을 감소시키는 게놈 변형, 및 다른 변형, 예컨대 시험관내에서의 성장을 허용하지만 생체내에서의 성장을 감소시키거나 무효화시키는 영양 요구체, 및 종양 미세환경에서 축적된 영양소, 예컨대 아데노신의 면역억제성 효과를 감소시키는 영양 요구체, 및 T-세포를 비활성화시킬 수 있는 박테리아 효소, 예컨대 아스파라기나제의 면역억제성 효과를 무효화시키는 게놈 변형으로부터 유래된다.

[0329] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 기존의 박테리아 요법, 또한 세포 요법, 종양용해성 바이러스 요법 및 선행 박테리아 요법보다 우수한 유리한 특성을 갖는다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 임의의 적합한 경로로 투여될 수 있지만, 정맥내와 같은 전신 투여에 적합하다. 본원에 제시되고 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 주요 면역 경로를 표적으로 할 수 있다.

[0330] 항암 치료제뿐만 아니라 항암 백신 및 병원체 백신, 및 또한 RNA 전달 비히클로서 사용되거나 적응될 수 있는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 특정 용도는 특정 게놈 변형 및 페이로드에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어 항원 제시 세포(APC)에서의 발현을 위해 완전한 또는 부분적 세포질 도메인 결실이 있는 절두된 공동자극성 분자(수용체 또는 리간드; 예를 들어, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L)를 포함한 하나 이상의 치료 생성물을 인코딩하는 유전적 페이로드를 전달하는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 절두된 유전자 생성물은 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포에 대한 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고, 결실되거나 절두된 세포질 도메인으로 인해 APC에 역조절 신호를 할 수 없다. 면역자극성 박테리아는 유형 I 인터페론(IFN)을 항시적으로 유도하는 것 및 면역 반응의 항바이러스 유형을 자극시키는 것, 예컨대 IL-15, 특히 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15 복합체)로서 제공되는 IL-15, 및 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 조작된 STING 단백질을 포함한 복수의 생성물을 인코딩할 수 있고, 또한 원하지 않는 염증 반응을 무효화시키거나 감소시키기 위해 감소된 NF-κB 신호전달을 갖도록 변형될 수 있다.

[0331] 면역자극성 박테리아는 IL-2, IL-7, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-12, IL-15, IL-15/IL-15Rα 사슬 복합체, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, 인터페론-α, 인터페론-β, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, 세포기질성 DNA/RNA 센서 또는 유형 I IFN 경로 단백질, 예컨대 기능-획득 또는 항시적 활성 STING, IRF3, IRF7, MDA5, 또는 RIG-I 변이체(유형 I IFN을 유도함), TGF-베타의 저해제, 예컨대 TGF-β 저해성 항체, TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 및 TGF-베타 결합 유인 수용체, 항체 및 이의 단편, 예컨대 면역 체크포인트 및 다른 항암 표적, 예컨대 VEGF 및 IL-6, 공동자극성 수용체/분자, 예컨대 결실되거나 절두된 또는 다르게는 무효화된 4-1BBL을 포함한 4-1BBL을 표적화하는 것, 및 다른 것 중 하나 이상을 인코딩하거나 발현할 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한, 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 완전 또는 부분 세포질 도메인 결실을 갖는 절두된 공동자극성 분자(예를 들어, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L)를 인코딩하거나 발현할 수 있으며, 절두된 유전자 생성물은 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포로의 항시적 면역-자극성 신호전달을 할 수 있고, 결실된 또는 절두된 세포질 도메인으로 인해 APC로의 역조절 신호를 할 수 없다. 다른 인코딩된 치료 생성물은 이중특이적 T-세포 연계자(engager)(상표명 BiTEs® 하에 상업적으로 입수 가능함), 예컨대 DLL3 X CD3 연계자로 지칭되는 것을 포함한다.

[0332] 이러한 치료 생성물 및 제제의 조합은 단일 치료 조성물에서 발현될 수 있다. 박테리아 게놈의 변형으로 인해, 면역자극성 박테리아는 종양-특이적 위치화 및 농화를 나타내고, 항종양 면역력 경로의 활성화를 위해 정맥내(IV) 투여를 제공하며, 이는 전신으로 활성화되면 독성이다.

[0333] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 예컨대 직접 투여에 의해 백신으로서 투여될 때 유전적으로 안전하고 종양, 종양 미세환경 및/또는 종양-체류 면역 세포, 및 또한 식세포를 표적화하도록 설계된다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양-체류 면역 세포에 축적되고, 독성 부작용이 없거나 제한된 독성 부작용으로 종양 및 종양 미세환경에서 항암 면역 자극을 유도하거나 촉진하는 치료 생성물, 특히 조합을 전달하기에 충분히 오래 지속되는 면역자극성 박테리아를 제공하기 위해 협력하여 기능하는 게놈 변형 및 다른 변형, 뿐만 아니라 인코딩된 치료 생성물의 조합을 포함한다. 정맥내(IV)와 같이 전신적으로 전달되는 경우, 면역자극성 박테리아는 전이성 병변을 비롯한 종양에서 농화되며; 이는 특히 종양-연관 대식세포(TAM), 골수-유래 억제 세포(MDSC) 및 수지상 세포(DC)를 포함한 종양-체류 골수성 세포에 면역 페이로드의 효율적인 유전자 전달을 제공하고; 이는 강력한 국소 면역 반응을 유도하여 종양을 방해하고 미래의 재발에 대비한 백신을 접종하며; 치료가 끝나면 식균작용 및 감염된 세포에 의한 방해와 같이 자연적으로 제거되거나 항생제의 과정에 의해 빠르게 방해될 수 있다.

[0334] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 설계된 퓨린/아데노신 영양요구성으로 인해 종양 미세환경 및/또는 종양-체류 면역 세포에서 우선적인 축적을 나타내고, 식세포 내부에서 복제 불능을 나타낸다. 혈청 보체에 의한 비활성화를 피하는 면역자극성 박테리아는 정상 조직에 대한 독성을 최소화하면서 종양 미세환경 내에서 직접 고농도로 다양한 면역치료제 및 치료 생성물의 전달을 가능하게 하고 본원에 제공된다.

[0335] 예를 들어, 섹션 C.9에서와 같이 더 자세히 설명된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 *msbB*$^-$/*pagP*$^-$가 되도록 하는 게놈의 하나 이상의 변형을 포함하며, 이는 LPS에서 지질 A를 변경하여, 펜타-아실화(야생형 지질 A는 6-7개의 지방산 사슬을 가짐)를 초래하며, TLR4 친화도를 감소시키고; *purI*$^-$와 같은 아데노신/아데닌 영양요구체이며; T-세포 품질을 향상시키는 아스파라기나제 II$^-$(*ansB*$^-$)이고; 편모가 결여되어 있으며(편모 결핍); 컬리 핌프래를 생성하는 유전자/생성물이 결핍되고, 예컨대 다른 특성 중에서 컬리 핌브래를 제거하는 *csgD*$^-$이고; 삽입, 결실, 방해 및 임의의 다른 변형과 같은 다른 선택적 게놈 변형을 포함하여, 인코딩된 생성물(들)이 본원에 상세히 논의된 바와 같이 활성 형태로 생성되지 않게 된다. 면역자극성 박테리아는 진핵생물 프로모터의 제어 하에 하나 이상의 치료 생성물, 특히 항암 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함한다. 이러한 동일한 변형 및 특성은 특히 직접적인 투여에 의해, 예컨대 흡입, 및 근육내(IM) 주사, 및 페이로드를 식세포에게 전달하기 위한 다른 직접적인 경로에 의해 전달될 때 이를 암 치료제 및 암 백신, 및 병원체 백신으로서 사용하기 위한 RNA에 대한 전달 비히클로서 그리고 백신으로서 유용하게 만든다.

[0336] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 비활성 인코딩된 생성물(들)을 초래하는 예컨대 유전자 모두 또는 일부의 배향을 변화시키는 게놈 변형, 예컨대 결실, 방해, 및 다른 변경을 포함하며, 따라서 기능적 유전자 생성물(들)이 발현되지 않는다. 제공된 면역자극성 박테리아 중에는 생성된 박테리아가 *msbB*$^-$/*purI*$^-$가 되도록 변형되는 것이 있다. 일부 구현예에서, 박테리아는 *msbB*$^-$ 및 *purI*$^-$이며, 이로써 *msbB* 및/또는 *purI* 유전자의 저거도 코딩 부분의 전장이 결실된다. 박테리아의 게놈은 또한, 박테리아에서 편모가 결여되도록 변형될 수 있다. 이는 편모를 정상적으로 발현하는 박테리아에서 수행된다. 이러한 박테리아에서, 예를 들어 살모넬라내의 *fliC* 및 *fljB* 유전자, 또는 다른 종에서 *fliC* 및 *fljB*에 등가인 유전자가, 기능적 유전자 생성물이 발현되지 않도록 결실되거나 다르게는 변형될 수 있다. 박테리아는 또한, 이것이 아데노신 영양 요구체이고/이거나 *msbB*$^-$/*pagP*$^-$이도록 변형될 수 있다. 또한, 면역자극성 박테리아 및 이를 함유하는 약학적 조성물이 제공되며, 여기서 박테리아는 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않고, 따라서 박테리아는 *ansB*$^-$이다. 인코딩된 아스파라기나제 활성의 무효화는 T-세포 생존력/활성을 향상시키거나 보유시킨다. 백신으로서 사용되는 치료적 박테리아, 예컨대 비활성화된 또는 약독화된 박테리아는 아스파라기나제 활성을 무효화시키도록 게놈을 변형시킴으로써 향상될 수 있다. 이러한 백신의 예는 결핵에 대해 면역화하는 데 사용되는 바실러스 칼메트-게렝(BCG) 백신 및 관련 백신이다. BCG 백신은 다양한 효과성을 갖는 것으로 알려져 있다; 아스파라기나제의 무효화는 이러한 백신의 효과성을 향상시킬 수 있는데, 왜냐하면 내인성 박테리아 아스파라기나제가 T-세포 활성을 저해하거나 감소시키기 때문이다.

[0337] 종양-체류 골수성 세포에 치료 생성물(예를 들어, 항시적 활성 STING 변이체 및 다른 면역조절 단백질 및 생성물)을 전달하는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 적응 면역력을 촉진하고 T-세포 기능을 증강시킨다. 면역

자극성 박테리아는 면역억제성 종양 미세환경을 적응성 항종양 표현형으로 완전히 개조하고, 내재성 면역력의 촉진 및 적응 면역력의 억제를 특징으로 하는 박테리아 표현형에서 멀어지게 한다. 본원에 기재된 바와 같이, 이러한 특성 및 페이로드는 또한, 백신 및 RNA 전달 플랫폼으로서 박테리아의 사용에 대해 조사될 수 있다.

[0338] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 비변형 박테리아와 비교하여 또는 균주 VNP20009와 비교하여 유의하게 더 큰, 예컨대 적어도 약 100,000배 더 큰 종양 침윤 및 농화를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 박테리아는 이것이 종양에서 대식세포(및 백신으로서 투여될 때 다른 식세포)를 감염시켜 이의 페이로드, 예컨대 조작된 STING의 조합을 전달하는 게놈 변형을 함유한다(다양한 조작된 STING 단백질, 예컨대 기능-획득 돌연변이, 예컨대 유형 I IFN의 유도를 항시적으로 만들기 위해 N154S/R284G를 갖는 인간 STING, 및 더 낮은 NF-κB 신호 전달 활성을 갖는 비인간 STING으로부터의 CTT, 예컨대 인간 STING과 비교하여 태즈메이니아 데빌로부터의 CTT, 및 다양한 형태의 IL-15, 특히 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15 복합체)에 관하여 논의를 전반적으로 참조). 이러한 조합은 상승작용 효과를 가지며, 높은 정도의 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함한 T-세포, 종양의 침윤을 초래하는 것으로 본원에 제시된다. 이러한 조합은 수많은 치료적 개입 지점에서 작동하므로 포괄적인 면역요법이다. 면역자극성 박테리아는 플라스미드를 숙주 세포 내로 전달하는 종양-활성화된 대식세포(TAM)에 의해 소모되며, 이는 인코딩된 생성물, 예컨대 IL-15 및 조작된 STING을 발현한다.

[0339] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양-체류 면역세포에 의해 소모되며, 면역세포 및 종양 미세환경에서 발현 및 생성되는 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함한 이의 내용물을 전달하여 항종양 면역력을 생산한다. *asd*⁻이고 숙주 세포 제어 하에 발현을 위해 플라스미드 상에서 인코딩되는 보체 유전자를 포함하지 않는 박테리아는 숙주에서 복제되지 않는다. 박테리아는, *thyA*⁻이며, 티민 성장용 보조제를 필요로 하는 비활성 또는 결측(missing) 유전자 생성물을 초래하는 게놈 변형, 예컨대 결실, 삽입, 전위 또는 변형으로 인해 페이로드를 식세포 내로 유사하게 전달하지만 이러한 세포에서 복제될 수 없는 박테리아가 제공된다.

[0340] **1.박테리아 암 면역요법**

[0341] 많은 고형 종양 유형이 항-CTLA-4, 항-PD-1 및 항-PD-L1 요법과 같은 승인된 체크포인트 요법에 대해 매우 성불응으로 만드는 심각하게 면역억제성인 미세환경을 진화시켰다. 종양이 체크포인트 요법에 대한 내성을 진화시킨 하나의 기전은 종양내 T-세포 및 종양 항원 교차-제시 수지상 세포(DC)가 없기 때문이며, 이는 T-세포 배제, 비염증 또는 "콜드 종양(cold tumor)"(Sharma *et al.* (2017) *Cell* 168(4):707-723). 종양이 T-세포에 염증을 일으키고 체크포인트 면역요법에 반응하는 소수의 환자의 경우, 이러한 환자는 종종 심각한 자가면역 독성을 경험하고 많은 환자가 결국 재발하여 체크포인트 불응성이 될 것이다(예를 들어, Buchbinder *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125:3377-3383; Hodi *et al.* (2010) *N. Engl. J. Med.* 363(8):711-723; 및 Chen *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125:3384-3391 참조). 종양은 면역 감시를 피하기 위해 여러 기전을 개시하고, 면역력을 억제시키기 위해 항종양 면역력 세포를 재프로그래밍하고, 항종양 T-세포를 배제 및 비활성화하고, 표적 암 요법에 대한 내성을 발생시킨다(예를 들어, Mahoney *et al.* (2015) *Nat. Rev. Drug Discov.* 14(8):561-584 참조). 이 문제를 해결하려면 이러한 종양에 적절하게 염증을 일으키고 장기간 지속되는 종양 퇴행을 제공할 수 있는 항종양 면역력을 생성할 수 있는 면역 요법이 필요할 것이다. 이에 더하여, 종양내 요법은 다루기 힘들고 전이성 질환 환경에서 상당히 제한적일 것이다. 각각의 개별적인 전이성 병변에 적절히 염증을 일으키고 다양한 면역억제 경로를 극복하는 전신 투여 요법이 필요하다. 종양-체류 면역 세포를 특이적으로 표적화하고 다수의 상보적 유전자 페이로드/치료 생성물을 발현하는 능력으로 인해, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이러한 문제를 해결하도록 설계된다.

[0342] **2.종양 미세환경을 표적화하는 선행 요법**

[0343] 종양 미세환경(TME)을 표적화하고 항종양 면역력을 촉진하기 위한 많은 요법이 개발되었다. 각각은 고유한 문제와 단점을 가지고 있으며, 이는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 의해 해결된다.

[0344] **a. 자가 T-세포 요법의 한계**

[0345] 고도로 면역억제적인 종양 미세환경에 접근하고 종양에 염증을 일으키고 항종양 면역력을 촉진하기 위한 적절한 면역 반응을 유도하는 것을 목표로 여러 전신 투여 치료 플랫폼이 임상적으로 조사되었다. 이러한 플랫폼에는 키메라 항원 수용체 T-세포(CAR-T-세포)가 포함되며, 이는 환자로부터 T-세포를 수합하고 T-세포 수용체를 특정 종양 항원에 특이적인 항체 Ig 가변 세포외 도메인에 융합하도록 재설계함으로써 생성된다. 이는 활성화된 T-세포의 세포용해 특성과 함께 항체의 항원 인식 특성을 세포에 부여한다(예를 들어, Sadelain *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125(9):3392-3400 참조). CD19 CAR-Ts 티사겐레클류셀(tisagenlecleucel)(예를 들어, 상표

Kymriah®) 및 악시카브타겐 실로류셀(axicabtagene ciloleucel)(상표 Yescarta®)의 FDA 승인과 같은 이 기술의 가능성과 약효에도 불구하고 성공은 CD19+ 조혈 악성물로 제한되었고, 치명적인 면역 관련 이상반응(adverse event)이라는 비용이 들었다(예를 들어, Jackson *et al.* (2016) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13(6):370-383 참조). 종양은 항원 CD19를 포함하는 고형 종양에 대한 표적화된 종양 항원을 하향조절하기 위해 빠르게 돌연변이할 수 있으며, 이에 의해 면역 탈출을 촉진한다(예를 들어, Mardiana *et al.* (2019) *Sci. Transl. Med.* 11(495):eaaw2293 참조). 종양-특이적 표적 항원이 과다하지 않다. 건강한 조직에서 발현되지 않는 고형 종양 표적은 CAR-T 요법의 주요 장애물이다. 그 외에도 CAR-T 요법은 종양으로의 적절한 T-세포 침윤에 필요한 T-세포 케모카인 구배가 충분하지 않기 때문에 고형 종양 미세환경에 접근하는 데 있어서 다른 장애물을 겪는다. 또한, 일단 종양이 침윤되면 빠르게 비활성화된다(예를 들어, Brown *et al.* (2019) *Nat. Rev. Immunol.* 19(2):73-74 참조). CAR-T-세포의 안전성이 크게 향상되고 효능이 고형 종양으로 확대되더라도, 이러한 노동 집약적인 요법과 관련된 실현 가능성과 비용은 여전히 이의 더 광범위한 채택을 제한한다.

[0346] **b.바이러스 백신 플랫폼**

[0347] 종양용해성 바이러스(OV)는 종양 세포 용해를 유도하고, T-세포를 종양으로 모집하고, 종양 세포가 읽을 수 있는 유전 물질을 전달하여 면역 조절 단백질을 생성하는 자연적이고 조작된 특성을 갖고 있다. 예를 들어, 탈리모겐 래허파렙벡(T-VEC: Talimogene laherparepvec)으로 명명된 종양용해 바이러스는 종양내 투여되는 항흑색종 항원 및 사이토카인 GM-CSF(과립구-대식세포 콜로니-자극 인자)를 인코딩하는 변형된 단순 포진 바이러스이다. 이는 전이성 흑색종에 대해 FDA 승인을 받았다(예를 들어, Bastin *et al.* (2016) *Biomedicines* 4(3):21 참조). T-VEC은 일부 흑색종 환자에 대한 임상적 이점을 실증하였으며, 면역 체크포인트 항체 또는 IL-2 및 인터페론-알파와 같은 FDA-승인 전신 사이토카인보다 면역 독성이 적다(예를 들어, Kim *et al.* (2006) *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(5):349-366; 및 Paul *et al.* (2015) *Gene* 567(2):132-137 참조).

[0348] 종양용해성 바이러스(OV)는 항암 요법으로서 많은 한계를 갖고 있다. 첫째, 종양용해성 바이러스는 혈액에서 인간 보체 시스템에 의해 빠르게 비활성화된다. 원하는 치료 효과를 갖기 위해 전신 투여를 통해 충분한 바이러스를 전달하는 것이 어렵다는 것이 입증되었다. 종양내 전달은 전이 환경(병변이 신체 전체에 퍼짐)에서 제한적이고, 대부분의 고형 종양 유형(예를 들어, 폐 및 내장 병변)에 대해 다루기 어려우며, 반복 투여를 제한하는 주사를 위한 중재적 유도 방사선 요법이 필요하다. 바이러스는 상업적 규모로 제조하고 저장하기 어려울 수 있다. 무엇보다도 파라믹소바이러스, 레오바이러스 및 피코르나바이러스를 기초로 하는 것과 같은 대부분의 OV-기초 백신은 유사한 한계를 갖고 있다(예를 들어, Chiocca *et al.* (2014) *Cancer Immunol. Res.* 2(4):295-300 참조). 종양용해성 바이러스는 본질적으로 면역원성이고 인간 혈액에서 빠르게 제거되며, 종양으로 트래픽(traffic)하는 T-세포는 더 약한 종양 신생항원보다 바이러스 항원에 대해 훨씬 더 높은 친화도를 갖는다(예를 들어, Aleksic *et al.* (2012) *Eur. J. Immunol.* 42(12):3174-3179 참조). 따라서, 플랫폼의 인식된 기술적 한계 외에도 OV는 지속되는 항종양 면역력을 자극하는 제한된 능력을 가질 수 있다(예를 들어, 문헌[Kedl *et al.*(2003) *Curr Opinion Immunol. 15*:120-127]; 및 문헌[Aleksic *et al.*, (2012) *Eur. J. .Immunol. 42*:3174-3179]를 참조하며, 이는 바이러스 항원에 결합하는 TCR이 암 관련 항원에 결합하는 TCR보다 더 높은 HLA-A2 친화도를 가짐을 보여줌).

[0349] **c.박테리아 암 요법**

[0350] 다수의 박테리아 종은 전임상 동물 연구에서 원위 부위에서 주사될 때 고형 종양 내에서 우선적으로 복제되는 것으로 실증되었다. 여기에는 *살모넬라, 비포도박테리움, 클로스트리디움, 에스케리키아* 등이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 박테리아 감염에 대한 숙주의 내재성 면역 반응과 조합된 박테리아의 종양-귀소 특성은 항종양 반응을 매개할 수 있다. 이러한 종양 조직 향성(tropism)은 종양의 크기를 다양한 정도로 감소시킨다. 이러한 박테리아 종의 종양 향성에 기여하는 인자 중 하나는 무산소 및 저산소 환경에서 복제하는 능력이다. 이러한 자연적인 종양-향성 박테리아의 수는 항종양 반응의 약효를 증가시키기 위해 추가로 조작되었다(Zu *et al.* (2014) *Crit. Rev. Microbiol.* 40(3):225-235; 및 Felgner *et al.* (2017) *Microbial Biotechnology* 10(5):1074-1078에서 검토됨). 동물 연구에서 개념 증명에도 불구하고, 동물 모델에는 없는 인간 혈청 내 보체 인자는 박테리아를 비활성화시켜 암 치료를 위한 요법으로서의 사용을 제한할 수 있다.

[0351] 경구 또는 전신 투여를 위해 박테리아 균주는 약독화되어 전신 질환 및/또는 패혈성 쇼크를 일으키지 않지만, 효과적인 종양 콜로니화 및 보체에 의한 비활성화에 대한 내성을 위해 어느 정도의 감염성을 유지한다. *클로스트리디움*(예를 들어, Dang *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(26):15155-15160; 미국 특허 공보 2017/0020931 및 2015/0147315; 및 미국 특허 7,344,710 및 3,936,354 참조), *미코박테리움*(예를 들어, 미국

특허 공개 번호 2015/0224151 및 2015/0071873 참조), *비피도박테리움*(Dang *et al.* (2001); 및 Kimura *et al.* (1980) *Cancer Res.* 40:2061-2068 참조), *락토바실러스*(예를 들어, Dang 등 (2001) 참조), *리스테리아 모노사이토게네스*(예를 들어, Le *et al.* (2012) *Clin. Cancer Res.* 18(3):858-868; Starks *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:420-427; 및 미국 특허 공개 번호 2006/0051380 참조) 및 *에스케리키아 콜라이*(예를 들어, 미국 특허 번호 9,320,78 참조)을 포함하는 다수의 상이한 박테리아 종은 항암 요법의 가능한 제제로서 연구되었다.

[0352] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양 치료를 위해 개발된 이전 박테리아의 문제를 해결하는 게놈 변형을 포함한다. 변형은 일반적으로, 유전자 또는 유전자 생성물을 비활성으로 되는 게놈 내 변화를 포함한다. 이는 유전자 또는 이의 일부를 결실시키거나 유전자를 방해함으로써, 또는 비활성 생성물을 초래하는 임의의 다른 이러한 변화에 의해 실시될 수 있다. 게놈 변형은 종양 미세환경에서 박테리아의 표적화 또는 축적을 향상시키며, 특히 박테리아가 종양-체류 면역 세포를 우선적으로 또는 이것만 감염시키고 건강한 조직은 감염시키지 않도록 설계되어 독성을 저하시키고 인코딩된 생성물의 전달을 향상시킨다. 면역자극성 박테리아는 또한 종양의 면역억제 효과를 무효화하고, 숙주의 항종양 반응을 증강시키고, 항종양 생성물을 제공하도록 설계된, 이의 조합을 포함한 치료 생성물을 전달하도록 설계된다.

[0353] **i. *리스테리아***

[0354] 암의 마우스 모델에서 발현된 종양 항원에 대한 강력한 $CD8^+$ T-세포 프라이밍을 유도할 수 있는 약독화된 살아있는 세포내 박테리아인 *리스테리아 모노사이토게네스*도 박테리아 암 벡터로서 조사되었다(예를 들어, Le 등 (2012) *Clin. Cancer Res.* 18(3):858-868). 프라임-부스트 접근법에서 동종이계 췌장암-기초 GVAX 백신과 더불어 종양 항원 메조텔린을 혼입하는 *엘. 모노사이토게네스*-기초 백신의 임상 시험에서, 진행된 췌장암 환자의 중앙 생존 기간은 6.1개월로 나타났고, GVAX 백신 단독으로 치료된 환자에 대한 중앙 생존 기간은 3.9개월이었다(예를 들어, Le 등 (2015) *J. Clin. Oncol.* 33(12):1325-1333 참조). 그러나, 이러한 결과는 더 큰 2b상 연구에서 복제되지 않았으며, 이는 인간에서 친화도가 낮은 종양 신생항원에 대한 말초 면역 감시를 전복시키는 어려움을 지적한다. *엘. 모노사이토게네스*는 또한 인간 대식세포에서 *엘. 모노사이토게네스*에 의해 발생하는 것으로 실증되지 않은 효율적인 플라스미드 전달의 전제 조건인 식균 작용 후 박테리아가 용해되어야 하는 요건으로 인해, 인코딩된 종양 항원에 대한 제한된 면역 반응을 보여주었다.

[0355] **ii. *살모넬라* 종**

[0356] *살모넬라 엔테리카* 혈청변형 티피무리움(*에스. 티피무리움*)은 항암 치료제로 사용하기 위한 박테리아 종의 예시이다. *에스. 티피무리움*은 그람-음성 통성 혐기성 박테리아(facultative anaerobe)으로서, 조직 괴사, 누출된 종양 혈관 구조 및 면역억제된 종양 미세환경에서의 생존 가능성 증가로 인해 저산소 및 괴사 영역에 우선적으로 축적된다(예를 들어, Baban *et al.* (2010) *Bioengineered Bugs* 1(6):385-394 참조). 통성 혐기성 미생물인 *에스. 티피무리움*은 호기성 및 혐기성 조건에서 성장할 수 있으므로, 덜 저산소성인 작은 종양과 더 저산소성인 큰 종양 둘 다에 콜로니화할 수 있다.

[0357] 분변-경구 경로를 통한 *에스. 티피무리움* 전파는 국소 위장 감염을 일으킨다. 박테리아는 또한 혈류와 림프계로 들어가 간, 비장 및 폐와 같은 전신 조직을 감염시킬 수 있다. 야생형 *에스. 티피무리움*의 전신 투여는 TNF-α 및 IL-6을 과도하게 자극하여 사이토카인 캐스케이드 및 패혈성 쇼크를 유발하며, 치료하지 않으면 치명적일 수 있다. 결과적으로, *에스. 티피무리움*과 같은 병원체성 박테리아 균주는 종양 조직을 효과적으로 콜로니화하는 능력을 완전히 억제하지 않으면서 전신 감염을 예방하기 위해 약독화되어야 한다. 약독화는 종종 박테리아 외막과 같은 병원체 패턴 인식을 통해 면역 반응을 이끌어낼 수 있는 세포 구조를 돌연변이시키거나 보충 영양소가 없을 때 박테리아의 복제 능력을 제한함으로써 달성된다.

[0358] *에스. 티피무리움*은 대식세포와 같은 포식 골수성 세포에 의해 빠르게 흡수되거나, *살모넬라* 병원성 섬 1(SPI-1)-인코딩된 유형 III 분비 시스템(T3SS1)을 통해 상피세포와 같은 비-포식성 세포를 직접 침범할 수 있는 세포내 병원체이다. 일단 세포 내부에 들어가면, 이는 SPI-2 조절을 통해 *살모넬라*-함유 액포(SCV) 내에서 복제할 수 있으며, 일부 상피 세포의 세포기질로 빠져나갈 수도 있다(예를 들어, Agbor *et al.* (2011) *Cell Microbiol.* 13(12):1858-1869; 및 Galan and Wolf-Watz (2006) *Nature* 444:567-573 참조). *에스. 티피무리움*의 유전적으로 변형된 박테리아 균주는 직접적인 종양사멸화 효과를 이끌어내고/내거나 종양사멸화 분자를 전달하는 항종양제로 기재되었다(예를 들어, Clairmont *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002; Bermudes, D. *et al.* (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199; Zhao, M. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:755-760; 및 Zhao, M. *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:7647-7652 참조).

[0359] 박테리아 병원체의 약독화를 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어 영양요구성 돌연변이는 박테리아가 필수 영양소를 합성할 수 없도록 하고, *aro*, *pur*, *gua*, *thy*, *nad* 및 *asd*와 같은 유전자의 결실/돌연변이(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2012/0009153 참조)가 사용된다. 이러한 유전자를 포함하는 생합성 경로에 의해 생성된 영양소는 종종 숙주 세포에서 사용할 수 없으므로 박테리아 생존이 어렵다. 예를 들어, *살모넬라* 및 다른 종의 약독화는 해당과정을 방향족 아미노산 생합성에 연결하는 시키메이트 경로(shikimate pathway)의 일부인 *aroA* 유전자의 결실 또는 방해에 의해 달성될 수 있다(예를 들어, Felgner 등 (2016) *mBio* 7 참조). (5):e01220-16). *aroA*의 결실 또는 방해는 방향족 아미노산에 대한 박테리아 영양요구성 및 후속 약독화를 초래한다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2003/0170276, 2003/0175297, 2012/0009153 및 2016/0369202; 및 국제 출원 공개 번호 56928 /032165 및 WO 2016/025582 참조). 유사하게는, *aroC* 및 *aroD*를 포함하는 방향족 아미노산의 생합성 경로에 관여하는 다른 효소는 약독화를 달성하기 위해 결실되었다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2016/0369282 및 국제 출원 공개 번호 WO 2016/025582 참조). 예를 들어, *에스. 티피무리움* 균주 SL7207은 방향족 아미노산 영양요구체(*aroA*-돌연변이체)이고, 균주 A1 및 A1-R은 류신-아르기닌 영양요구체이다.

[0360] 박테리아를 약독화시키는 돌연변이에는 지질다당류(LPS)의 생합성을 변경시키는 유전자 내 돌연변이, 예컨대 *rfaL*, *rfaG*, *rfaH*, *rfaD*, *rfaP*, *rFb*, *rfa*, *msbB*, *htrB*, *firA*, *pagL*, *pagP*, *lpxR*, *arnT*, *eptA*, 및 *lpxT*; 자살 유전자를 도입하는 돌연변이, 예컨대 *sacB*, *nuk*, *hok*, *gef*, *kil*, 또는 *phlA*; 박테리아 용해 유전자를 도입하는 돌연변이, 예컨대 *hly* 및 *cly*; 독성 인자를 인코딩하는 유전자 내 돌연변이, 예컨대 *IsyA*, *pag*, *prg*, *iscA*, *virG*, *plc* 및 *ac*; 스트레스 반응을 변형시키는 유전자 내 돌연변이, 예컨대 *recA*, *htrA*, *htpR*, *hsp* 및 *groEL*; 세포 주기를 방해하는 유전자 내 돌연변이, 예컨대 *min*; 및 조절 기능을 방해하거나 비활성화하는 유전자 내 돌연변이, 예컨대 *cya*, *crp*, *phoP/phoQ* 및 *ompR*(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2012/0009153, 2003/0170276, 및 2007/0298012; 미국 특허 번호 6,190,657; 국제 출원 공개 번호 WO 2015/032165; Felgner *et al.* (2016) *Gut Microbes* 7(2):171-177; Broadway *et al.* (2014) *J. Biotechnology* 192:177-178; Frahm *et al.* (2015) *mBio* 6(2):e00254-15; Kong *et al.* (2011) *Infection and Immunity* 79(12):5027-5038; 및 Kong *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(47):19414-19419 참조). 일반적으로, 약독화 돌연변이는 독성 표현형으로의 복귀를 초래할 수 있는 자발적인 보상 돌연변이를 방지하기 위한 유전자 결실이다.

[0361] 안전을 위해 *에스. 티피무리움*을 약독화시키는 또 다른 방법은 PhoP/PhoQ 오페론 시스템을 사용하는 것이며, 이는 막-연관 센서 키나제(PhoP: membrane-associated sensor kinase) 및 세포질 전사 조절자(PhoP)로 이루어진 전형적인 박테리아 2-구성요소 조절 시스템이다(예를 들어, Miller, S. I. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5054-5058; 및 Groisman, E. A. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7077-7081 참조). *PhoP/PhoQ*는 독성에 필요하고; 이의 결실은 대식세포에서 이 박테리아의 불량한 생존 및 마우스 및 인간에서 현저한 약독화를 초래한다(예를 들어, Miller, S. I. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5054-5058; Groisman, E. A. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7077-7081; Galan, J. E. and Curtiss, R. III. (1989) *Microb. Pathog.* 6:433-443; 및 Fields, P. I. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5189-5193 참조). PhoP/PhoQ 결실 균주는 백신 전달 비히클로 사용되었다(예를 들어, Galan, J. E. and Curtiss, R. III. (1989) *Microb. Pathog.* 6:433-443; Fields, P. I. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5189-5193; 및 Angelakopoulos, H. and Hohmann, E. L. (2000) *Infect. Immun.* 68:2135-2141 참조). 그러나, 본원에 기재된 바와 같이, 박테리아가 플라스미드 전달을 시도하지 않는 경우 균주가 대식세포에서 제한된 생존율을 갖는 것은 불리하다.

[0362] 이들 약독화된 박테리아 균주는 정맥내(IV) 투여될 때 마우스, 돼지 및 원숭이에서 안전한 것으로 밝혀졌고(Zhao, M. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:755-760; Zhao, M. *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:7647-7652; Tjuvajev J. *et al.* (2001) *J. Control. Release* 74:313-315; 및 Zheng, L. *et al.* (2000) *Oncol. Res.* 12:127-135 참조) 및 소정의 생 약독화 *살모넬라* 균주는 인간 임상 시험에서 경구 투여 후 내약성이 우수한 것으로 나타났다(예를 들어, Chatfield, S. N. *et al.* (1992) *Biotechnology* 10:888-892; DiPetrillo, M. D. *et al.* (1999) *Vaccine* 18:449-459; Hohmann, E. L. *et al.* (1996) *J. Infect. Dis.* 173:1408-1414; 및 Sirard, J. C. *et al.* (1999) *Immunol. Rev.* 171:5-26 참조).

[0363] 요법을 위해 약독화된 *에스. 티피무리움*의 다른 균주는 예를 들어 류신-아르기닌 영양요구성 A-1(예를 들어, Zhao *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(3):755-760; Yu *et al.* (2012) *Scientific Reports* 2:436; 미국 특허 번호 8,822,194; 및 미국 특허 공개 번호 2014/0178341 참조) 및 이의 유도체 AR-1(예를 들어, Yu *et al.* (2012) *Scientific Reports* 2:436; Kawaguchi *et al.* (2017) *Oncotarget* 8(12):19065-19073; Zhao *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66(15):7647-7652; Zhao *et al.* (2012) *Cell Cycle* 11(1):187-193; Tome *et*

al. (2013) *Anticancer Research* 33:97-102; Murakami *et al*. (2017) *Oncotarget* 8(5):8035-8042; Liu *et al*. (2016) *Oncotarget* 7(16):22873-22882; 및 Binder *et al*. (2013) *Cancer Immunol. Res*. 1(2):123-133); *aroA*⁻ 돌연변이체 *에스. 티피무리움* 균주 SL7207(예를 들어, Guo *et al*. (2011) *Gene Therapy* 18:95-105; 및 미국 특허 공개 번호 2012/0009153, 2016/0369282 및 2016/0184456 참조), 및 이의 절대 혐기성 미생물 유도체 YB1(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO 2015/032165; Yu *et al*. (2012) *Scientific Reports* 2:436; 및 Leschner *et al*. (2009) *PLoS ONE* 4(8):e6692 참조); *aroA*⁻/*aroD*⁻ 돌연변이체 *에스. 티피무리움* 균주 BRD509, SL1344(야생형) 균주의 유도체(예를 들어, Yoon *et al*. (2017) *Eur. J. Cancer* 70:48-61 참조); *asd*⁻/*cya*⁻/*crp*⁻ 돌연변이체 *에스. 티피무리움* 균주 χ4550(예를 들어, Sorenson *et al*. (2010) *Biologics: Targets & Therapy* 4:61-73 참조) 및 *phoP*⁻/*phoQ*⁻ *에스. 티피무리움* 균주 LH430(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO 2008/091375 참조)이다.

[0364] 그러나, 약독화는 종양-체류 면역 세포, 종양 미세환경 및 종양 세포에 축적되는 박테리아의 능력에 영향을 미친다. 이 문제는 본원에서 해결된다. 본원에 예시된 *살모넬라* 균주와 같은 면역자극성 박테리아는 변형에 의해 약독화되며, 이는 상기 기재된 것 중 일부를 포함할 수 있을 뿐만 아니라 암 치료제로서의 효과성을 증강시키는 본원에 기재된 다른 변형 및 특성을 가질 수 있다.

[0365] 약독화된 *에스. 티피무리움* 균주는 식균작용 및 분해 후 DNA를 전달하는 타고난 능력을 보유한다(예를 들어, Weiss *et al*. (2003) *Int. J. Med. Microbiol*. 293(1):95-106 참조). 이는 유전자 요법을 위한 벡터로 사용되었다. 예를 들어, *에스. 티피무리움* 균주는 사이토카인, 혈관신생 저해제, 독소 및 전구약물-전환 효소를 인코딩하는 유전자를 비롯한 다양한 유전자를 전달 및 발현하는 데 사용되었다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2007/0298012; Loeffler *et al*. (2008) *Cancer Gene Ther*. 15(12):787-794; Loeffler *et al*. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 104(31):12879-12883; Loeffler *et al*. (2008) *J. Natl. Cancer Inst*. 100:1113-1116; Clairmont, C. *et al*. (2000) *J. Infect. Dis*. 181:1996-2002; Bermudes, D. *et al*. (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel*. 5:194-199; Zhao, M. *et al*. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 102:755-760; Zhao, M. *et al*. (2006) *Cancer Res*. 66:7647-7652; 및 Tjuvajev J. *et al*. (2001) *J. Control. Release* 74:313-315 참조).

[0366] *에스. 티피무리움*은 종양-연관 항원(TAA) 서바이빈(SVN)을 항원 제시 세포(APC)에 전달하여 적응 면역력을 프라임하도록 변형되었다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2014/0186401; 및 Xu 등 (2014) *Cancer Res*. 74(21):6260-6270). SVN은 세포 생존을 연장하고 세포 주기 제어를 제공하는 세포자멸사 단백질의 저해제(IAP)이며 모든 고형 종양에서 과발현되고 정상 조직에서는 저조하게 발현된다. 이 기술은 SPI-2 및 이의 유형 III 분비 시스템을 사용하여 TAA를 APC의 세포기질로 전달한 다음 활성화되어 TAA 특이적 $CD8^+$ T-세포 및 항종양 면역력을 유도한다(예를 들어, Xu *et al*. (2014) *Cancer Res*. 74(21):6260-6270 참조). *리스테리아*-기초 TAA 백신과 유사하게, 이 접근법은 마우스 모델에서 가능성을 보여주었지만 인간에서 효과적인 종양 항원-특이적 T-세포 프라이밍을 실증하지 못하였다.

[0367] *에스. 티피무리움*은 단백질을 인코딩하는 DNA의 전달 외에도 암 치료를 위한 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)의 전달에 사용되었다. 예를 들어, 약독화된 *에스. 티피무리움*은 면역억제 유전자인 인돌라민 디옥시게나제(IDO)를 표적화하는 것과 같은 특정 shRNA를 발현하도록 변형되었다. 쥐 흑색종 모델에서 침묵된 IDO 발현은 종양 세포 사멸 및 호중구에 의한 상당한 종양 침윤을 초래하였다(예를 들어, Blache *et al*. (2012) *Cancer Res*. 72(24):6447-6456; 국제 출원 공개 번호 WO 2008/091375; 및 미국 특허 번호 9,453,227). 히알루로니다제와 이 벡터의 공동 투여는 뮤린 췌관 선암종의 치료에서 긍정적인 결과를 보여주었다(예를 들어, Manuel 등 (2015) *Cancer Immunol. Res*. 3(9):1096-1107; 및 미국 특허 공보 2016/0184456). 다른 연구에서 *phoP/phoQ* 결실에 의해 약독화된 *에스. 티피무리움* 균주는 신호 변환기 및 전사 3(STAT3) 특이적 shRNA의 활성제를 발현하여 종양 성장을 저해하고 전이 기관의 수를 감소시켜 C57BL/6 마우스의 수명을 연장하였다(예를 들어, Zhang 등 (2007) *Cancer Res*. 67(12):5859-5864 참조). 또 다른 예에서, *에스. 티피무리움* 균주 SL7207은 β-카테닌을 인코딩하는 유전자인 *CTNNB1*을 표적화하는 shRNA의 전달에 사용되었다(예를 들어, Guo 등 (2011) *Gene Therapy* 18:95-105; 및 미국 특허 공개 번호 2009/0123426 및 2016/0369282). *에스. 티피무리움* 균주 VNP20009는 STAT3을 표적화하는 shRNA의 전달에 사용되었다(예를 들어, Manuel 등 (2011) Cancer Res. 71(12):4183-4191; 미국 특허 공개 번호 2009/0208534, 2014/0186401 및 2016/0184456; 및 국제 출원 공개 번호 WO 2008/091375 및 WO 2012/149364). 자가포식 유전자 *Atg5* 및 *Beclin1*을 표적화하는 siRNA는 *에스. 티피무*

리옴 균주 A1-R 및 VNP20009를 사용하여 종양 세포에 전달되었다(예를 들어, Liu 등 (2016) *Oncotarget* 7(16):22873-22882 참조).

[0368] 그러나, 이러한 균주는 항종양 면역 반응을 효과적으로 자극하지 않으며, 인코딩된 생성물의 치료 용량의 전달을 위해 종양을 효과적으로 콜로니화하지 않는 것으로 밝혀졌다. 이러한 균주의 향상은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아와 같은 항종양 면역 반응을 더 효과적으로 자극하기 위해 필요하다. 다양한 박테리아의 추가 및 대안적 변형이 공개된 국제 PCT 출원 번호 WO 2019/014398 및 미국 공개 번호 2019/0017050 A1에 기재되어 있다. 또한 본원에 기재된 이러한 간행물 각각에 기재된 박테리아는 면역자극 및 종양 표적화 특성을 추가로 개선하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

[0369] iii.VNP20009(YS1646)

[0370] 본원에 기재된 변형을 위한 출발 균주로 사용될 수 있는 치료적 박테리아의 예는 VNP20009(ATCC # 202165, YS1646)로 명명된 균주이다. 이 바이러스는 임상 후보였다. VNP20009(ATCC # 202165, YS1646)는 *msbB* 및 *purI* 유전자의 결실에 의해 안전성을 위해 적어도 50,000배 약독화되었다(예를 들어, Clairmont *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002; Low *et al.* (2003) *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 90, *Suicide Gene Therapy*: *Methods and Reviews*, pp. 47-59; 및 Lee *et al.* (2000) *International Journal of Toxicology* 19:19-25). *msbB* 유전자의 발현을 방지하기 위한 결실 또는 방해는 그람-음성 박테리아 외막의 주요 성분인 지질다당류의 지질 A 도메인의 조성을 변경한다(예를 들어, Low *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41). 이는 잠재적으로 해로운 TNFα의 생성을 감소시키면서 지질다당류-유도 패혈성 쇼크를 방지하고, 박테리아 균주를 약독화시키고, 전신 독성을 낮춘다(예를 들어,Dinarello, C.A. (1997) *Chest* 112(6 Suppl):321S-329S; 및 Low *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41). *purI* 유전자의 발현을 방지하기 위한 결실 또는 방해는 박테리아를 퓨린에 대한 영양요구성으로 만들고, 이는 박테리아를 추가로 약독화시키고 종양 미세환경에서 박테리아를 농화시킨다(예를 들어, Pawelek *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4537-4544; 및 Broadway *et al.* (2014) *J. Biotechnology* 192:177-178). 본원에 나타낸 바와 같이, VNP20009는 또한 면역억제성 뉴클레오사이드 아데노신에 대해 영양요구성이다. 아데노신은 종양에서 병리학적으로 높은 수준으로 축적될 수 있고 면역억제성 종양 미세환경에 기여할 수 있다(예를 들어, Peter Vaupel and Arnulf Mayer, *Oxygen Transport to* 조직 *XXXVII*, Advances in Experimental Medicine and Biology 876 chapter 22, pp. 177-183).

[0371] VNP20009를 동계 또는 인간 이종이식 종양이 있는 마우스에게 투여하였을 때, 박테리아는 300-1000:1을 초과하는 비율로 종양의 세포외 구성요소 내에 우선적으로 축적되었으며, 대조군 마우스와 비교하여 종양 성장 저해 및 연장된 생존을 실증하였다(예를 들어, Clairmont 등 (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002). VNP20009는 동물 모델에서 종양 표적화 및 종양 성장 저해에서 성공을 실증하면서 독성을 거의 이끌어내지 않았다(예를 들어, Broadway *et al.* (2014) *J. Biotechnology* 192:177-178; Loeffler *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(31):12879-12883; Luo *et al.* (2002) *Oncology Research* 12:501-508; 및 Clairmont *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002).

[0372] 인간 전이성 흑색종에 대한 1상 임상 시험의 결과에 따르면 VNP20009가 비교적 안전하고 내약성이 우수하지만 매우 제한된 항종양 활성이 관찰되었다(예를 들어, Toso *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(1):142-152). VNP20009의 사용은 전이성 질환 부담에 유의한 변화를 가져오지 않았지만 최대 허용 용량(MTD)에서 종양 콜로니화의 증거를 실증하였다. 항종양 활성에 영향을 미치는 데 필요한 더 높은 용량은 높은 수준의 전염증성 사이토카인과 관련된 독성으로 인해 불가능하였다.

[0373] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 균주 VNP20009에 없는 수많은 개선 및 이점을 제공한다. 예시된 균주의 경우, VNP20009 균주(YS1646)는 편모를 무효화시키는 것을 포함하여 추가의 게놈 변형의 도입에 의해 추가로 변형되는 부모 균주로서 사용된다. 균주는 또한, purI 및/또는 *msbB*를 완전히 결실시킴으로써 향상된다. 다른 게놈 변형은 컬리 핌브리애의 무효화 또는 비활성화를 포함하며, 박테리아가 생체내에서 복제되지 않게 하는 균주 *thyA*$^-$ 및/또는 T-세포의 활성을 비활성화시키거나 감소시키는 아스파라기나제 활성을 무효화시키는 *ansB*$^-$가 되게 한다. 이러한 게놈 변형은 개별적으로 그리고 함께, 식세포에서 축적되거나 이를 감염시키고 또한 숙주의 항바이러스 유형 면역 반응을 증가시키는 박테리아의 능력을 향상시킨다. 면역자극성 박테리아는 면역계를 자극시키고/시키거나 면역억제를 감소시키고 치료 생성물 및 면역화 항원과 생성물을 제공하는 다양한 페이로드를 포함하도록 변형된다.

[0374] 면역자극성 박테리아는 인코딩된 유전자 페이로드를 종양-특이적 방식으로 종양-체류 골수성 세포에 전달한다. 유전자의 결실 또는 방해와 같은 게놈 변형 및 게놈의 다른 변형으로 인해 면역자극성 박테리아는 예를 들어 편

모 제거에 의해 감소된 TLR2-매개, TLR4-매개 및 TLR5-매개 염증, LPS의 변형, 및 컬리 핌브래의 제거 및 생물막 형성 감소를 나타낸다. 본원에 제시되고 기재된 바와 같이, TLR2의 무효화, 및 또한 TLR2/4/5-매개 활성과 반응의 무효화는 유형 I 인터페론 생산을 촉진하거나 증강시키고/시키거나 이러한 수용체가 TLR 반응으로 인해 활성화될 때 발생하는 유형 I IFN의 임의의 감소 또는 저해를 감소시킨다. 면역자극성 박테리아는 L-아스파라기나제 II의 발현을 무효화함으로써 T-세포 기능과 활성 및 효과를 증강시키고 플라스미드 유지를 촉진, 제공, 허용 및 지원한다. 박테리아는 골수성 세포, 특히 종양-체류 골수성 세포에만 또는 실질적으로 여기에만 축적(또는 표적화)하여 식균 작용 후 매우 효율적인 플라스미드 전달을 제공한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경을 콜로니화하고 전신적으로 투여될 수 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 VNP20009와 비교하여 15배 이상 개선된 LD_{50}을 나타낸다. 따라서 필요한 경우 VNP20009와 비교하여 훨씬 더 높은 용량의 본원에 제공된 면역자극성 박테리아가 독성 효과 없이 투여될 수 있다(예를 들어 예시적인 용량 및 투여를 설명하는 섹션 F.5의 아래 표 참조).

[0375] 편모의 제거, LPS 변형 및 다른 변형을 포함하여 본원에 기재된 바와 같이 변형된 면역자극성 박테리아가 골수성 세포, 특히 종양-체류 골수성 세포에 우선적으로 축적되거나 표적화된다는 것이 본원에 제시되고 설명된다. 실시예는 면역자극성 박테리아가 정맥내와 같은 전신 투여 후에 이러한 세포에 축적된다는 것을 실증한다. 실시예는 또한 면역자극성 박테리아에서 종양-체류 골수성 세포로의 플라스미드 전달 및 박테리아 세포 사멸 후 오래 지속되는 단백질 발현을 설명하고 보여줌으로써 항암 반응 및 표현형을 초래하는 생성물을 포함하는 치료 생성물을를 전달한다.

[0376] **iv.야생형 균주**

[0377] 종양에 VNP20009가 축적되는 것은 하기를 포함하는 인자의 조합에서 기인한다: ATCC 14028 모 균주의 고유한 침습성, 저산소 환경에서 복제할 수 있는 능력, 종양의 간질액에 존재하는 고농도 퓨린에 대한 요건. 본원에 기재된 바와 같이, VNP20009와 같은 약독화된 균주를 출발 박테리아 균주로 사용할 필요는 없다. 본원에 기재된 변형으로 인해, 박테리아는 무독성 또는 약독화된다. 모 균주, ATCC 14028, 또는 다른 야생형 균주는 출발 균주로 사용될 수 있고 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 게놈 변형으로 인해, 종양 및 종양-체류 면역 세포, 및 또한 종양-체류 대식세포를 침윤시키고 콜로니화한다. 종양을 갖지 않는 대상체에서 백신으로서 사용될 때, 박테리아는 식세포, 예컨대 대식세포에 축적된다.

[0378] **3. 선행 박테리아 암 면역요법의 한계**

[0379] 본원에 제시된 바와 같이, 그리고 또한 당업계의 지식의 관점에서 실증된 바와 같이, TLR은 유형 I IFN의 유도를 저해하거나 방지한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 TLR2/4/5 반응/활성을 감소시키거나 저해하거나 무효화시키는 변형을 포함하여, 유형 I IFN의 저해를 극복한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 또한, 유형 I IFN 발현을 증강시키거나 유형 I IFN 유도를 항시적으로 만드는 특성 및/또는 페이로드를 포함한다.

[0380] 많은 종류의 면역 요법은 안전성과 효능을 제한하는 중대한 한계와 널리 사용되지 않을 복잡한 플랫폼을 갖고 있다. 박테리아, 특히 본원에 제공된 것은 예를 들어 종양용해 바이러스와 비교하여 항암 치료제로 사용하기에 많은 유리한 특성을 갖고 있다. 여기에는 증식, 제조, 저장 및 치료가 완료되면 숙주에서 제거할 수 있는 용이성이 포함된다. 그러나 바이러스는 숙주 반응을 포함하여 유리한 특성도 갖고 있다. 박테리아 감염에 대한 반응은 내재성인 염증 반응으로 항암 치료에 유리하지 않다. 바이러스 감염에 대한 반응은 항암 반응과 유사한다. 이는 하기 표에 요약되어 있다.

	박테리아	바이러스
내재성 인식:	TLR2, TLR4 및 TLR5	TLR3, TLR7/8, RIG-1 및 STING
염증성 사이토카인 프로파일:	내재성 면역력을 촉진함; 적응 면역력을 억제함	내재성 면역력을 촉진함; 적응 면역력을 촉진함
케모카인 구배:	호중구를 끌어들여 감염을 제거함	T-세포, 단핵구를 끌어들여 감염을 제거함
면역력의 생산:	없음	있음
면역원성:	면역원성이 아님	고도로 면역원성임

[0381]

[0382] 따라서 미생물 항암 플랫폼으로서의 선행 박테리아의 한계는 항암 요법에 더 가까운 바이러스-감지 경로와 비교하여 면역계가 박테리아, 심지어 세포내 박테리아를 감지할 때 시작되는 특정 면역 프로그램에서 유래된다. 바이러스를 인식하는 감지 프로그램은 매우 효과적인 백신과 지속적인 있는 적응 면역력의 생성을 허용한다. 그러나 박테리아에 대한 백신화는 제한된 성공을 거두었다. 예를 들어, *살모넬라 티피*에 대한 장티푸스열(typhoid fever)에 대해 FDA 승인을 받은 백신은 고 면역원성 Vi 캡슐 및 O:9 항원을 함유하는 *에스. 티피*에도 불구하고 55%만 효과적이고(예를 들어, Hart *et al.* (2016) *PLoS ONE* 11(1):e0145945 참조), 이는 백신이 없는 *엘. 모노사이토게네스* 및 *에스. 티피무리움*과 같은 덜 면역원성인 박테리아 균주에서는 발생하지 않는다.

[0383] 박테리아 및 바이러스에는 숙주 세포 패턴 인식 수용체(PRR)에 의해 감지되는 병원체-연관 분자 패턴(PAMP)으로 알려진 보존된 구조가 포함되어 있다. PRR에 의한 PAMP의 인식은 사이토카인 및 케모카인의 유도 및 특정 면역 반응의 개시를 초래하는 다운스트림 신호전달 캐스케이드를 유발한다(예를 들어, Iwasaki 및 Medzhitov(2010) *Science* 327(5963):291-295 참조). 내재성 면역계가 PAMP에 의해 연계되는 방식과 어떤 유형의 감염원이 침입하는 병원체와 싸우기 위해 적절한 내재성 또는 적응 반응이 생성되는지의 여부를 결정한다.

[0384] 톨-유사 수용체(TLR: Toll Like Receptor)로 알려진 PRR 부류는 박테리아 및 바이러스 기원에서 유래된 PAMP를 인식하고 세포 내의 다양한 구획에 위치한다. TLR은 지질다당류(TLR4), 지질단백질(TLR2), 플라젤린(TLR5), DNA의 비메틸화된 CpG 모티프(TLR9), 이중 가닥 RNA(TLR3) 및 단일 가닥 RNA(TLR7 및 TLR8)를 포함한 다양한 리간드를 인식한다(예를 들어, Akira *et al.* (2001) *Nat. Immunol.* 2(8):675-680; 및 Kawai and Akira (2005) *Curr. Opin. Immunol.* 17(4):338-344 참조). DNA 및 RNA-기초 바이러스는 식균 작용 후 숙주 세포기질 구획에서 감지되거나 세포기질에서 직접 감지될 수 있다. 유형 I 인터페론(IFN-α, IFN-β)은 바이러스 기원 또는 손상된 숙주 세포 DNA의 흡수로부터 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA 및 RNA의 숙주 인식에 의해 유도된 시그니처 사이토카인이다. 예를 들어, 합성 dsRNA 유사체 폴리이노신:폴리시티딜산(폴리(I:C))은 엔도솜 TLR3에 대한 작용제이며; dsRNA의 더 안정적인 버전인 폴리 ICLC(예를 들어, 상표 Hiltonol®)는 임상 개발 중이었다(예를 들어, Caskey 등 (2011) J. Exp. Med. 208(12):2357-2366 참조). 유사하게는, 엔도솜의 단일 가닥 RNA(ssRNA)는 TLR7 및 TLR8(인간에서만)에 의해 감지되며, 이의 알려진 합성 리간드인 레시퀴모드 및 이미퀴모드는 FDA-승인 국소 암 면역요법이다.

[0385] 세포기질에서 이중 가닥 RNA(dsRNA)는 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 및 흑색종 분화 관련 유전자 5(MDA-5)와 같은 RNA 헬리카제에 의해 감지되어 유형 I IFN을 유도한다(예를 들어, Ireton and Gale (2011) *Viruses* 3(6):906-919 참조). dsDNA에 대한 세포기질 센서는 감염성 병원체 또는 비정상적인 숙주 세포 손상으로부터 세포기질 dsDNA를 감지하기 위한 중앙 매개체인 ER-체류 어댑터 단백질인 인터페론 유전자의 자극인자(STING: Stimulator of 인터페론 유전자)를 통해 매개된다(예를 들어, Barber (2011) *Immunol. Rev.* 243(1):99-108). STING 신호전달은 TANK-결합 키나제 1(TBK1)/인터페론 조절 인자 3(IRF3) 축 및 NF-κB 신호전달 축을 활성화하여 IFN-β 및 내재성 및 적응 면역력을 강하게 활성화하는 다른 전염증성 사이토카인과 케모카인을 유도한다(예를 들어, Burdette *et al.* (2011) *Nature* 478(7370):515-518 참조). STING을 통한 세포기질 dsDNA 감지에는 dsDNA에 직접 결합하는 숙주 세포 뉴클레오티딜 전이효소인 환식 GMP-AMP 합성효소(cGAS)가 필요하며, 이에 반응하여 환식 디뉴클레오타이드(CDN) 2차 메신저인 환식 GMP-AMP(cGAMP)를 합성하고, 이는 STING에 결합하여 이를 활성화한다(예를 들어, Sun *et al.* (2013) *Science* 339(6121):786-791; 및 Wu *et al.* (2013) *Science* 339(6121):826-830 참조).

[0386] STING은 또한 세포내 *엘. 모노사이토게네스*에서 생산된 c-디-AMP 또는 *에스. 티피무리움*에서 c-디-GMP와 같은 박테리아 유래 CDN에 결합할 수 있다. 환식 GMP-AMP 신타제(cGAS)는 박테리아에서 유래한 정규(canonical) CDN에 반응하지 않는 인간 STING 대립유전자를 활성화할 수 있는 비정규 CDN을 생성한다. 2개의 퓨린 뉴클레오사이드가 3'-3' 연결을 가진 포스페이트 다리로 연결된 박테리아에 의해 생성된 CDN과 달리, cGAS에 의해 합성된 cGAMP의 뉴클레오타이드간 포스페이트 다리는 비정규 2'-3' 연결부로 연결된다. 이러한 2'-3' 분자는 박테리아 3'-3' c-디-GMP보다 300배 더 나은 친화도로 STING에 결합하므로 STING의 더 강력한 생리학적 리간드이다(예를 들어, Civril *et al.* (2013) *Nature* 498(7454):332-337; Diner *et al.* (2013) *Cell Rep.* 3(5):1355-1361; Gao *et al.* (2013) *Sci. Signal* 6(269):pl1; 및 Ablasser *et al.* (2013) *Nature* 503(7477):530-534). 인간의 cGAS/STING 신호전달 경로는 박테리아성 병원체보다 바이러스성 병원체에 우선적으로 반응하도록 진화한 것으로 보이다.

[0387] 따라서, STING 및 RIG-I와 같은 바이러스 감지 PRR 및 TLR은 유형 I IFN 및 효과적인 T-세포-매개 적응 면역력을 유도하는 사이토카인 및 케모카인을 유도한다. 종양 환경에서, 유형 I IFN 신호전달은 CXCL10과 같은 T-세포 트래피킹 케모카인을 유도하고 또한 $CD8^+$ T-세포를 프라임하기 위한 종양 항원의 DC 교차-제시를 활성화하는 데 필요하다(예를 들어, Diamond *et al.* (2011) *J. Exp. Med.* 208(10):1989-2003; 및 Fuertes *et al.* (2011) *J. Exp. Med.* 208(10):2005-2016).

[0388] 대조적으로, *에스. 티피무리움*과 같은 박테리아의 숙주 감시는 주로 TLR2, TLR4 및 TLR5를 통해 매개된다(예를 들어, Arpaia 등 (2011) *Cell* 144(5):675-688 참조). 이러한 TLR은 MyD88(골수성 분화 1차 반응 단백질 88) 및 TRIF(Toll/인터루킨-1 수용체(TIR)-도메인-함유 어댑터-유도 인터페론-β) 어댑터 분자를 통해 신호를 보내 NF-κB 의존성 전염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-6의 유도를 매개한다(예를 들어, Pandey *et al.* (2015) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(1):a016246 참조). *에스. 티피무리움*은 NLRP3 인플라마솜 경로를 활성화하여 카스파제-1의 절단 및 파이롭토틱(pyroptotic) 세포 사멸을 유발하는 전염증성 사이토카인 IL-1β 및 IL-18의 유도를 초래하는 것으로 나타났다. TLR2, TLR4 및 TLR5의 연계와 인플라마솜 활성화는 케모카인과 사이토카인을 유도하여 호중구와 대식세포에 의한 박테리아 제거를 유도한다. *에스. 티피무리움*이 T-세포에 의해 제거된다는 증거는 제한적이며, 이에 대해 생산된 항체는 중화되지 않는다(예를 들어, McSorley (2014) *Immunol. Rev.* 260(1):168-182 참조). 또한, *에스. 티피무리움*은 T-세포 기능을 직접적으로 억제하여 잠재적인 항종양 T-세포 반응이 생산되는 것을 손상시키는 기전을 갖고 있다(예를 들어, Kullas 등 (2012) *Cell Host Microbe.* 12(6)791-798 참조). 결과적으로 *에스. 티피무리움*과 같은 박테리아성 암 요법은 적응성 항종양 면역력을 생산하는 데 필요한 T-세포가 아닌 호중구 및 대식세포에 의한 모집 및 제거로 이어진다. 이러한 차이가 숙주 종양 항원을 포함하는 이전의 박테리아성 항암 백신이 인간에서 불량한 T-세포 프라이밍 벡터인 이유를 설명할 수 있다는 것이 본원에 기재되고 제시되어 있다. 많은 TLR은 유형 I 인터페론(IFN)을 유도하는 것으로 보고되어 왔으나, 이러한 도그마(dogma)가 1차 인간 단핵구-유래 대식세포에서 TLR2/3/4/5/7에 관하여 필수적으로 올바르지 않다는 것이 본원에서 확인되고 기재된다. 실험은 유형 I IFN에 미치는 효과를 평가하기 위해 TLR 작용제를 사용하여 수행되었다. 결과는, TLR3 및 TLR4 작용제가 IFNα으로 전처리되지 않는 한 1차 인간 단핵구에서 유형 I IFN을 유도하지 않음을 보여주었다. 작용성(agonizing) TLR2는 심지어 IFNα로 전처리되었을 때에도 유형 I IFN을 유도하지 않는다. 실제로, TLR2는 유형 I IFN의 유도를 저해할 수 있다. 이는 박테리아-기초 치료제가 갖는 지금까지 식별되지 않은 문제점이다.

[0389] 이러한 문제는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 의해 해결되는 문제 중 하나이다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이전에 바이러스 치료제에 의해서만 제공되었던 유리한 특성을 갖고 또한 박테리아 치료제의 유리한 특성을 보유하도록 조작된다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 전신 투여될 수 있고, 종양, 종양-체류 면역 세포 및/또는 종양 미세환경에 국한될 수 있고, 면역억제를 극복하고, 항종양 면역력을 적절하게 활성화할 수 있으며, 또한 기존 전신 면역요법의 자가면역-연관 독성을 제한할 수 있다. 본원에 제공된 박테리아는 종양-체류 면역 세포에 효과적으로 위치하고, 치료적 항암 생성물을 인코딩하고, 복수의 이러한 생성물을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 박테리아는 상보적인 치료 생성물을 인코딩할 수 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 TLR2, 4 및 5의 활성화를 감소시키거나 무효화시키도록 변형된다. 그 결과, 이는 유형 I IFN의 유도를 저해하지 않는다. 본원에 제공된 이러한 면역자극성 박테리아는 유형 I IFN을 유도하는 페이로드를 인코딩한다. 이러한 발견은, TLR2 반응이 무효화되거나 감소되도록 본원에 제공되는 백신 및 전달 비히클이 설계되어 이것이 유형 I IFN을 방지하거나 저해하지 않는 것으로 일반화된다. 일부 구현예에서, TLR4 및 5 반응은 감소되거나 무효화되어, 유형 I IFN을 저해하지 않는 백신 및 다른 면역-자극 치료제를 제공한다.

[0390] 효과적인 적응 면역력을 유도하는 바이러스-유사 면역 반응을 이끌어내면서 박테리아의 유익한 특성을 보유하도

록 설계된 우수한 미생물 항암, 백신, RNA 전달 플랫폼이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 바와 같이, *살모넬라* 및 다른 종의 균주와 같은 박테리아는 염증 효과가 감소되어 독성이 덜하도록 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 그 결과, 예를 들어 더 높은 용량이 투여될 수 있다. 당업자에게 알려져 있고/있거나 상기 및 본원에 열거된 *살모넬라*의 임의의 이러한 균주 및 다른 종의 박테리아는 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

[0391] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경, 종양-체류 면역 세포 및 종양의 콜로니화를 증가시키도록 변형된다. 이는 독성을 줄이고 아데노신 영양요구성을 포함하여 종양 미세환경을 표적화하는 다른 특성을 갖도록 조작된다. 본원에 제공된 균주는 또한 보체에 의해 비활성화되지 않도록 조작된다. 이러한 특징, 특히 식세포의 콜로니화/감염을 초래하는 특징은 또한 박테리아를 백신 플랫폼으로서 그리고 RNA 전달 비히클로서 유용하게 만든다. 이는 선택되는 페이로드, 이용되는 조절 서열, 박테리아 또는 숙주 세포 전사/번역 머시너리가 인코딩된 생성물의 발현에 사용되어야 하는지의 여부, 및 생성물이 생산되는 숙주 세포 또는 조직의 좌위(locus)로 인해 각각의 용도에 대해 적응될 수 있다.

[0392] 본원에 제공된 박테리아 균주는 치료 생성물을 전달하도록 조작된다. 본원의 박테리아 균주는 사이토카인, 케모카인 및 공동자극성 분자를 비롯한 면역자극성 단백질뿐만 아니라 유형 I IFN 발현을 항시적으로 유발하거나 유도할 수 있는 변형된 기능-획득 세포기질성 DNA/RNA 센서, 및 다른 치료 생성물, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는 항체 및 이의 단편, TGF-β 및 IL-6 결합 유인 수용체, TGF-β 폴리펩타이드 길항제, 이중특이적 T-세포 연계자(BiTEs®), RNAi, 및 이의 상보적 조합을 전달하고, 이는 종양 미세환경에서 항종양 면역 반응을 촉진한다. 박테리아 균주는 또한 식세포의 파이롭토시스를 감소시켜 더 강력한 면역 반응을 제공하고/하거나 상피 세포를 감염/침투하는 능력을 감소 또는 무효화하지만, 식세포를 감염/침투하는 능력은 보유하는 게놈 변형을 포함하므로, 이는 종양, 종양 미세환경 및 종양-체류 면역 세포에 더 효과적으로 축적된다. 박테리아 균주는 또한 인간 혈청의 보체 인자에 의한 비활성화에 저항하도록 변형될 수 있다. 박테리아 균주는 또한 단독으로 또는 조합하여, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 공동자극성 분자, 유형 I IFN의 항시적으로 활성인 유도제, 및 면역 체크포인트 및 또한 다른 이러한 표적에 대한 단일클론 항체(및 이의 단편)를 포함하는 치료 생성물을 인코딩하도록 변형될 수 있다.

[0393] 항원-제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 전체 또는 부분 세포질 도메인 결실을 갖는 절두된 공동자극성 분자(수용체 또는 리간드; 예를 들어, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L)를 인코딩하는 유전적 페이로드를 전달하는 항암 치료 생성물이 제공되며, 여기서 절두된 유전자 생성물은 공동-자극성 수용체 연계(engagement)를 통해 T-세포에 항시적 면역자극성 신호전달을 할 수 있고, 결실된 또는 절두된 세포질 도메인으로 인해 APC에 반대-조절 신호를 할 수 없다.

[0394] 박테리아는 또한 면역자극성 단백질(들), 예컨대 STING 및 사이토카인에 더하여(또는 그 대신에) 항원, 예컨대 종양 항원, 및 병원체 항원 또는 단백질을 인코딩할 수 있다.

[0395] **C.종양-체류 골수성 세포에서 치료 지수를 증가시키고 축적을 증가시키기 위한 면역자극성 박테리아의 변형 및 증강**

[0396] 본원에서는 예를 들어 종양-체류 골수성 세포의 축적을 증가시키고 보체 비활성화에 대한 내성을 개선하고, 면역 세포 사멸을 감소시키고, 적응 면역력을 촉진하고, T-세포 기능을 증강시킴으로써 독성을 감소시키고 항종양 활성을 개선하는 박테리아 게놈 또는 면역자극성 박테리아에 대한 변형을 포함하는 향상을 제공한다. 변형은 살모넬라, 특히 *에스. 티피무리움*과 관련하여 설명되고 예시되어 있으며; 당업자는 유사한 특성 및/또는 효과를 달성하기 위해 그리고 동일한 인코딩된 페이로드를 발현하기 위해 다른 박테리아 종, 예컨대 리스테리아 및 이. 콜라이에서 그리고 다른 *살모넬라* 균주에서 유사한 향상/변형을 수행할 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 개선/변형의 예는 하기와 같다.

[0397] **1.LPS 생합성 경로에서 유전자의 결실**

[0398] 그람음성균의 지질다당류(LPS)는 박테리아막의 바깥쪽 소엽의 주성분이다. 이는 세 가지 주요 부분, 지질 A, 비반복 코어 올리고당 및 O 항원(또는 O 다당류)으로 이루어진다. O 항원은 LPS의 가장 바깥쪽 부분으로 박테리아 투과성에 대한 보호층 역할을 하지만 O 항원의 당 조성은 균주마다 크게 다르다. 지질 A와 코어 올리고당은 덜 다양하고 더 일반적으로 동일한 종의 균주 내에서 보존된다. 지질 A는 내독소 활성을 포함하는 LPS의 부분이다. 일반적으로 여러 지방산으로 장식된 이당류이다. 이 소수성 지방산 사슬은 LPS를 박테리아 막에 고정시키고 나머지 LPS는 세포 표면에서 돌출한다. 지질 A 도메인은 그람 음성 박테리아의 독성의 대부분을 담당한다. 일반적으로 혈액의 LPS는 중요한 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)으로 인식되며 두드러진 전염증 반응을 유도한다. LPS는

CD14, MD2 및 TLR4를 포함하는 막 결합 수용체 복합체의 리간드이다. TLR4는 MyD88 및 TRIF 경로를 통해 신호를 보내 NF-κB 경로를 자극하고 TNF-α 및 IL-6과 같은 전염증성 사이토카인을 생성할 수 있는 막횡단 단백질이며, 그 결과 내독성 쇼크가 발생할 수 있으며, 이는 치명적일 수 있다. 포유동물 세포의 세포기질에 있는 LPS는 카스파제 4, 5 및 11의 카스파제 모집 도메인(CARD)에 직접 결합하여 자가활성화 및 파이롭토틱(pyroptotic) 세포 사멸을 유발할 수 있다(예를 들어, Hagar 등 (2015) *Cell Research* 25:149-150 참조). 지질 A의 조성과 지질 A 변이체의 독성은 잘 문서화되어 있다. 예를 들어, 단일인산화 지질 A는 다중 인산기가 있는 지질 A보다 염증이 훨씬 적다. 지질 A의 아실 사슬의 수와 길이도 독성 정도에 중대한 영향을 미칠 수 있다. 이. 콜라이의 규정 지질 A는 6개의 아실 사슬을 가지고 있으며 이 헥사-아실화는 잠재적으로 독성이 있다. *에스. 티피무리움* 지질 A는 이. 콜라이의 지질과 유사하며; 이는 4개의 1차 및 2개의 2차 하이드록시아실 사슬을 운반하는 글루코사민 이당류이다(예를 들어, Raetz 등 (2002) *Annu. Rev. Biochem.* 71:635-700 참조).

[0399] **a.*msbB* 결실**

[0400] *에스. 티피무리움*에서 *msbB* 유전자에 의해 인코딩된 효소 지질 A 생합성 미리스토일트랜스퍼라제는 지질다당류(LPS)의 지질 A 도메인에 말단 미리스토일 기의 첨가를 촉매화한다(예를 들어, Low *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41). 따라서, *msbB*의 결실은 그람 음성 박테리아의 외막의 주요 구성요소인 LPS의 지질 A 도메인의 아실 조성을 변경한다. 예를 들어, *에스. 티피무리움* 균주 VNP20009에서 *msbB*의 결실은 천연 헥사-아실화된 지질 A보다 독성이 덜하고 독성 쇼크의 유도 없이 전신 전달을 허용하는 우세하게 펜타-아실화된 지질 A의 생성을 초래한다(예를 들어, Lee 등 (2000) *International Journal of Toxicology* 19:19-25 참조). 이러한 변형은 패혈성 쇼크를 유도하는 LPS의 능력을 상당히 감소시키고, 박테리아 균주를 약독화시키고, 따라서 *살모넬라*-기초 면역치료제의 치료 지수를 증가시킨다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2003/0170276, 2003/0109026, 2004/0229338, 2005/0255088, 및 2007/0298012). 중요하게는, *msbB* 생성물을 발현하지 않는 *msbB* 돌연변이체는 본원에 예시된 바와 같이 세포내 복제할 수 없으며(예를 들어, 실시예 2 참조), 이는 살모넬라 독성에 대한 요건이다(예를 들어, Leung 등 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:11470-11474).

[0401] 대체, 결실 또는 삽입을 포함하여 LPS 발현을 변경하는 다른 LPS 돌연변이는 독성을 극적으로 감소시켜 더 낮은 독성을 제공하고 더 높은 용량의 투여를 허용하는 *살모넬라* 균주를 포함하여 본원에 제공된 박테리아 균주에 도입될 수 있다. 본원에 예시된 바와 같이, *msbB*¯ 좌위는 부분적으로 결실되거나, 간섭되거나, 전좌될 수 있다. 이는 또한, 완전히 결실될 수 있으며, 이는 균주의 성장을 향상시킬 수 있다.

[0402] 다른 박테리아 종에서 지질 A 생합성 미리스토일트랜스퍼라제의 상동체 또는 이종상동체를 인코딩하는 상응하는 유전자도 결실되거나 방해되어 유사한 결과를 얻을 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어 이. 콜라이에서 미리스토일-아실 운반체 단백질-의존성 아실트랜스퍼라제를 인코딩하는 *lpxM*; 및 *에스. 티피*에서 지질 A 아실트랜스퍼라제를 인코딩하는 *msbB*를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0403] **b.*pagP* 결실 또는 비활성화**

[0404] 상기 기재된 바와 같이, *에스. 티피무리움*의 *msbB* 돌연변이는 지질 A의 말단 미리스토일화를 겪을 수 없으며, 헥사-아실화된 지질 A보다 훨씬 덜 독성인 주로 펜타-아실화된 지질 A를 생성한다. 팔미테이트를 사용한 지질 A의 변형은 효소 지질 A 팔미토일트랜스퍼라제(PagP)에 의해 촉매화된다. *pagP* 유전자의 전사는 예를 들어 SCV 내부에서 낮은 농도의 마그네슘에 의해 활성화되는 PhoP/PhoQ 시스템의 제어 하에 있다. 따라서 *에스. 티피무리움* 지질 A의 아실 함량은 가변적이며 야생형 박테리아의 경우 헥사 아실화 또는 펜타 아실화될 수 있다. 지질 A를 팔미트화하는 *에스. 티피무리움*의 능력은 포식용해소체로 분비되는 항균 펩타이드에 대한 내성을 증가시킨다.

[0405] 야생형 *에스. 티피무리움*에서 *pagP*의 발현은 헵타-아실화된 지질 A를 생성한다. *msbB* 돌연변이체(지질 A의 말단 아실 사슬이 추가될 수 없음)에서 *pagP*의 유도는 헥사-아실화된 지질 A를 생성한다(예를 들어, Kong *et al.* (2011) *Infection and Immunity* 79(12):5027-5038 참조). 헥사-아실화 지질 A는 가장 전염증성인 것으로 나타났다. 군은 예를 들어 헥사-아실화된 지질 A만 생성되도록 하기 위해 *pagP*의 결실 또는 방해에 의해 이러한 전염증성 신호를 이용하려고 노력하였으나(예를 들어, Felgner *et al.* (2016) *Gut Microbes* 7(2):171-177; 및 Felgner *et al.* (2018) *Oncoimmunology* 7(2):e1382791 참조), 이는 LPS의 TNF-α-매개 전염증 특성과 역설적으로 덜 적응 면역력으로 인해 불량한 내약성을 유발할 수 있다(예를 들어, Kocijancic 등 (2017) Oncotarget 8(30):49988-50001 참조).

[0406] LPS는 TNF-α 및 IL-6을 유도하는 강력한 TLR4 작용제이다. 1E9 CFUs/m^2에서 I.V. VNP20009 임상 시험에서 용량

제한 독성(예를 들어, Toso 등 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(1):142-152 참조)은 2시간째에 혈청에서 TNF-α 수준 > 100,000 pg/mL, 및 IL-6 수준 > 10,000 pg/mL과 함께 사이토카인 매개였다(열, 저혈압). VNP20009의 *msbB* 결실 및 감소된 발열성에도 불구하고 LPS는 헥사 아실화 지질 A의 존재로 인해 고용량에서 여전히 독성이 있을 수 있다. 따라서 헥사 아실화 지질 A를 생성할 수 없고 단지 펜타-아실화 지질 A만 생성하여 전염증성 사이토카인의 더 낮은 유도를 초래하는 *pagP*$^-$/*msbB*$^-$ 균주는 고용량에서 더 잘 견디며 1E9 CFU/m^2 이상에서 인간에게 투여될 수 있다. 더 높은 용량은 종양, 종양-체류 면역 세포 및 종양 미세환경의 콜로니를 증가시켜 면역자극성 박테리아의 치료 효능을 향상시킨다. 박테리아막 및 구조의 결과적인 변화로 인해 보체 활성과 같은 숙주 면역 반응이 변경되어 전신 투여 시 박테리아가 제거되지 않는다. 예를 들어, *pagP*$^-$/*msbB*$^-$ 돌연변이체 균주가 보체 비활성화에 대한 증가된 내성 및 인간 혈청에서 향상된 안정성을 갖는다는 것이 본원에서 제시된다.

[0407] 본원에서는 펜타-아실화된 지질 A를 갖는 LPS만을 생산할 수 있고 *msbB* 유전자의 결실 또는 방해를 함유하고 *pagP*의 결실 또는 중단에 의해 추가로 변형되는 *에스. 티피무리움*의 예시적인 균주와 같은 생 약독화된 *살모넬라* 균주에 의해 예시되는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 위에서 논의한 바와 같이, *msbB* 발현의 결실은 지질 A의 말단 미리스토일화를 방지하는 반면, *pagP* 발현의 결실은 팔미토일화를 방지한다. 펜타-아실화 지질 A로 LPS를 생산하도록 변형된 균주는 종양 미세환경에서 면역 반응을 자극하는 이종성 유전자 페이로드를 발현하도록 추가로 변형되었을 때, 전염증성 사이토카인의 수준을 낮추고, 혈액 내 안정성을 개선하고, 보체 고정에 대한 내성을 증가시키고, 항균성 펩타이드에 대한 감수성을 증가시키고, 내약성을 증강시키고, 항종양 면역력성을 증가시킨다.

[0408] 다른 박테리아 종에서 지질 A 팔미토일트랜스퍼라제(PagP)의 상동체 및 이종상동체를 인코딩하는 해당 유전자도 결실되거나 방해되어 유사한 결과를 얻을 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어 *이. 콜라이*에서 지질 IVA 팔미토일트랜스퍼라제를 인코딩하는 *pagP*; 및 *에스. 티피*에서 항균성 펩타이드 내성 및 지질 A 아실화 단백질을 인코딩하는 *pagP*를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0409] **2.영양소 영양요구성**

[0410] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 하나 이상의 필수 영양소, 예컨대 퓨린(예를 들어, 아데닌), 뉴클레오사이드(예를 들어, 아데노신), 아미노산(예를 들어, 방향족 아미노산, 아르기닌 및 류신), 아데노신 트리포스페이트(ATP), 또는 당업계에 알려지고 기재된 바와 같은 다른 영양소에 대해 이러한 면역자극성 박테리아를 영양요구성으로 되게 함으로써 약독화될 수 있다.

[0411] **a.*purI* 결실/방해**

[0412] *purI* 유전자(*purM* 유전자와 동의어)에 의해 인코딩되는 효소인 포스포리보실아미노이미다졸 합성효소는 퓨린의 생합성 경로에 관여한다. 따라서 *purI* 유전자의 방해 또는 결실 또는 비활성화는 박테리아를 퓨린에 대한 영양요구성으로 만든다. 약독화되는 것 외에도, *purI*$^-$ 돌연변이체는 종양 환경에서 풍부하고 상당한 항종양 활성을 갖는다(예를 들어, Pawelek 등 (1997) *Cancer Research* 57:4537-4544 참조). 이러한 콜로니화는 종양의 빠른 세포 회전율의 결과로 종양의 간질액에 존재하는 고농도의 퓨린으로 인해 발생한다고 이전에 설명되었다. *purI*$^-$ 박테리아는 퓨린을 합성할 수 없기 때문에 외부 아데닌 공급원이 필요하며 이것이 퓨린이 풍부한 종양 미세환경에서 제한된 성장으로 이어질 것으로 생각되었다(예를 들어, Rosenberg *et al.* (2002) *J. Immunotherapy* 25(3):218-225). VNP20009 균주는 처음에 *purI* 유전자의 결실을 함유하는 것으로 보고되었지만(예를 들어, Low 등 (2003) *Methods in Molecular Medicine Vol. 90, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, pp. 47-59 참조), VNP20009의 전체 게놈에 대한 후속 분석은 *purI* 유전자가 결실되지 않지만 염색체 역전(inversion)에 의해 방해됨을 보여주었다(예를 들어, Broadway 등 (2014) *Journal of Biotechnology* 192:177-178 참조). 전체 *purI* 유전자는 삽입 서열에 의해 플랭킹되는 VNP20009 염색체의 두 부분 내에 포함되어 있으며, 그 중 하나는 활성 트랜스포사제를 갖고 있다. *purI* 유전자의 방해는 종양 조직/미세환경으로의 복제를 제한하지만, 여전히 세포내 복제 및 독성을 허용한다. 본원에 예시된 바와 같이(실시예 2 참조) *msbB* 및 *purI* 유전자 각각의 결실 또는 방해는 종양 조직의 세포외 공간으로의 박테리아 성장을 제한하고 세포내 복제를 방지하기 위해 필요하다. 재조합에 의한 야생형으로의 가능한 복귀를 제거하기 위해 이러한 유전자의 인코딩 부분이 완전히 결실된 균주가 본원에 제공된다. 이러한 박테리아는 더 효과적으로 성장하는 것으로 본원에 제시된다.

[0413] *purI* 유전자 결실 또는 방해 외에도, 영양 영양요구성은 예를 들어 *aro*, *gua*, *thy*, *nad* 및 *asd*와 같은 유전자의 결실/돌연변이에 의해 면역자극성 박테리아에 도입될 수 있다. 이러한 유전자를 포함하는 생합성 경로에 의해

생성된 영양소는 종종 숙주 세포에서 사용할 수 없으므로 박테리아 생존이 어렵다. 예를 들어, 살모넬라 및 다른 박테리아 종의 약독화는 해당과정을 방향족 아미노산 생합성에 연결하는 시키메이트 경로의 일부인 *aroA* 유전자의 결실에 의해 달성될 수 있다(예를 들어, Felgner 등 (2016) *mBio* 7(5):e01220-16). *aroA*의 결실은 방향족 아미노산에 대한 박테리아 영양요구성 및 후속 약독화를 초래한다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2003/0170276, 2003/0175297, 2012/0009153, 및 2016/0369282, 및 국제 출원 공개 번호 WO 2015/032165 및 WO 2016/0369282 참조). 유사하게는, *aroC* 및 *aroD*를 포함하는 방향족 아미노산의 생합성 경로에 관여하는 다른 효소는 약독화를 달성하기 위해 결실되었다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2016/0369282 및 국제 출원 공개 번호 WO 2016/025582 참조). 예를 들어, *에스. 티피무리움* 균주 SL7207은 방향족 아미노산 영양요구성(*aroA*⁻ 돌연변이체)이고; 균주 A1 및 A1-R은 류신-아르기닌 영양요구균이고; VNP20009/YS1646은 퓨린 영양요구성(purI-돌연변이), 뿐만 아니라 *msbB*⁻이다. 본원에 나타낸 바와 같이, VNP20009/YS1646은 또한 면역억제성 뉴클레오사이드 아데노신 및 ATP에 대해 영양요구성이다(예를 들어, 실시예 1 참조). 본원에 제공된 균주는 YS1646로 명명된 균주로부터 유래된 균주, 예컨대 편모가 결여되거나 *pagP*⁻이거나 펜타-아실화된 LPS를 생산하도록 변형된 것을 포함하고, *purI* 및/*msbB*의 완전 결실, 뿐만 아니라 예컨대 박테리아를 *csgD*-로 만드는 게놈 변형에 의한 컬리 핌브리애의 결실을 포함한 추가의 변형, 및 *thyA*⁻ 균주와 같이 성장을 위해 다양한 영양소를 필요로 하는 추가의 변형을 포함한다. 균주는 또한, 이를 *ansB*⁻로 만들어 이것이 아스파라긴 신타제를 생산하지 않는 게놈 변형을 가질 수 있으며, 이는 T 세포를 저해할 수 있어서 면역자극성 박테리아의 이러한 면역억제성 양태를 무효화시킨다. 예시적인 균주는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD/F*-△*purI*, 및 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD/F*-△*purI*/△*thyA*로 명명된 것을 포함한다. 이러한 명명은 살모넬라 유전자를 참조하는 것으로 이해된다; 유사한 변형은 다른 박테리아 종, 예컨대 리스테리아 및 이. 콜라이, 예컨대 니쓸(Nissle)에서 수행될 수 있다.

[0414] 포스포리보실아미노이미다졸 합성효소(PurI)의 상동체 또는 이종상동체를 인코딩하는 상응하는 유전자, 및 다른 박테리아 종에서 퓨린 합성에 필요한 다른 유전자도 유사한 결과를 달성하기 위해 결실되거나 방해될 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어 *이. 콜라이*에서 포스포리보실포르밀글리신아미드 사이클로-리가제를 인코딩하는 *purM*; *에스. 티피*에서 포스포리보실포르밀글리신아미딘 사이클로-리가제를 인코딩하는 *purM*; *엘. 모노사이토게네스*에서 아데닐로숙시네이트 합성효소를 인코딩하는 *purA*, 포스포리보실포르밀글리신아미딘 합성효소 II를 인코딩하는 *purQ*, 및 포스포리보실포르밀글리신아미딘 합성효소 하위단위 PurS를 인코딩하는 *purS*; *비피도박테리움 롱검*에서 포스포리보실포르밀글리신아미딘 사이클로-리가제를 인코딩하는 *purM*(BL1122); 및 AIR 합성효소를 인코딩하는 NT01CX_RS09765, 및 *클로스트리디움 노비*에서 포스포리보실포르밀글리신아미딘 사이클로-리가제를 인코딩하는 NT01CX_RS07625(*purM*)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0415] **b.아데노신 영양요구성**

[0416] 트립토판 및 아데노신 트리포스페이트(ATP)/아데노신 경로에서 유래된 대사 생성물은 종양/종양 미세환경(TME) 내에서 면역억제 환경을 형성하는 주요 구동인자이다. 세포 내부와 외부에 자유 형태로 존재하는 아데노신은 면역 기능의 이펙터이다. 아데노신은 NF-κB의 T-세포 수용체 유도 활성화를 감소시키고 IL-2, IL-4 및 IFN-γ를 억제한다. 아데노신은 T-세포 세포독성을 감소시키고, T-세포 아네르기(anergy)를 증가시키며, Foxp3+ 또는 Lag3+ 조절 T-세포(T-reg 세포, T-reg 또는 Treg)로의 T-세포 분화를 증가시킨다. 자연 살해(NK) 세포에서 아데노신은 IFN-γ 생성을 감소시키고 NK 세포 세포독성을 억제한다. 아데노신은 호중구 부착 및 혈관외유출을 차단하고, 식균작용을 감소시키며, 초과산화물 및 산화질소 수준을 약독화시킨다. 아데노신은 또한 대식세포에서 TNF-α, IL-12 및 MIP-1α(CCL3)의 발현을 감소시키고, 주조직적합성 복합체(MHC) 부류 II 발현을 약화시키며, IL-10 및 IL-6의 수준을 증가시킨다. 아데노신 면역조절 활성은 종양의 세포외 공간으로 방출되고 표적 면역 세포, 암세포 또는 내피 세포 표면의 아데노신 수용체(ADR)가 활성화된 후에 발생한다. 종양 미세환경의 높은 아데노신 수치는 국소 면역억제를 일으켜 면역계가 암세포를 제거하는 능력을 제한한다.

[0417] 세포외 아데노신은 종양 기질 세포에서 발현되는 막 관련 엑토엔자임 CD39(엑토-뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라젤, 또는 NTPDase1)와 CD73(엑토-5'-뉴클로오티다제)의 순차적인 활성에 의해 생성되며, 더불어 사멸되거나 사멸중인 세포로부터 생성된 ATP 또는 ADP의 인산가수분해에 의해 아데노신을 생성한다. CD39는 세포외 ATP(또는 ADP)를 5'-AMP로 전환하고, 이는 CD73에 의해 아데노신으로 전환된다. 종양 미세환경의 저산소 상태에서 내피 세포에서 CD39 및 CD73의 발현이 증가하여 아데노신 수준이 증가한다. 종양 저산소증은 부적절한 혈액 공급 및 와해된 종양 혈관계로 인해 산소 전달이 손상될 수 있다(예를 들어, Carroll and Ashcroft

(2005) *Expert. Rev. Mol. Med.* 7(6), DOI: 10.1017/S1462399405009117 참조). 종양 미세환경에서 발생하는 저산소증은 또한 아데노신을 AMP로 전환시키는 아데닐산 키나제(AK)를 억제하여 매우 높은 세포외 아데노신 농도를 유발한다. 저산소 종양 미세환경에서 아데노신의 세포외 농도는 10-100 μM에서 측정되었으며, 이는 약 0.1 μM의 일반적인 세포외 아데노신 농도보다 최대 약 100-1000배 더 높다(예를 들어, Vaupel *et al.* (2016) *Adv. Exp. Med. Biol.* 876:177-183; 및 Antonioli *et al.* (2013) *Nat. Rev. Can.* 13:842-857). 종양의 저산소 영역은 미세혈관에서 멀리 떨어져 있기 때문에 종양의 일부 영역에서 아데노신의 국소 농도는 다른 영역보다 높을 수 있다.

[0418] 면역계를 저해하는 직접적인 효과를 나타내기 위해, 아데노신은 또한 암세포 증식, 세포자멸사 및 혈관신생에 대한 효과에 의해 암세포 성장 및 전파를 제어할 수 있다. 예를 들어, 아데노신은 주로 A_{2A} 및 A_{2B} 수용체의 자극을 통해 혈관신생을 촉진할 수 있다. 내피 세포의 수용체 자극은 내피 세포의 세포간 접착 분자 1(ICAM-1) 및 E-셀렉틴의 발현을 조절하고, 혈관 무결성을 유지하며, 혈관 성장을 촉진할 수 있다(예를 들어, Antonioli *et al.* (2013) *Nat. Rev. Can.* 13:842-857). 다양한 세포에서 A_{2A}, A_{2B}, 또는 A_3 중 하나 이상이 아데노신에 의해 활성화되면 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 인터루킨-8(IL-8) 또는 안지오포이에틴 2와 같은 전혈관신생 인자의 생성을 자극할 수 있다(예를 들어, Antonioli *et al.* (2013) *Nat. Rev. Can.* 13:842-857 참조).

[0419] 아데노신은 또한 암세포의 수용체와의 상호작용을 통해 종양 세포 증식, 세포 사멸 및 전이를 직접 조절할 수 있다. 예를 들어, 연구에 따르면 A_1 및 A_{2A} 수용체의 활성화는 일부 유방암 세포주에서 종양 세포 증식을 촉진하고 A_{2B} 수용체의 활성화는 결장암 세포에서 암 성장 촉진 특성을 갖는 것으로 나타났다(예를 들어, Antonioli *et al.* (2013) *Nat. Rev. Can.* 13:842-857). 아데노신은 또한 암세포의 세포자멸사를 유발할 수 있으며, 다양한 연구에서 이 활성을 A_3을 통한 외인성 세포자멸사 경로의 활성화 또는 A_{2A} 및 A_{2B}를 통한 내부 세포자멸사 경로의 활성화와 연관시켰다(예를 들어, Antonioli 등 (2013) 참조). 아데노신은 세포 운동성, 세포외 기질에 대한 부착, 세포 부착 단백질 및 수용체의 발현을 증가시켜 세포 이동 및 운동성을 촉진함으로써 종양 세포 이동 및 전이를 촉진할 수 있다.

[0420] 아데노신 트리포스페이트(ATP)의 세포외 방출은 자극된 면역 세포, 손상되거나 죽어가는 세포 또는 스트레스를 받은 세포에서 발생한다. NLR 계열의 피린 도메인 함유 3(NLRP3) 인플라마솜은 이러한 ATP의 세포외 방출에 의해 자극을 받으면 카스파제-1을 활성화하고 사이토카인 IL-1β 및 IL-18을 분비하여 내재성 및 적응 면역력을 활성화한다(예를 들어, *Stagg* and Smyth (2010) *Oncogene* 29:5346-5358 참조). ATP는 종양 조직에서 100 mM을 초과하는 농도로 축적될 수 있는 반면 건강한 조직에서 발견되는 ATP 수준은 매우 낮다(약 1 내지 5 μM)(예를 들어, Song *et al.* (2016) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 310(2):C99-C114). ATP는 CD39와 CD73이라는 효소에 의해 아데노신으로 분해된다. 활성화된 아데노신은 음성 피드백 기전을 통해 고도의 면역억제성 대사 생성물로 작용하고 저산소 종양 미세환경에서 여러 면역 세포 유형에 대해 다면(pleiotropic) 효과를 나타낸다(예를 들어, Stagg and Smyth (2010) *Oncogene* 29:5346-5358). 아데노신 수용체 A_{2A} 및 A_{2B}는 다양한 면역 세포에서 발현되고 아데노신에 의해 자극되어 cAMP-매개 신호 변화를 촉진하여 T-세포, B 세포, NK 세포, 수지상 세포(DC), 비만 세포, 대식세포, 호중구 및 자연 살해 T(NKT) 세포의 면역억제 표현형을 초래한다. 결과적으로, 아데노신 수준은 CD73과 같은 엑토-뉴클레오티다아제를 과발현하는 것으로 나타난 고형 종양과 같은 병리학적 조직에서 정상 농도의 100배 이상까지 축적될 수 있다. 아데노신은 또한 종양 신생 및 발달을 촉진하는 것으로 나타났다. 따라서 아데노신에 대한 영양요구성인 조작된 박테리아는 향상된 종양 표적화 및 콜로니화를 나타낼 것이다.

[0421] *살모넬라 티피*와 같은 면역자극성 박테리아는 예를 들어 *tsx* 유전자의 결실에 의해(예를 들어, Bucarey *et al.* (2005) *Infection and Immunity* 73(10):6210-6219 참조) 또는 *purD*의 결실에 의해(예를 들어, Husseiny (2005) *Infection and Immunity* 73(3):1598-1605 참조) 아데노신에 대한 영양요구성이 될 수 있다. 그람-음성 박테리아 *잔토모나스 오리재(Xanthomonas oryzae)*에서, *purD* 유전자 넉아웃은 아데노신에 대해 영양요구성인 것으로 나타났다(예를 들어, Park 등 (2007) FEMS *Microbiol. Lett.* 276:55-59 참조). 본원에 예시된 바와 같이, *에스. 티피무리움* 균주 VNP20009는 *purI* 변형으로 인해 아데노신에 대해 영양요구성이고; 따라서, 아데노신에 대한 영양요구성을 만들기 위한 추가 변형은 필요하지 않다. 따라서, 본원에 제공된 바와 같은 면역자극성 박테리아 균주의 구현예는 아데노신에 대해 영양요구성이다. 이러한 영양요구성 박테리아는 종양 미세환경에서 선택적으로 복제하여 종양 내 투여된 박테리아의 축적 및 복제를 더욱 증가시키고 종양 내 및 종양 주변의 아데노신 수준을 감소시켜 아데노신의 축적으로 인한 면역억제를 감소 또는 제거한다. 본원에 제공된 이러한 박테리아의 예는 아데노신 영양요구성을 제공하는 $purI^-/msbB^-$ 돌연변이를 함유하는 *에스. 티피무리움*의 변형된 균주이다.

다른 균주 및 박테리아의 경우 *purI* 유전자가 VNP20009에서와 같이 방해될 수 있거나 *purI* 유전자의 전체 또는 일부가 결실되어 야생형 유전자로 복귀할 수 없도록 할 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 균주 VNP20009에서, *purI*-유전자는 역전에 의해 비활성화되었다. 유사하게는, VNP20009의 *msbB* 유전자는 완전히 결실되지 않았다. 본원에 예시된 바와 같이, *purI* 및 *msbB* 유전자가 완전히 결실되어 임의의 복귀 위험을 제거한 균주는 시험관내 배양물의 성장에 의해 평가된 바와 같이 우수한 적합성을 실증한다.

[0422] 퓨린(예를 들어, 아데닌), 뉴클레오사이드(예를 들어, 아데노신), 아미노산(예를 들어, 방향족 아미노산, 아르기닌, 류신) 또는 아데노신 트리포스페이트(ATP)와 같은 하나 이상의 필수 영양소에 대해 영양요구성을 만들어 변형된 면역자극성 박테리아가 사용된다. 특히, *에스. 티피무리움*의 균주와 같은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 구현예에서, 박테리아는 아데노신에 대해 영양요구성이 되고, 선택적으로 ATP에 대해 영양요구성이 되며, 우선적으로 종양 미세환경(TME)에 축적된다. 따라서, 본원에 기재된 면역자극성 박테리아 균주는 성장을 위해 퓨린, 아데노신 및/또는 ATP를 필요로 하기 때문에 약독화되고, 아래에서 논의되는 바와 같이 이러한 대사산물이 풍부한 TME를 우선적으로 콜로니화한다. 일부 종양의 종양 미세환경에서 발생하는 아데노신 축적은 면역억제적이기 때문에, 아데노신 영양요구성은 종양 미세환경에 축적되는 아데노신으로부터의 면역억제를 제거한다.

[0423] **c.티미딘 영양 요구체**

[0424] 게놈 변형은 아래 논의된 비활성화/결실(섹션 3 참조) 대신에 또는 이에 더하여 도입될 수 있다. 성장에 필요한 유전자 또는 유전자 생성물, 예컨대 영양소를생산하는 유전자의 다른 결실 또는 비활성화는 예를 들어, asd 비활성화/결실 대신에 또는 이에 더하여 사용될 수 있다. 이는 예를 들어, 박테리아를 *thyA*-로 만드는 변형을 포함한다(예를 들어, 문헌[Loessner *et al.* (2006) *FEBS Lett 265*:81-88] 참조). *ThyA*$^-$인 면역자극성 박테리아는 티미딜레이트 신타제의 생산의 비활성화를 초래하거나 무효화시키는 게놈 변형, 예컨대 삽입, 결실, 대체, 전위, 및/또는 다른 변화를 갖는다. 티미딜레이트 신타제는 DNA 생합성 전구체(dTTP로의 전구체)인 dTMP로의 dUMP의 환원적 메틸화를 촉매화한다.

[0425] 이러한 생성물의 생산을 위한 박테리아 게놈의 발현이나 생산의 무효화 또는 다른 약독화 돌연변이는 투여 후 생체내에서 박테리아 세포 사망 시 인코딩된 거대분자의 방출을 초래한다. 아래 논의된 바와 같이 Asd는 박테리아 세포벽 합성을 위한 필수 효소이다; ThyA는 DNA 합성에 필요한 효소이다. 각각의 유전자의 돌연변이는 균주를 디아미노피멜산(DAP) 또는 티미딘 모노포스페이트 전구체에 대한 영양 요구성으로 만든다. 보완 기질의 부족 시, 이러한 박테리아는 DAP-부재 또는 티민부재 사망에 의해 사멸되어, 박테리아 단백질 및 플라스미드의 방출을 초래한다. Asd의 비활성화 또는 무효화는 거대분자의 방출을 초래한다. ThyA(삽입, 결실 및 다른 변형을 가져서 활성 효소가 생산되지 않는 것을 포함하는 △*ThyA* 박테리아를 생산하기 위해) 발현/활성의 무효화 또는 비활성화는 티미딘 고갈 시 단백질 및 플라스미드를 포함한 거대분자의 방출을 초래하지 않는다(문헌[Loessner *et al.*, (2006) *FEBS Lett 265*:81-88]).

[0426] 그러므로, 게놈이 변형되어 활성 효소가 생산되지 않는 △*ThyA* 박테리아는 예를 들어 생체내에서 숙주 세포로의 플라스미드의 전달에 유리한데, 왜냐하면 박테리아는 이의 내용물을 너무 일찍 방출하지 않을 것이기 때문이다. 본원에 제공된 박테리아가 이러한 박테리아를 소모하는 골수성 세포, 예컨대 식세포, 예컨대 대식세포, 수지상 세포, 단핵구 및 중성구를 감염시키거나 이에 축적되기 때문에, 무손상 △*ThyA* 박테리아는 예를 들어, RNA라면 발현 또는 단백질이라면 분비나 제시를 위해, 표적화된 세포 내부에서 페이로드, 예컨대 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 방출한다. 그러므로, 박테리아를 *thyA*$^-$로 만드는 게놈 변형은 특정 적용, 예컨대 면역화, 세포 상에서의 제시, RNA의 전달, 및 다른 이러한 적용에 유리하다.

[0427] **3.플라스미드 유지 및 전달**

[0428] **a.*asd* 결실**

[0429] 상기 논의된 바와 같이, 박테리아는 *thyA*$^-$로 될 수 있다; 이는 또한 그 대신에 또는 이에 더하여 *asd*$^-$로 될 수 있다. 특정 게놈 변형의 선택은 박테리아의 의도된 적용에 의존한다. *thyA* 비활성화는 일부 적용에 유리하다; 다른 경우 박테리아를 *asd*$^-$로 만드는 것이 유리하다; 특정 변형(들)을 선택하는 것은 당업자에게 있다. 박테리아의 *asd* 유전자는 아스파르테이트-세미알데하이드 탈수소효소를 인코딩한다. *에스. 티피무리움*의 *asd*$^-$ 돌연변이체는 세포벽 합성에 필요한 디아미노피멜산(DAP)에 대한 필수 요구 사항을 가지며 DAP가 없는 환경에서 용해를 겪을 것이다. 이 DAP 영양요구성은 *asd* 유전자가 박테리아의 플라스미드에서 트랜스로 보완될 때 항생제를 사용하지

않고 생체내에서 플라스미드 선택 및 플라스미드 안정성 유지에 사용할 수 있다. 비항생제-기초 플라스미드 선택 시스템은 유리하며 1) 부작용 발생 시 신속한 제거 기전으로 투여된 항생제를 사용하고, 2) 일반적으로 이러한 사용을 피하는 항생제 없는 생산 규모 확대를 허용한다. *asd* 유전자 보체 시스템은 이러한 비항생제-기초 플라스미드 선택을 제공한다(예를 들어, Galan 등 (1990) *Gene* 94(1):29-35 참조). 종양 미세환경에서 플라스미드를 유지하기 위해 *asd* 유전자 보체 시스템을 사용하면 면역자극성 단백질(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 공동자극성 분자); STING 및 IRF3과 같은 유형 I IFN, 및 이의 기능-획득/항시적으로 활성인 돌연변이를 유도하는 세포기질성 DNA/RNA 센서; 항체 및 이의 단편(예를 들어, 체크포인트 저해제, 또는 항-IL-6 또는 항-VEGF 항체); 이중 특이적 T-세포 연계자(상표 BiTEs®로 판매됨); 간섭 RNA; 및 본원의 다른 곳에서 논의되고 당업계에 알려진 다른 치료 생성물; 및 모든 선행 치료 생성물의 보완적 조합을 인코딩하는 플라스미드를 전달하도록 조작된 *에스. 티피무리움* 균주의 약효를 증가시키는 것으로 예상된다.

[0430] *에스. 티피무리움*의 *asd* 돌연변이체에 대한 대안적인 용도는 숙주 종양을 지속적으로 콜로니화하는 능력 없이 감염된 세포에 치료 생성물/거대분자를 전달하기 위해 자가분해(또는 자살) 균주를 생성하기 위해 DAP 영양요구성을 이용하는 것이다. *asd* 유전자의 결실은 시험관내 또는 생체내에서 성장할 때 박테리아를 DAP에 대한 영양요구성으로 만든다. 본원에 기재된 예는 DAP에 대해 영양요구성이고 면역조절 단백질의 전달에 적합한 플라스미드를 함유하지만 *asd* 보체 유전자를 함유하지 않아 생체내 복제에 결함이 있는 균주를 생성하는 *asd* 결실 균주를 제공한다. 이 균주는 DAP의 존재 하에 시험관 내에서 증식되고, 정상적으로 성장한 다음, DAP가 존재하지 않는 포유동물 숙주에 면역치료제로서 투여된다. 자살 균주는 숙주 세포를 침범할 수 있지만 포유동물 조직에 DAP가 없기 때문에 복제할 수 없으며 자동으로 용해되고 세포질 내용물(예를 들어, 플라스미드 또는 단백질)을 전달한다.

[0431] 다른 박테리아 종에서 아스파테이트-세미알데하이드 탈수소효소(asd)의 상동체 또는 이종상동체를 인코딩하는 해당 유전자도 결실되거나 방해되어 유사한 결과를 얻을 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어 *이. 콜라이*에서 아스파르테이트-세미알데하이드 탈수소효소를 인코딩하는 *asd*; *에스. 티피*에서 아스파르테이트-세미알데하이드 탈수소효소를 인코딩하는 *asd*(STY4271); *엘. 모노사이토게네스*에서 아스파르테이트-세미알데하이드 탈수소효소를 인코딩하는 *asd*(lmo1437); *비피도박테리움 롱검*에서 아스파르테이트-세미알데하이드 탈수소효소를 인코딩하는 *asd*(BL0492); 및 *클로스트리디움 노비*에서 아스파르테이트-세미알데하이드 탈수소효소를 인코딩하는 NT01CX_RS04325(*asd*)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 유사하게는, 본원 위에서 논의된 바와 같이, *thyA*는 asd 변형 대신에 게놈 변형에 의해 비활성화되거나 무효화될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 티미딜레이트 신타제 발현/활성의 비활성화 또는 무효화는 티미딘 고갈 시 단백질 및 플라스미드를 포함한 거대분자의 방출을 초래하지 않는다.

[0432] **b. *endA* 결실/방해**

[0433] *endA* 유전자(예를 들어, SEQ ID NO: 250 참조)는 그람 음성 박테리아의 주변 세포질에서 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 분해를 매개하는 엔도뉴클레아제(DNA-특이적 엔도뉴클레아제 I; 예를 들어, SEQ ID NO: 251 참조)를 인코딩한다. *endA* 유전자의 돌연변이가 플라스미드 DNA의 더 높은 수율을 허용하기 때문에 실험실 *이. 콜라이*의 가장 일반적인 균주는 *endA*⁻이다. 이 유전자는 종 사이에서 보존된다. 무손상 플라스미드 DNA 전달을 용이하게 하기 위해, 조작된 면역자극성 박테리아의 *endA* 유전자는 엔도뉴클레아제 활성을 방지하기 위해 결실되거나 돌연변이된다. 이러한 돌연변이의 예는 E208K 아미노산 치환(예를 들어, Durfee 등 (2008) *J. Bacteriol.* 190(7):2597-2606), 또는 관심 종의 상응하는 돌연변이이다. E208 잔기를 포함하는 *endA*는 살모넬라를 포함한 박테리아 종 사이에서 보존된다. 따라서, E208K 돌연변이는 살모넬라 종을 비롯한 다른 종에서 엔도뉴클레아제 활성을 제거하는 데 사용될 수 있다. 당업자는 *endA* 활성을 제거하기 위해 다른 돌연변이 또는 결실을 도입할 수 있다. 이 돌연변이에 영향을 미치거나 살모넬라와 같은 본 발명의 면역자극성 박테리아에서 *endA*의 활성을 제거하기 위해 유전자를 결실 또는 방해하면 무손상 플라스미드 DNA 전달의 효율성이 증가하여 플라스미드 상에서 인코딩되는 하나 또는 둘 이상의 면역조절 단백질/치료 생성물의 발현이 증가하고, 항종양 면역 반응 및 항종양 효능을 향상시킨다.

[0434] **4.플라젤린 넉아웃 균주**

[0435] 편모는 이동 수단을 제공하기 위해 시계 방향 또는 반시계 방향으로 회전할 수 있는 회전 모터에 후크를 통해 부착된 긴 필라멘트로 구성된 박테리아 표면의 소기관이다. 예를 들어 *에스. 티피무리움*의 편모는 위장관의 점막층을 가로지르는 운동성을 매개하는 능력으로 인해 화학주성 및 구강 경로를 통한 감염 확립에 중요하다. 편모는 시험관 내에서 종양 실린더로이드에 대한 화학주성 및 콜로니화에 필요하고(예를 들어, Kasinskas and

Forbes (2007) *Cancer Res.* 67(7):3201-3209 참조), 운동성이 종양 침투에 중요한 것으로 나타난 것이 실증되긴 하였지만(예를 들어, Toley and Forbes (2012) *Integr. Biol.* (Comb) 4(2):165-176 참조), 박테리아가 정맥내 투여되는 경우 편모는 동물의 종양 콜로니화에 필요하지 않다(예를 들어, Stritzker *et al.* (2010) *International Journal of Medical Microbiology* 300:449-456). 각각의 편모 필라멘트는 수만 개의 편모 하위단위로 이루어진다. *에스. 티피무리움* 염색체는 *fliC* 및 *fljB*라는 두 개의 유전자를 포함하며, 이는 항원적으로 구별되는 플라젤린 단량체를 인코딩한다. *fliC* 및 *fljB* 둘 다에 결함이 있는 돌연변이체는 경구 감염 경로를 통해 투여될 때 운동성이 없고 독성이 없지만 비경구적으로 투여될 때 독성을 유지한다.

[0436] 플라젤린은 살모넬라의 주요 전염증성 결정인자이며(예를 들어, Zeng 등 (2003) *J. Immunol.* 171:3668-3674 참조), 세포 표면의 TLR5 및 세포기질의 NLCR4에 의해 직접 인식된다(예를 들어, Lightfield 등 (2008) *Nat. Immunol.* 9(10):1171-1178 참조). 두 경로 모두 전염증 반응을 일으켜 IL-1β, IL-18, TNF-α 및 IL-6을 포함한 사이토카인의 분비를 유발한다. fliC 및 fljB에 의해 인코딩된 플라젤린보다 더 큰 염증을 유도하는 비브리오 불니피쿠스 플라젤린 B(Vibrio vulnificus 플라젤린 B)를 분비하도록 박테리아를 조작함으로써 플라젤린에 대한 전염증 반응을 증가시킴으로써 살모넬라-기초 암 면역요법을 더욱 강력하게 만들려는 시도가 있었다(예를 들어, Zheng *et al.* (2017) *Sci. Transl. Med.* 9(376):eaak9537 참조).

[0437] 본원에서, *에스. 티피무리움*과 같은 살모넬라 박테리아는 플라젤린 하위단위 *fliC* 및 *fljB*가 모두 결여되도록 조작되어 TLR5-매개 전염증 신호를 감소시킨다. 편모를 포함하는 다른 박테리아도 편모를 제거하도록, 그리고 *살로넬라*의 예시된 변형과 동일한 효과를 실질적으로 갖는 다른 변형을 포함하도록 유사하게 조작될 수 있다. 예를 들어, 본원에 나타낸 바와 같이, 감소된 TNF-알파 유도를 초래하는 *msbB* 및/또는 *pagP*가 결여된 *살모넬라* 균주는 *살모넬라*에서 *fliC* 및 *fljB* 넉아웃에 의해 달성될 수 있는 편모의 제거와 조합된다. 그 결과 다른 효과 중에서도 TNF-알파 유도 감소와 TLR5 인식 감소가 조합된 *살모넬라* 균주가 생성된다. 이러한 박테리아 변형, *msbB-, pagP-, fliC-* 및 *fljB-*는 면역조절 단백질 및 생성물의 조합과 같은 치료제를 인코딩하는 CpG를 임의로 함유하는 면역자극 플라스미드와 조합될 수 있다. 생성된 박테리아는 전염증 신호를 감소시켰지만 강력한 항종양 활성을 나타냈다. 이러한 게놈 변형은 또한 본원에 기재된 게놈 변형의 다른 것과 조합될 수 있다. 백신의 경우, 인코딩된 생성물은 항원 및 단백질에 대해 면역보호성 또는 치료 반응이 의도되는 이러한 항원 및 단백질을 포함할 수 있다.

[0438] 예를 들어, 본원에 예시되고 제공되는 바와 같이, fliC 및 fljB 이중 돌연변이체가 *에스. 티피무리움*의 asd-결실된 균주, VNP20009에서 작제되었다. purI/purM의 방해로 독성이 약화된 VNP20009는 야생형 지질 A보다 독성이 덜한 지질 A 하위단위를 생성하는 msbB 유전자 변형(부분 결실)을 포함한다. 이는 야생형 지질 A를 갖는 균주와 비교하여 정맥내 투여 후 마우스 모델에서 TNF-α 생성을 감소시킨다. 생성된 균주는 TLR2/4 신호전달을 감소시키기 위한 지질 A의 변형 및 TLR5 인식 및 인플라마솜 유도를 감소시키는 플라젤린 하위단위의 발현의 결실에 의해 박테리아 염증에 대해 약독화된 예시적인 균주이다.

[0439] *에스. 티피무리움*과 같은 살모넬라 종을 포함한 특정 박테리아 종의 발병은 살모넬라 병원성 섬(SPI)이라고 하는 유전자 클러스터를 포함한다. 살모넬라는 이펙터 단백질을 숙주 세포의 세포질에 직접 주입하는 바늘 같은 구조를 형성하는 살모넬라 병원성 섬 1(SPI-1)에 의해 인코딩된 유형 3 분비 시스템(T3SS)을 사용하여 비 포식성 장 상피 세포를 침범한다. 이러한 이펙터 단백질은 진핵 세포의 세포골격을 재배열하여 장 상피의 침입을 용이하게 하고, 또한 전염증성 사이토카인을 유도한다. SPI로 표기된 SPI-1은 상피 세포의 침입을 매개한다. SPI-1 유전자는 하기를 포함하지만 이로 제한되지 않는다: *avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, iacP, iagB, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB* 및 *sptP*. 이러한 유전자 중 하나 이상을 제거하면 박테리아이 상피 세포를 감염시키는 능력이 감소하거나 제거되지만, 식세포 면역 세포를 비롯한 식세포를 감염시키거나 침입하는 능력에는 영향을 미치지 않는다. 예를 들어, fliC 및 fljB 유전자 모두의 결실이 hilA, hilD, invA, invF 및 sopB와 같은 SPI-1 유전자의 발현을 유의하게 감소시켜 비-식세포를 침범하는 능력을 감소시키는 것으로 입증되었다(예를 들어, Elhadad *et al.* (2015) *Infect. Immun.* 83(9):3355-3368).

[0440] 살모넬라과 같은 박테리아에서 플라젤린은 SPI-1 3형 분비 시스템(T3SS)과 함께 대식세포에서 파이롭토시스를 유발하는 데 필요하며 대식세포 NLRC4 인플라마솜에 의해 검출될 수 있다. 편모 하위단위의 제거는 대식세포의 파이롭토시스를 감소시킨다. 예를 들어, fliC 및 fljB가 결실된 *에스. 티피무리움*은 야생형 균주와 비교하여 IL-1β 분비를 상당히 감소시키는 반면, 박테리아의 세포 흡수 및 세포내 복제는 영향을 받지 않은 채로 남아 있다. 이는 플라젤린이 인플라마솜 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 또한, fliC를 항시적으로 발

현하도록 조작된 *에스. 티피무리움* 균주는 대식세포 파이롭토시스를 유도하는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, Li *et al.* (2016) *Scientific Reports* 6:37447; Fink and Cookson (2007) *Cellular Micro-biology* 9(11):2562-2570; 및 Winter *et al.* (2015) *Infect. Immun.* 83(4):1546-1555).

[0441] 본원의 면역자극성 박테리아의 게놈은 *에스. 티피무리움*에서 플라젤린 유전자 fliC 및 fljB를 결실 또는 돌연변이시켜 대식세포와 같은 종양-체류 면역 세포의 세포 사멸을 감소시키고 면역자극성 박테리아의 항종양 면역 반응을 강화하도록 변형될 수 있다.

[0442] LPS의 변형과 결합된 플라젤린 하위단위의 결실은 숙주에서 더 큰 내약성을 허용하고, 식세포로만의 흡수를 제한하고, 그들의 파이로톱틱 세포 사멸을 감소시키고, TME, 특히 종양-체류 골수성 세포로의 면역조절 단백질과 같은 치료 생성물의 전달에 대한 면역자극 반응을 지시한다. 생성된 면역자극성 박테리아는 항종양 반응을 이끌어내고 종양에 대한 적응 면역 반응을 촉진한다.

[0443] 다른 박테리아 종에서 플라젤린을 인코딩하는 해당 유전자도 유사한 결과를 얻기 위해 결실될 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어 편모 필라멘트 구조 단백질을 인코딩하는 fliC, 및 *이. 콜라이*에서 편모 기저체 단백질 FliE를 인코딩하는 fliE; 플라젤린을 인코딩하는 fliC 및 *에스. 티피*에서 편모 기저체 간상체 단백질 FlgB를 인코딩하는 flgB; 엘. 모노사이토게네스에서 플라젤린을 인코딩하는 flaA,편모 후크 기저체 단백질 FliE를 인코딩하는 fliE, 및 편모 기저체 간상체 단백질 FlgB를 인코딩하는 flgB; 및 플라젤린을 인코딩하는 NT01CX_RS04995, NT01CX_RS04990, NT01CX_RS05070 및 NT01CX_RS05075, 편모 기저체 간상체 단백질 FlaB를 인코딩하는 NT01CX_RS05080(*flgB*), 편모 기저체 간상체 단백질 FlaC를 인코딩하는 NT01CX_RS05085(*flgC*), 및 편모 기저체 간상체 단백질 FlaG를 인코딩하는 NT01CX_RS05215(*flgG*)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0444] **5.적응 면역력을 촉진하고 T-세포 기능을 증강시키기 위한 박테리아의 조작**

[0445] **L-아스파라기나제 II (*ansB*) 결실/방해**

[0446] L-아스파라기나제 II는 L-아스파라긴을 암모니아 및 아스파라긴산으로 전환하는 것을 촉매하는 효소이다. 이. 콜라이 및 *에스. 티피무리움*과 같은 여러 박테리아 균주는 L-아스파라기나제를 사용하여 과당-아스파라긴을 탄소 및 질소 공급원으로 소거한다(예를 들어, Sabag-Daigle *et al.* (2018) *Appl. Environ. Microbiol.* 84(5):e01957-17). 급성 림프구성 백혈병(ALL)과 같은 악성 T-세포는 아스파라긴을 합성하는 효소가 부족하기 때문에 아스파라긴이 필요하다. L-아스파라기나제의 투여는 1970년대 초부터 ALL에 대한 최전선 요법이었다(예를 들어, Batool *et al.* (2016) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178(5):900-923 참조). *에스. 티피무리움*에 의한 L-아스파라기나아제 II의 생산은 T-세포 수용체(TCR) 하향조절을 직접 유도하고, T-세포 사이토카인 생성을 감소시키며, 종양 세포용해 기능을 억제하기 때문에 T-세포 억제에 필요하고 충분하다(예를 들어, Kullas *et al.* (2012) *Cell Host Microbe.* 12(6)791-798; 및 van der Velden *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(49):17769-17774). 종양 미세환경에서 T-세포 활성화 동안 발생하는 것과 같은 빠른 클론 확장 조건에서 아스파라긴이 필요하며 L-아스파라기나제 II에 의한 고갈은 T-세포 억제로 이어진다. 따라서 L-아스파라기나제 II는 T-세포 억제가 치료 양식인 암에 대한 항암 치료제로 사용되어 왔다.

[0447] 항암 치료제로서 L-아스파라기나제의 이전 사용과 대조적으로, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 그리고 면역자극성 박테리아 및 박테리아 백신, 예컨대 결핵(TB) 및 다른 질환에 대해 백신화하는 데 사용되는 BCG 백신에서 L-아스파라기나제 활성의 제거가 종양 미세환경에서 T-세포의 기능을 향상시키는 것으로 본원에서 제시된다. L-아스파라기나제 활성의 제거는 활성 효소의 발현을 제거하기 위해 박테리아 게놈을 변형함으로써 수행될 수 있다. 변형에는 핵산의 삽입, 결실, 교체 및 다른 변화가 포함되어 생성된 인코딩된 효소가 활성화되지 않거나 발현되지 않거나 제거된다. 면역자극성 박테리아에서 인코딩된 효소의 발현을 제거하기 위해 L-아스파라기나제 II, ansB를 인코딩하는 유전자의 전부 또는 일부의 결실 또는 이의 방해가 박테리아-콜로니화된 종양 미세환경에서 T-세포의 기능을 향상시킨다는 것이 본원에서 제시된다. L-아스파라기나제 II 활성의 억제는 면역자극성 박테리아에서 유전자 ansB의 전부 또는 일부의 결실 또는 중단/방해에 의해 달성되며, 이에 의해 L-아스파라기나제 II는 생성되지 않는다. 따라서, L-아스파라기나아제 II가 생성되지 않도록 게놈이 변형된 면역자극성 박테리아를 제공한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 항종양 면역 반응을 향상시키기 위해 종양-체류 면역 세포를 콜로니화하기 위해 사용되며; 박테리아 게놈 변형에는 L-아스파라기나제 II의 발현을 제거하는 결실, 삽입, 방해 및/또는 다른 변형이 포함된다.

[0448] 본원에 나타낸 바와 같이, 본원의 면역자극성 박테리아의 게놈은 *ansB*를 결실시키거나, 이를 방해하거나 달리 변형하여 불활성 인코딩된 L-아스파라기나제 II를 생성하거나, 아스파기나제를 제거하여 T-세포 억제를 방지하

고 생체 내 항종양 T-세포 기능을 향상시킬 수 있다. *ansB*가 온전한 균주는 균주로 공동-국재화된 T-세포에서 심각한 T-세포 면역억제를 유도한다는 것이 본원에서 제시된다. *ansB*가 결실된 균주는 면역억제를 유도하지 않으며, 따라서 박테리아를 사용하여 인코딩된 치료제를 종양에 전달하는 당업계의 또 다른 문제를 해결한다. 기능적으로 인코딩된 효소가 발현되지 않는 *ansB* 유전자의 결실 또는 방해와 같은 변형을 종양 미세환경 및/또는 종양-체류 면역 세포에서 축적을 증가시키는 본원에 기재된 다른 변형과 조합하는 면역자극성 박테리아는 면역자극성 박테리아의 우수한 치료제를 제공한다.

[0449] 다른 박테리아 종에서 L-아스파라기나제 II(AnsB)의 상동체 또는 이종상동체를 인코딩하는 해당 유전자도 결실되거나 방해되어 유사한 결과를 얻을 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어 *이. 콜라이*에서 L-아스파라기나제 2를 인코딩하는 ansB; *에스. 티피*에서 L-아스파라기나제를 인코딩하는 ansB(STY3259); *엘. 모노사이토게네스*에서 아스파라긴 합성효소를 인코딩하는 ansB(lmo1663); 및 *비피도박테리움 롱검*에서 L-아스파라기나제 전구체를 인코딩하는 BL1142를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0450] **6.컬리 핌브리애를 생성하는 데 필요한 *살모넬라* 유전자에서의 결실/방해**

[0451] 박테리아와 곰팡이는 생물막이라고 하는 다세포 구조를 형성할 수 있다. 박테리아 생물막은 세포외 중합체 물질로 통칭되는 세포외 DNA뿐만 아니라 분비되고 세포벽과 관련된 다당류, 당단백질, 당지질의 혼합물로 둘러싸여 있다. 이러한 세포외 중합체 물질은 세척제, 항생제 및 항균 펩타이드와 같은 여러 손상으로부터 박테리아를 보호한다. 박테리아 생물막은 표면의 콜로니화를 허용하고 주사 포트 및 카테터와 같은 보철물의 심각한 감염의 원인이다. 생물막은 또한 감염 과정에서 조직에 형성될 수 있으며, 이는 박테리아의 잔류 및 배출 기간을 증가시키고 항생제 치료의 효과를 제한한다. 생물막에서 박테리아의 만성 지속은 예를 들어 담낭의 에스. 티피 감염에서 증가된 종양 형성과 관련이 있다(예를 들어, Di Domenico 등 (2017) *Int. J. Mol. Sci.* 18:1887 참조).

[0452] ***csgD* 결실**

[0453] *에스. 티피무리움*과 같은 살모넬라에서 생물막 형성은 *csgD* 유전자에 의해 조절되며, 이는 *csgBAC* 오페론을 활성화하고 컬리 핌브리애 하위단위 CsgA 및 CsgB의 생성을 증가시킨다(예를 들어, Zakikhany 등 (2010) *Molecular Microbiology* 77(3):771-786 참조). CsgA는 TLR2에 의해 PAMP로 인식되고 인간 대식세포로부터 IL-8의 생산을 유도한다(예를 들어, Tukel 등 (2005) *Molecular Microbiology* 58(1):289-304 참조). 또한 *csgD*는 디-구아닐레이트 고리화효소를 인코딩하는 adrA 유전자를 활성화하여 셀룰로스 생산을 간접적으로 증가시킨다. *adrA*에 의해 생성된 저분자 환식 디구아노신 모노포스페이트(c-디-GMP)는 거의 모든 박테리아 종에서 발생하는 유비퀴터스 2차 메신저이다. c-디-GMP의 증가는 셀룰로스 합성 효소 유전자 *bcsA*의 발현을 향상시키고, 이는 차례로 *bcsABZC* 및 *bcsEFG* 오페론의 자극을 통해 셀룰로스 생산을 증가시켜 셀룰로스 생물막 형성을 유도한다. 결과적으로 *에스. 티피무리움*과 같은 박테리아는 숙주 면역 세포에 의한 식균 작용에 대한 보호로서 고형 종양에 생물막을 형성할 수 있다. 생물막을 형성할 수 없는 살모넬라 돌연변이와 같은 박테리아 돌연변이는 숙주 식세포에 의해 더 빠르게 흡수되고 감염된 종양에서 더 쉽게 제거된다(예를 들어, Crull 등 (2011) *Cellular Microbiology* 13(8):1223-1233 참조). 식세포 내 세포내 국소화의 이러한 증가는 세포외 박테리아의 지속성을 감소시킬 수 있고, 본원에 나타낸 바와 같이 면역조절 단백질 및 다른 항암 치료제와 같은 치료제의 플라스미드 전달의 효율성을 향상시킬 수 있다. 생물막을 형성하는 *에스. 티피무리움*과 같은 면역자극성 박테리아의 능력 감소는 생물막 형성에 관여하는 유전자, 예를 들어 *csgD, csgA, csgB, adrA, bcsA, bcsB, bcsZ, bcsE, bcsF, bcsG, dsbA* 또는 *dsbB*의 결실 또는 방해를 통해 달성될 수 있다(예를 들어, Anwar 등 (2014) *PLoS ONE* 9(8):e106095 참조).

[0454] 생물막 형성을 감소시키기 위해 면역자극성 박테리아를 조작하는 것은 종양/조직으로부터 제거율을 증가시키고, 요법의 내약성을 증가시키며, 환자에서 보철물의 콜로니화를 방지함으로써 이러한 균주의 치료 이점을 증가시키는 것으로 본원에서 제시된다. 아데노신 모방체는 *에스. 티피무리움* 생물막 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이는 종양 미세환경에서 높은 아데노신 농도가 종양-연관 생물막 형성에 기여할 수 있음을 나타낸다(예를 들어, Koopman 등 (2015) *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 76-84 참조). *csgD*-결실된 면역자극성 박테리아 균주는 종양-체류 골수성 세포로의 더 큰 박테리아 흡수로 인해 개선된 항종양 효능을 입증하는 것으로 본원에서 제시된다. 유사한 게놈 변형은 생물막 형성 및/또는 컬리 핌프리애 생성을 변경시켜, 박테라아가 종양 및 종양 미세환경에 존재하는 것과 같은 혈관구조를 더 잘 침윤시킬 수 있도록, 다른 박테리아 균주, 예컨대 *이. 콜라이* 및 *리스테리아*에서 실시될 수 있다.

[0455] *csgD*의 상동체 및 이종상동체를 인코딩하는 해당 유전자, 그리고 다른 박테리아 종에서 컬리 핌브리애 및 생물막 형성에 필요한 다른 유전자도 결실되거나 중단되거나 다른 방식으로 변형되어 유사한 결과를 얻을 수 있다.

이러한 유전자는 예를 들어 *이. 콜라이*에서 DNA-결합 전사 이중 조절인자 CsgD를 인코딩하는 *csgD*; *에스. 티피*에서 조절 단백질 CsgD를 인코딩하는 *csgD*(STY1179); 및 *엘. 모노사이토게네스*에서 생물막 형성에 관여하는 리스테리아 셀룰로스 결합 단백질을 인코딩하는 *lcp*를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0456] 박테리아 *csgD*를 만들기 위한 유전자의 결실 또는 방해와 같은 박테리아 게놈의 변형은 컬리 핌브리애 및 염증성 순환 디뉴클레오타이드(CDN)의 제거 중 하나 이상과 같은 변화를 초래하고, 셀룰로스 분비를 제거한다. 이는 염증 및 면역억제 요소를 제거하고 변경된 지질 A 아실화를 통해 TLR4 인식을 방지하며 셀룰로스 분비를 제거하여 가능한 생물막 형성을 방지함으로써 안전성과 효능을 증가시킨다.

[0457] 본원에 기재된 바와 같이, 아데노신에 대해 영양요구성이 되도록 조작된 박테리아 균주, 예를 들어 *에스. 티피무리움* 균주; LPS의 변형 및/또는 플라젤린의 결실에 의해 전염증성 사이토카인을 유도하는 능력이 감소되고; 및/또는 T-세포 기능을 개선하기 위해 L-아스파라기나제 II를 발현하지 않거나; 및/또는 생물막 형성에 필요한 유전자의 결실 또는 방해를 포함하며; 및/또는 항생제 선택의 부재 하에 세포당 상당한 플라스미드 복제수를 적어도 저 내지 중-복제수 이상으로 유지하도록 추가로 변형되고; 치료제를 인코딩하는 유전자 발현 카세트를 전달하고 강력한 항종양 면역 반응을 촉진한다. 플라스미드는 인코딩된 치료제의 종양 미세환경으로의 분비를 촉진하기 위한 조절 서열을 포함한다.

[0458] **7.보체에 대한 내성의 향상**

[0459] 보체 시스템은 인간 숙주에서 렉틴 경로 또는 대체 경로(AP) 캐스케이드를 직접 활성화하는 침입하는 병원체에 대한 면역 방어의 제1 라인이다. 보체 시스템은 박테리아, 바이러스에 감염된 세포 및 기생충과 같은 병원체를 인식하고 죽이기 위해 내재성 면역 반응에서 기능하고 항체-매개 면역 반응에도 역할을 하는 30개 이상의 가용성 및 세포막 결합 단백질을 포함한다. 보체 캐스케이드의 활성화는 외래 미생물의 옵소닌화, 화학주성 펩타이드의 방출, 그리고 마지막으로 박테리아 세포막의 방해로 이어진다. 보체 시스템의 3개의 상동 당단백질인 C3, C4 및 C5는 보체 기능에서 중심 역할을 하고 다른 보체 구성요소와 상호작용한다. C3 및 C4에서 각각 생성된 C3b 및 C4b는 보체 캐스케이드의 활성화를 촉진하는 전환효소의 중요한 구성요소이다. C5의 절두 단편은 식세포의 감염 부위로의 이동을 유도하는 C5a 및 막 공격 복합체(MAC)의 형성 및 박테리아 용해를 개시하는 C5b이다(예를 들어, Ramu *et al.* (2007) *FEBS Letters* 581:1716-1720 참조).

[0460] 생존을 위해 병원체는 보체 활성화의 유해한 결과를 방지하는 전략을 개발하였다. 예를 들어, Ail/Lom 외막 단백질 계열의 구성원은 많은 병원체성 박테리아에 대한 보체 의존적 사멸로부터 보호한다. *와이. 엔테로콜리티카(Y. enterocolitica)* 및 *와이. 슈도투베르쿨로시스(Y. pseudotuberculosis)*와 같은 *에르시니아(Yersinia)* 종의 Ail(부착 침입 좌위), *살모넬라* 종의 Rck(보체 살해에 대한 내성) 및 PagC, *에스케리키아 콜라이*의 OmpX를 포함하는 Ail/Lom 계열의 구성원은 중요한 아미노산 서열 유사성과 동일성을 공유하고 유사한 막 토폴로지를 갖는 외막 단백질이다. 이 단백질 계열의 구성원은 다양한 기능을 나타내지만, *와이. 엔테로콜리티카* 및 *와이. 슈도투베르쿨로시스*의 Ail 및 *에스. 엔테리카(S. enterica)*의 Rck를 포함한 이러한 중 일부는 적어도 부분적으로 보체-매개 용해로부터 박테리아를 보호하는 기능을 한다(예를 들어, Bartra 등 (2008) *Infection and Immunity* 76:612-622 참조).

[0461] 보체를 피하거나 완화하는 데 도움이 되는 또 다른 박테리아 생성물은 *살모넬라*에서 PgtE(외막 세린 프로테아제)로 표기된 표면 프로테아제 및 다른 옴틴 계열 구성원이다. *에스. 엔테리카*의 표면 프로테아제 PgtE는 장내박테리아 외막 아스파르테이트 프로테아제의 옴틴 계열에 속한다. PgtE 및 다른 옴틴은 활성을 위해 거친 LPS를 필요로 하지만 O-항원에 의해 입체적으로 억제된다. 대식세포 내부에서 *살모넬라*가 증식하는 동안 pgtE의 발현이 상향조절되고, 대식세포에서 방출된 박테리아는 강력한 PgtE-매개 단백질 분해 활성을 나타낸다. PgtE는 포유동물 혈장 전구효소 플라스미노겐을 플라스민으로 단백질 분해적으로 활성화하고, 플라스민의 주요 생리학적 저해제인 알파 2-항플라스민을 비활성화하고, 인간 세포의 세포외 기질에 대한 박테리아 부착을 매개한다. 이러한 방식으로, PgtE는 세포외 기질 성분의 분해를 매개하고 세포외 기질을 가로질러 *살모넬라*의 이동을 촉진할 수 있는 강력하고 국부적인 단백질 분해 활성을 생성한다. PgtE는 또한 *살모넬라*의 세포내 성장 동안 중요할 수 있는 알파-나선형 항균 펩타이드를 분해한다. *에르시니아 페스티스*의 옴틴 Pla는 PgtE의 가까운 이종상동체이며 PgtE와 기능을 공유한다. Pla는 C3를 절단하고 PgtE는 보체 성분 C3b, C4b 및 C5를 절단하여 *살모넬라*의 혈청 내성을 증가시킨다. 다른 박테리아 종으로부터의 유전자 pgtE, 및 이의 이종상동체는 보체에 대한 내성을 증가시키기 위해 본원의 면역자극성 박테리아에 포함될 수 있다.

[0462] 인간 혈청에서 보체의 효과는 설치류 모델에서 종양을 효과적으로 콜로니화하는 것으로 나타난 *살모넬라* 균주 VNP20009와 같은 치료 면역자극성 박테리아의 실패를 설명한다는 것이 여기서 보여진다. VNP20009의 전신 투여

는 마우스 종양의 콜로니화를 초래하였으며(예를 들어, Clairmont 등 (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002; 및 Bermudes 등 (2001) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18:219-33); 반면에 인간 환자에서 VNP20009의 전신 투여는 콜로니화를 거의 초래하지 않았다. 진행성 흑색종 환자에 대한 1상 연구에서, 30분 정맥내 주입 후 인간 종양에서 매우 적은 VNP20009가 검출되었다(참조: Toso 등 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20:142-52). VNP20009의 더 긴 4시간 주입을 평가하는 후속 연구에 참여한 환자들도 종양 생검 후 검출 가능한 VNP20009의 부족을 보여주었다(Heimann 등 (2003) *J. Immunother.* 26:179-180 참조). 종양내 투여 후, VNP20009의 유도체의 콜로니화가 검출되었다(참조: Nemunaitis 등 (2003) *Cancer Gene Ther.* 10:737-744). VNP20009를 인간 종양에 직접 종양 내 투여하면 훨씬 더 높은 종양 콜로니화를 초래하여 인간 종양이 높은 수준에서 콜로니화될 수 있고 마우스와 인간 간의 종양 콜로니화의 차이는 전신 투여 후에만 발생함을 나타낸다.

[0463] 야생형 *에스. 티피무리움*에서 이전에 발생하는 것으로 알려지지 않았지만 VNP20009는 인간 보체에 의해 비활성화되며, 이는 VNP20009의 전신 투여 시 인간에서 관찰되는 낮은 종양 콜로니화를 설명한다. 본원에 제공된 균주는 보체에 대한 내성을 나타낸다. 이는 *에르시니아 엔테로콜리티카*의 Ail 또는 *살모넬라 티피무리움*의 PgtE와 같이 보체 내성 또는 회피 매개에 관여하는 Rck 및 다른 단백질을 발현하도록 변형될 수 있으며, 또는 이러한 단백질을 천연적으로 발현하는 경우 Rck 및/또는 다른 이러한 단백질을 과발현하도록 변형될 수 있다. Rck는 상동체가 없는 이. 콜라이와 같은 박테리아에 도입될 수 있다.

[0464] ***Rck* 발현**

[0465] Rck(보체 사멸에 대한 내성)는 *에스. 엔테리티디스* 및 *에스. 티피무리움*과 같은 살모넬라 종의 큰 독성 플라스미드에 의해 인코딩된 17 kDa 외막 단백질로, 상피 세포에 대한 부착 및 침입을 유도한다. Rck 단백질은 C9 중합 및 기능성 막 공격 복합체의 후속 조립을 저해함으로써 보체로부터 *에스. 엔테리카*를 보호하는 것으로 나타났다. rck 돌연변이는 야생형 균주와 비교하여 상피 세포 침윤에서 2-3배 감소를 나타내는 반면, 야생형 균주에서 rck 과발현은 침습을 증가시킨다. Rck 단백질은 수용체-매개 과정에 의해 세포 진입을 유도하여 국소 액틴 리모델링 및 약하고 밀접하게 부착된 막 확장을 촉진한다. 따라서 *살모넬라*는 T3SS-1 복합체에 의해 매개되는 트리거(Trigger) 기전과 rck에 의해 유도되는 지퍼(Zipper) 기전이라는 두 가지 별개의 기전에 의해 세포에 들어갈 수 있다(예를 들어, Manon *et al.* (2012), *Salmonella*, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364). 살모넬라 독성 플라스미드에 대한 rck의 발현은 막 공격 복합체의 형성을 방지함으로써 인간 보체에 의한 중화에 대한 높은 수준의 내성을 부여한다. rck를 함유하는 *에스. 티피무리움* 독성 플라스미드가 혈청 민감도가 높은 이. 콜라이 균주에서 발현되었을 때, Rck는 보체 내성을 회복할 수 있었다.

[0466] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 인간 보체에 대한 내성을 부여하기 위해 Rck를 보유하거나 제공된다. *이. 콜라이*와 같은 면역자극성 박테리아는 박테리아의 플라스미드 상의 rck를 인코딩함으로써 변형되어 보체에 대한 내성을 부여할 수 있다는 것이 본원에서 제시된다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 내인성으로 rck를 인코딩하거나, 보체에 대한 내성을 증가시키기 위해 이를 인코딩하도록 변형될 수 있다. 보체에 내성을 부여하는 방법도 제공된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2018/0325963 및 2018/0273956, 및 미국 특허 번호 9,889,164 및 9,688,967에 기재된 치료용 *이. 콜라이* 종은 플라스미드 상의 *살모넬라 rck* 유전자를 인코딩하는 핵산을 도입하여 이에 의해 보체에 대한 내성을 개선하거나 제공하는 것과 같이 내부에 있는 박테리아를 변형함으로써 개선될 수 있다. 보체에 내성이 있는 균은 전신 투여가 가능하며, 충분한 균이 생존하여 치료 효과가 있을 수 있다.

[0467] *살모넬라 rck* 유전자를 인코딩하는 핵산은 치료용 *이. 콜라이*와 같은 박테리아에 도입되어 보체 내성을 부여하거나 증가시킨다.

[0468] 다른 박테리아 종으로부터의 *rck*의 다른 이종상동체 및 상동체는 유사하게 면역자극성 박테리아에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Ail은 *에르시니아 엔테로콜리티카*의 Rck 상동체로, 이종성 발현 하에서 보체 내성을 향상시킨다. PgtE는 *에스. 티피무리움* 표면 프로테아제로 이종성 발현 하에서 보체 내성을 향상시키는 것으로 나타났다.

[0469] **8. *살모넬라* 및 다른 그람-음성 박테리아에서 지질단백질 발현에 필요한 유전자의 결실**

[0470] LPS 및 브라운(무레인) 지질단백질(Lpp)은 염증 및 면역 반응의 강력한 자극제로서 기능하는 그람 음성 장내 박테리아의 외막의 주요 구성요소이다. 브라운(무레인) 지질단백질(Lpp)은 *에스. 티피무리움*에서 가장 풍부한 외막 성분 중 하나이며, TNFα, IL-6 및 IL-8(인간에서)과 같은 전염증성 사이토카인의 TLR2 유도를 초래한다. 살모넬라의 박테리아 염색체에 위치한 지질단백질 유전자(lppA(SEQ ID NO: 387) 및 lppB(SEQ ID NO: 388))의 두 기능적 사본은 박테리아 독성에 기여한다. lppA 및 lppB 유전자의 결실 및 지질단백질 발현의 제거는 독성을 감

소시키고 전염증성 사이토카인 생성을 감소시킨다(예를 들어, Sha 등 (2004) *Infect. Immun.* 72(7):3987-4003; 및 Fadl 등 al.(2005) *Infect.Immun.* 73(2):1081-1096 참조). Lpp 유전자의 결실은 세포 감염을 감소시켜 플라스미드 전달 및 인코딩된 치료 생성물 또는 단백질의 발현을 감소시킬 것으로 예상된다. 그러나, 하기 실시예 18에 나타낸 바와 같이, 이러한 유전자의 결실은 종양 콜로니화를 감소시키는 반면, 표적 세포, 즉, 종양-체류 면역 세포, 특히 대식세포에 전달되는 플라스미드의 양은 유의하게 증가하였다. 본원에 나타난 바와 같이, 이러한 유전자(*lppA* 및 *lppB*)의 결실 또는 방해는 감염된 대식세포에서 생존할 수 없기 때문에 독성을 감소시켰지만 면역자극성 박테리아의 플라스미드 전달을 증가시켜, 표적 세포, 즉 종양-체류 면역 세포, 특히 대식세포에서 인코딩된 치료 유전자의 발현을 증가시켰다.

[0471] 본원에 제공된 균주는 *△FLG*(편모 결여) *및/또는 △pagP 및/또는 △ansB 및/또는 △csgD*이다. 또한 균주는 *△purI(△purM), △msbB 및 △asd*(박테리아 게놈에서) 중 하나 이상이다. 예시적인 균주는 *△asd* 대신에 *△purI (△purM), △msbB, △pagP, △ansB, △asd,* 또는 *△ThyA*이다. 균주는 또한 $lppA^-$ 및/또는 $lppB^-$, 특히 $lppA^-/lppB^-$일 수 있다. 플라스미드는 숙주 인식 프로모터(예를 들어, 진핵생물 프로모터, 예를 들어 진핵생물 및 동물 바이러스의 것을 포함하는 RNA 중합효소 II 프로모터)의 제어 하에 치료 생성물을 인코딩하도록 변형된다. 플라스미드는 생체내 박테리아 복제를 허용하도록 asd를 인코딩할 수 있고, 다른 유익한 기능(예를 들어, CpG)을 갖는 핵산을 인코딩할 수 있고, 본원의 다른 곳에서 설명된 바와 같이 유전자 생성물을 인코딩할 수 있다.

[0472] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 예를 들어 편모를 제거함으로써 상피 세포를 감염시키는 능력을 제거하도록 변형될 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 상피 세포를 감염시키는 능력의 제거는 또한 SPI-1 경로에 관여하는 하나 이상의 유전자의 비활성화 또는 넉아웃을 통해 SPI-1 의존성 침입을 비활성화함으로써 달성될 수 있다. 이러한 유전자는 하기 중 하나 이상을 포함하지만 이로 제한되지 않는다*: avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, iacP, iagB, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB*, and *sptP*. 추가로 또는 대안적으로, 면역자극성 박테리아는 유전자 *fljB, fliC, rck, pagN, hlyE, pefI, srgD, srgA, srgB,* 및 *srgC* 및/또는 면역자극성 박테리아는 *fljB, fliC, prgI*(바늘 단백질) 및 *prgJ*(간상체 단백질)를 포함하여 인플라마솜에 의해 직접 인식되는 단백질을 인코딩하는 유전자와 같은 종양-체류 면역 세포의 세포 사멸을 유도하는 유전자의 생성물을 비활성화하기 위해 넉아웃 또는 결실을 포함할 수 있다. *rck* 유전자는 보체에 의한 비활성화로부터 박테리아를 보호하기 때문에 바람직하다. 내인성으로 *rck*를 인코딩하지 않는 박테리아는 이종성 *rck* 유전자를 인코딩하도록 변형될 수 있다.

[0473] 면역자극성 박테리아는 적절한 박테리아 균주에서 유래한다. 박테리아 균주는 약독화된 균주 또는 표준 방법에 의해 약독화된 균주일 수 있거나, 또는 본원에 제공된 변형으로 인해 이의 콜로니화 능력이 주로 면역특권이 있는 조직 및 기관, 특히 종양-체류 면역 세포, TME 및 고형 종양을 포함한 종양 세포로 제한된다는 점에서 약독화된 균주일 수 있다. 박테리아는 예를 들어, *살모넬라, 시겔라, 리스테리아, 이. 콜라이,* 및 *비피도박테리아*의 균주를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 종은 *시겔라 소네이(Shigella sonnei), 시겔라 플렉스네리(Shigella flexneri), 시겔라 디센테리애(Shigella dysenteriae), 리스테리아 모노사이토게네스, 살모넬라 티피, 살모넬라 티피무리움, 살모넬라 갈리나룸(Salmonella gallinarum),* 및 *살모넬라 엔테리티디스*를 포함한다. 다른 적합한 박테리아 종은 *리케치아, 클레브시엘라, 보르데텔라, 네이쎄리아, 애로모나스, 프란치셀라, 코리네박테리움, 시트로박터, 클라미디아, 해모필루스, 브루셀라, 미코박테리움, 미코플라즈마, 레지오넬라, 로도콕커스, 슈도모나스, 헬리코박터, 비브리오, 바실러스*, 및 *에리시펠로트릭스*를 포함한다. 예를 들어, *리케치아 리케치이(Rickettsia rickettsii), 리케치아 프로와제키이, 리케치아 쯔쯔가무시, 리케치아 무세리, 리케치아 시비리카, 보르데텔라 브론키셉티카, 네이쎄리아 메닌지티디스, 네이쎄리아 고노로애, 애로모나스 유크레노필라, 애로모나스 살모니시다, 프란치셀라 툴라렌시스, 코리네박테리움 슈도투베르쿨로시스, 시트로박터 프룬디이, 클라미디아 뉴모니애, 해모필루스 솜누스, 브루셀라 아보르투스, 미코박테리움 인트라셀룰라레, 레지오넬라 뉴모필라, 로도콕커스 에퀴, 슈도모나스 애루기노사, 헬리코박터 무스텔래, 비브리오 콜레라, 바실러스 서브틸리스), 에리시펠로트릭스 루시오파시애, 예르시니아 엔테로콜리티카, 로칼리마애 퀸타나*, 및 *애그로박테리움 투메르파시움*을 포함한다.

[0474] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 예는 살모넬라 종이다. 본원에 기재된 변형을 위한 박테리아의 예는 수탁번호 #14028로서 American Type Culture Collection(ATCC에 기탁된 균주의 식별 특성을 모두 갖는 균주와 같은 살모넬라의 야생형 균주이다. 균주 YS1646(ATCC 카탈로그 번호 202165, VNP20009로도 지칭됨; 또한 국제 PCT 출원 공개 번호 WO 99/13053 참조)과 같은 *살모넬라 티피무리움*의 조작된 균주는 플라스미드로 조작되어 *asd* 유전

자 넉아웃을 보완하고 무항생제 플라스미드 유지를 가능하게 한다. 그 후에, 균주는 플라젤린 유전자를 결실시키고/시키거나 *pagP*를 결실시키도록 변형된다. 편모 넉아웃과 *pagP* 결실의 조합은 균주가 인간 혈청 보체에 대해 높은 내성을 갖도록 한다. 균주는 또한 퓨린, 특히 아데노신에 대해 영양요구성이 되며 *asd*⁻ 및 *msbB*⁻이다. 예시된 바와 같이, *purI* 및 *msbB* 유전자가 완전히 결실된 균주는 이러한 유전자가 결실되지 않았지만 발현을 제거하도록 변형된 균주 VNP20009보다 더 적합(더 빠르게 성장)하다. *asd* 유전자는 진핵 숙주에서 *생체내* 복제를 위해 플라스미드 상에 제공될 수 있다. 균주는 또한 *ansB* 유전자에 결실, 방해 또는 다른 변형과 같은 변형이 있어 면역억제성 L-아스파라기나제 II 생성을 방지하고 종양 T-세포 기능을 개선한다. 균주는 또한 csgD 결실와 같은 생물막 생성을 제거하도록 변형되어 컬리 핌브리애, 셀룰로스 및 c-디-GMP를 생성할 수 없게 하여 원치 않는 염증 반응을 줄이고 생물막 형성을 방지한다.

[0475] 이들 게놈 결실 및 플라스미드는 본원의 다른 곳에서 기재되고 예시된다. 본원의 다른 곳에서 기재되고/되거나 당업자에게 알려진 면역자극성 단백질 및 다른 생성물과 같은 치료 생성물을 인코딩하는 핵산은 플라스미드에 포함될 수 있다. 플라스미드는 일반적으로 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이 저-복제수 내지 중-복제수로 존재한다. 치료 생성물에는 유형 I IFN 발현을 항시적으로 유발/유도할 수 있는 세포질 DNA/RNA 센서의 기능-획득 돌연변이와 종양 미세환경에서의 면역 반응에서 항종양을 촉진하는 사이토카인, 케모카인 및 공동자극성 분자와 같은 다른 면역자극성 단백질 및 본원에 기재된 다른 이러한 생성물이 포함된다. 플라스미드는 또한 면역 체크포인트 및 다른 암 표적(예를 들어, VEGF, IL-6 및 TGF-β) 및 다른 분자, 예를 들어 이중특이적 T-세포 연계자 또는 BiTEs®를 표적화하는 항체 및 이의 단편(예를 들어, 단일 사슬 항체)을 인코딩할 수 있다. 플라스미드는 또한 IL-6 결합 유인 수용체, TGF-베타 결합 유인 수용체, 및 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제를 인코딩할 수 있다.

[0476] **9.게놈이 항종양 요법을 위해 최적화되고 복수의 생성물을 포함하여 치료 생성물을 인코딩하는 강력한 면역자극성 박테리아**

[0477] 본원에 기재된 바와 같이, 아데노신에 대해 영양요구성이 되도록 조작되며; LPS의 변형 및/또는 플라젤린의 결실에 의해 전염증성 사이토카인을 유도하는 능력이 감소되며; 그리고/또는 T-세포 기능을 향상시키기 위해 L-아스파라기나제 II 발현의 결실 또는 제거에 의해 변형되며; 그리고/또는 생물막 형성에 필요한 유전자의 결실 또는 방해에 의해 변형되며; 그리고/또는 증가된 *rck* 발현으로 인해 증강된 인간 혈청 생존을 실증하도록 조작된 박테리아 균주, 예를 들어 *에스. 티피무리움* 균주는 치료 생성물, 예컨대 면역조절 단백질을 전달하고 강력한 항종양 반응을 촉진하도록 추가로 변형된다.

[0478] 아래 표는 대응 유전자가 다른 박테리아 종에서 변형될 수 있는 *살모넬라* 유전자를 참조로 하여 박테리아 유전자형/변형, 이의 기능적 효과, 및 본원에서 달성되는 일부 효과/이점을 요약한다.

유전자형/변형	기능적 효과	효과/이점
Δ*asd* (게놈에서)	플라스미드 유지	플라스미드 전달을 향상시킴 플라스미드 상에서 *asd* 카세트를 통해 생체내에서 플라스미드를 유지함
Δ*purI*	퓨린/아데노신 영양요구성	종양-특이적 농화 건강한 조직에서 제한된 복제
Δ*msbB*	LPS 표면 코트 변형	TLR4 인식을 저하시킴 면역억제성 사이토카인 프로파일(TNF-α)을 감소시킴 안전성을 향상시킴 세포내 복제를 방지함
Δ*fliC*/Δ*fljB* (ΔFLG)	편모 넉아웃	주요 염증성 및 면역억제성 요소를 제거함 – 치명적인 인플라마좀 활성화 TLR5 인식을 무효화함 유형 I IFN의 억제를 포함하여 면역억제성 사이토카인 프로파일을 감소시킴

[0479]

유전자형/변형	기능적 효과	효과/이점
		안전성을 향상시킴 비-식세포성 세포(예를 들어, 기질 세포 및 종양 세포)를 침범하는 능력을 감소시킴
Δ*pagP*	LPS 표면 코트 변형	유형 I IFN의 억제를 포함하여 주요 염증성 및 면역억제성 요소를 제거함 TLR4 인식을 저하시킴 IL-6 생성을 감소시킴 안전성을 향상시킴
Δ*ansB*	L-아스파라기나제 II 넉아웃	종양 T-세포 기능을 증강시킴
Δ*csgD*	컬리 핌브리애를 제거함, 셀룰로스 생성, c-디-GMP	유형 I IFN의 IL-10 억제를 포함하여 염증을 감소시킴, 가능한 생물막 형성을 방지함 식세포 흡수를 증강시킴
플라스미드	숙주-인식 프로모터의 제어 하에 유전자 생성물을 발현함	진핵생물 프로모터는 플라스미드를 함유하는 세포에 대한 발현을 제한함 TME에서의 장기간 발현(즉, 숙주-인식 프로모터의 제어 하에 플라스미드 상에서 인코딩된 *asd*) 능력이 큰 치료 생성물(들)의 임의의 조합의 발현

[0480]

[0481] **10.진핵 숙주에서의 발현을 위해 mRNA 및 다른 형태의 RNA를 포함한 RNA를 전달하는 백신 및 박테리아**

[0482] **RNA에 대한 전달 비히클로서의 면역자극성 박테리아**

[0483] 인코딩된 이종성 RNA를 함유하거나 발현하는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 여기서 박테리아는 진핵 숙주 세포를 감염시키고 인코딩된 RNA를 숙주 세포의 세포질 내로 방출시킨다(예를 들어, 미국 특허 제7,390,646호 참조). RNA는 치료 생성물일 수 있거나, RNA는 숙주 세포 머시너리에 의해 치료 생성물로 번역된다. 이러한 생성물은, T-세포 반응, 기억 T-세포 및 항체를 포함한 면역 반응을 유도하기 위한 제시를 위해 세포, 예컨대 식세포에서 발현될 수 있는 병원체로부터의 면역자극성 단백질 및 항원 및/또는 종양 항원을 포함한다. 면역화를 위해, 박테리아는 부위로 또는 병원체의 천연-발생 경로와 동일한 경로에 의해, 예컨대 호흡기 바이러스의 경우 흡입 또는 비내 투여, 위 및 장 병원체의 경우 경구 투여, 예컨대 바이러스의 경우 근육내 투여, 및 또한 전신 경로에 의해 투여될 수 있다. 이는 일생의 면역을 제공할 수 있는 현장에서 면역 반응을 초래할 수 있다.

[0484] 본원에 제공된 임의의 면역자극성 박테리아는 이러한 박테리아가 예컨대 시험관내에서의 *세포 배양* 동안, 또는 숙주 진핵 세포 내로의 박테리아 세포의 진입 후, 또는 시험관내에서의 세포 배양 동안과 숙주 진핵 세포 내로의 박테리아 세포의 진입 후 둘 다에서, 시험관내에서 박테리아 세포 내에서 외인성 또는 이종성 RNA를 생산하도록 변형될 수 있다. 진핵 숙주 세포의 감염 후, 박테리아는 외인성 RNA를 숙주 세포의 세포질 내로 방출시킨다. RNA는 박테리아에서 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있고, 복수의 치료 생성물을 인코딩할 수 있다. 특히, 전달되는 RNA 형태는 진핵 세포 머시너리에 의해 번역될 수 있는 임의의 형태이다. 이는 mRNA, 긴 비코딩(long non-coding) RNA, RNAi, dsRNA, 원형 RNA(eRNA; 예를 들어, 미국 특허 제10,953,033호 참조)를 포함한다.

[0485] 인코딩된 이종성 RNA를 함유하거나 발현하는 면역자극성 박테리아 및 게놈적으로-변형된 박테리아가 제공되며, 여기서 박테리아가 진핵 숙주 세포를 감염시킬 때, 인코딩된 RNA, 예컨대 mRNA가 숙주 세포의 세포질 내로 방출된다. 박테리아는 본원에 제공된 임의의 면역자극성 박테리아, 특히 이러한 박테리아가 감소된 TLR2, TLR4, 및 TLR5 신호전달을 갖게 되는 게놈 변형을 포함하는 것을 포함한다. 박테리아는 또한 치료 생성물 또는 이의 복수를 인코딩할 수 있고, 특히 사이토카인 및 본원에 제공된 변형된 STING 단백질을 포함한 STING 단백질을 포함한 면역자극성 단백질을 인코딩하며, 이는 RNA가 백신화를 위한, 또는 면역 자극이 유리한 치료를 위한 항원 또는 단백질을 인코딩하고 있다면 아쥬반트로서 작용할 수 있다.

[0486] RNA를 인코딩하는 핵산은 이것이 박테리아에서 전사되지만 번역되지는 않도록 변형된다. 이는, 전사된 RNA 생성물이 원핵 리보솜에 의해 인식되지 않거나 번역될 수 없도록 핵산을 설계함으로써 수행될 수 있다. 인코딩 핵산은 추가로, 전사체가 진핵 리보솜, 예컨대 인간과 같은 숙주에 존재하는 것에 의해 인식되고 번역되도록 설계된다. 이는 예를 들어, 원핵 리보솜에 의해 인식되지 않지만 진핵 리보솜에 의해 인식되는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 인코딩하는 핵산을 포함함으로써 수행될 수 있다. 인코딩된 RNA는 전형적으로 mRNA이지만, 치료 생성물이나 면역화 항원 또는 단백질로 변역될 수 있는 다른 형태의 RNA일 수 있다. 다른 형태의 RNA는 원형 RNA인 eRNA를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. eRNA는: (a) 폴리펩타이드, 예컨대 항원을 인코딩하는 발현 서열을 함유하며; (b) 원핵 리보솜에 의해 인식되지 않는 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 및 종결 요소를 함유하고; (c) 폴리-A 서열, 자유(free) 3' 단부, 및 RNA 폴리머라제 인식 모티프가 결여된 원형 폴리리보뉴클레오타이드이다(예를 들어, 이러한 원형 RNA를 기재하는 미국 특허 제10,953,033호 참조). 박테리아는 전사된 RNA가 생체내에서 고리화되도록 변형된다.

[0487] RNA는 치료 생성물일 수 있거나, RNA는 숙주 세포 머시너리에 의해 치료 생성물로 번역된다. RNA는 항원을 인코딩할 수 있으며, 이로써 이는 숙주 세포 내로 전달될 때 단백질로 인코딩되어, 항원, 및 항원이 유래되는 병원체 또는 종양에 대해 숙주를 면역화시킨다. 핵산은, 인코딩된 항원이 예컨대 항원의 회전배열을 안정화시킴으로써 변형되어 면역화를 위해 이의 특성을 향상시키도록 변형될 수 있으며, 이러한 항원에 대해 항체 및 다른 적응 면역 반응이 유도된다. 이는 예를 들어, 코로나 바이러스 상의 스파이크 단백질에 대해 수행되어 왔으며, 따라서 숙주 세포 수용체에 결합하는 회전배열이 안정화되어 더 강력한 항체 반응을 초래한다.

[0488] 본원에 제공된 임의의 면역자극성 박테리아는 이러한 박테리아가 예컨대 시험관내에서의 세포 배양 동안, 또는 숙주 진핵 세포 내로의 박테리아 세포의 진입 후, 또는 시험관내에서의 세포 배양 동안과 숙주 진핵 세포 내로의 박테리아 세포의 진입 후 둘 다에서, 시험관내에서 박테리아 세포 내에서 외인성 또는 이종성 RNA를 생산하도록 변형될 수 있다. 진핵 숙주 세포의 감염 후, 박테리아는 외인성 RNA를 숙주 세포의 세포질 내로 방출시킨다. RNA는 박테리아에서 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있고, 복수의 치료 생성물을 인코딩할 수 있다.

[0489] RNA를 인코딩하는 핵산은 박테리아에 의해 인식되는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 박테리아는 프로모터, 예컨대 박테리아 프로모터, 또는 파지 T7 RNA 폴리머라제에 의해 인식되는 박테리오파지 프로모터를 인식하는 RNA 폴리머라제를 인코딩하도록 변형된다. RNA는 mRNA, 또는 진핵 숙주 세포에서 발현을 위해 조절 서열을 함유하는 다른 RNA 분자일 수 있다. 프로모터는 유도적 프로모터일 수 있다. 박테리아는 인코딩된 RNA의

복수의 복사체를 함유할 수 있으며, 이는 진핵 숙주, 예컨대 인간 내로 도입될 때 숙주 세포 세포질 내로 방출되고, 여기서 이러한 RNA가 mRNA라면, 이는 번역될 수 있다. 박테리아 전사는 박테리아 번역으로부터 디커플링되며, 따라서 유전자 생성물은 전사되지만 번역되지는 않는다. 일부 구현예에서, IRES 서열을 포함하기 보다는, RNA를 인코딩하는 핵산은 출발 코돈의 업스트림에 샤인-달가노(SD) 서열이 결여되며, 이로써 RNA는 박테리아 또는 고세균 리보솜에 의해 번역될 수 없으나 진핵 리보솜에 의해서는 번역될 수 있다. RNA는 서열, 예컨대 코작 서열을 진핵 리보솜에 의해 인식되는 출발 코돈과 함께 함유할 수 있다. 샤인-달가노 서열은 예를 들어 SEQ ID NO: 389-392를 포함한다:

[0490]

(1) ...AUAAAGGAGGUAAAUA

(2) ...AUAAAGGAAAUAAAUA

(3) ...AUAACAGAGGUAAAUA

(4) ...AUAACAGGAGUAAAUA

샤인-달가노

[0491] (예를 들어, parts.igem.org/File:RBSAlignedSpacing.png 참조). RNA는 또한, 원핵 리보솜에 의한 번역을 차단하거나 저해하는 하나 이상의 내부 리보솜 진입 부위(들)(IRES)를 함유할 수 있다. 그러므로, RNA는 골수성 세포를 감염시키거나 감염시켰던 박테리아에서 생산되어, RNA를 골수성 세포로 전달하고, 여기서 이러한 RNA가 mRNA라면, 이는 샤인-달가노 서열, 또는 IRES, 또는 다른 이러한 조절 서열때문에 번역을 위해 RNA를 인식하는 골수성 세포에서 번역된다. 예를 들어, IRES를 프로모터와 유전자 서열 사이에 삽입하는 것은 전사를 번역으로부터 디커플링시킨다. 그러므로, 면역자극성 박테리아는 RNA 전달 시스템으로서 역할을 한다.

[0492] 구현예에서, 박테리아 시스템, 예컨대 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 유전적 페이로드를 조직-체류 및/또는 종양-체류 골수성 세포로 전달하는 데 사용된다. 이러한 맥락에서, 박테리아는 생체내에서 투입되며; 박테리아는 예를 들어, *asd*⁻이고, 보완 asd 유전자 카세트를 함유하는 플라스미드를 포함하지 않으며, 따라서 이는 생체내에서 복제될 수 없다. 박테리아를 성장시키기 위해, 이는 시험관내에서 배양된다; 디아미노피멜산(DAP)은 배양 배지에 첨가되어, 기능적 *asd* 유전자의 부재 하에 박테리아 복제를 용이하게 한다. 이러한 맥락에서, 이러한 면역자극성 박테리아가 투여될 때, 핵산의 하나의 볼루스(bolus)가 조직-체류 또는 종양 체류 골수성 세포로 전달된다. 박테리아의 포식작용 및 세포내 파괴 후, 치료 생성물(들)을 인코딩하는 RNA가 번역을 위해 골수성 세포의 세포질 내로 방출되어, 감염된 세포가 종양-체류 골수성 세포일 때 골수성 세포로부터 주변 환경, 예컨대 종양 미세환경 내로 분비되는 치료 생성물(들)을 생산한다.

[0493] 시험관내에서 배양된 박테리아는 RNA를 인코딩하지만, RNA를 번역하는 데 필요한 신호/조절 서열, 예컨대 샤인-달가노 서열이 결여되거나, 인코딩 핵산은 원핵 리보솜에 의한 번역을 차단하거나 이를 제공하지 않으나, 진핵 리보솜에 의해 인식되는 서열, 예컨대 IRES를 함유하며, 따라서 박테리아는 mRNA를 생산하지만 번역하지는 않는다. 본원에 기재된 바와 같이 변형되며 따라서 조직-체류 또는 종양-체류 면역 세포, 특히 조직-체류 또는 종양-체류 골수성 세포를 감염시키거나 이에 축적되는 박테리아는 RNA를 골수성 세포에 전달하며, 여기서 이는 번역된다. 예컨대 원핵 프로모터의 제어 하에 발현되는 병원체 또는 종양으로부터의 항원을 인코딩하고/하거나 항바이러스 치료제를 인코딩하는 RNA를 포함한 임의의 RNA가 전달될 수 있다. 이러한 적용을 위해, 플라스미드는 더 높은 복제수(예를 들어, 150 이상의 복제수, 예컨대 200, 300, 400, 500 이상의 복제수, 예컨대 500 내지 700의 복제수)로 존재할 수 있으며, 따라서 다량의 RNA가 생산되고 골수성 세포에 전달된다.

[0494] 또한, 본원에 기재되고 예시되며 상기 논의된 바와 같이, 인코딩 및 조절 서열은 RNA가 박테리아에서 생산되도록 제조될 수 있으나, 인코딩 핵산은 박테리아 리보솜에 의한 번역을 저해하거나 방지하지만 진핵 숙주 리보솜에 의해 인식되고/되거나 이에 의한 번역을 증강시키거나, 촉진하거나 허용하는 조절 서열을 포함한다. 예를 들어, mRNA는 원핵 프로모터의 제어 하에 전사된다. IRES 서열은 전사체에 포함되며, 이는 원핵 박테리아에서 번역을 차단하지만, 진핵 숙주 세포 내로 전달될 때 진핵 리보솜에 의한 번역을 허용한다. 그러므로, 박테리아는 안정한(non-labile) mRNA 전달 시스템을 제공한다. 박테리아는 다량으로 성장될 수 있고, 그 후에 동결건조 또는 냉동되고/되거나 실온에서 보관될 수 있다. 이러한 박테리아는 정제 또는 분말로 제형화될 수 있거나 흡입을 위해 미분화될 수 있다.

[0495] 박테리아는 톨-유사 수용체(TLR) 2, 4 및 5에 의한 반응이 게놈 변형이 없는 박테리아와 비교하여 감소되도록 게놈-변형을 함유하는 것을 포함한다. 이러한 박테리아는 선택적으로, 박테리아가 필요한 영양소 또는 인자에

대해 영양 요구성이 되는 게놈 변형을 추가로 함유할 수 있으며, 따라서 이러한 박테리아는 진핵 숙주에서 복제할 수 없으나, 영양소 또는 인자와 함께 공급될 때 *시험관내에서* 복제할 수 있다. 이는 아데노신 생합성 결핍을 포함하며 이는 아데노신이 축적되는 종양 및 종양 미세환경을 갖는 암을 가진 대상체의 치료에 사용될 때 면역 억제를 감소시키는 부가 이점을 갖는다. 다른 결핍은 티민 합성 결핍, 예컨대 상기 섹션에서 기재되고 논의되며 아래에 예시된 *thyA*⁻를 포함한다.

[0496] 박테리아는 생성물을 인코딩하는 핵산을 함유하는 플라스미드를 함유하거나, 생성물을 인코딩하는 RNA를 포함한다. 플라스미드는, 저, 중 또는 고 복제수로 존재할 수 있다. RNA를 전달하는 데 사용될 때, 플라스미드는 고 복제수, 예컨대 150 이상의 복제수로 존재할 수 있다. 핵산 또는 RNA에 의해 인코딩된 생성물은 항원 서열 또는 병원성 바이러스, 박테리아, 기생충으로부터의 서열이거나, 종양 항원이며, 이로써 숙주에서 인코딩된 항원의 발현 시, 숙주는 병원성 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 대해 또는 종양 항원에 대해 면역보호 반응 또는 면역화 반응을 발달시키거나, 생성물은 숙주에 전달될 치료 생성물이다. 항원 서열(들)의 발현은 원핵 프로모터의 제어 하에 있어서, 항원(들)을 인코딩하는 RNA는 박테리아에서 생성되고, RNA 전달을 위해, 항원을 인코딩하는 핵산은 박테리아 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지만 진핵 숙주 리보솜에 의한 인코딩된 RNA의 번역을 저해하거나 방지하지 않는 조절 서열을 포함하며, 이로써 번역은 박테리아에서 전사로부터 디커플링된다. 게놈 변형으로 인해, 생성된 박테리아는 진핵 대상체에게 투여될 때 식세포를 감염시키고, 핵산을 RNA가 번역되는 식세포 내로 전달한다.

[0497] 식세포, 예컨대 대식세포를 감염시키도록 변형된 본원에 제공된 면역자극성 박테리아가 특히 흥미롭다. 특히, 임의의 적합한 종/속, 예컨대 살모넬라, 리스테리아 및 이. 콜라이일 수 있는 박테리아는 이것이 펜타-아실화된 지질 A와 함께 LPS를 생산하도록 변형되고, 편모가 결여되도록 변형되고, 컬리 핌브리애가 결여되도록 변형되는 것 중 하나 이상 또는 모두가 되도록 변형된다; 예를 들어, 박테리아는 *msbB*⁻/*pagP*⁻, 플라젤린⁻, 및 *csgD*⁻이다 (특정 종에서 각각의 인코딩 유전자 또는 등가 유전자에 의해 생성물이 생산되지 않거나 생산되더라도 비활성이 되도록 변형됨). 박테리아는 또한, 예컨대 이를 *asd*⁻로 만듦으로서 변형되어, 이는 DAP와 같은 적절한 영양소를 제공함으로써 시험관내에서 성장될 수 있으나, 이는 진핵 숙주에서 복제되지 않고 궁극적으로는 mRNA가 진핵 세포에 전달될 때 사멸된다. 박테리아는 또한, 본원에 기재된 바와 같이 추가의 페이로드, 예컨대 변형된 STING 단백질 및/또는 사이토카인(모두 본원 어디에서나 기재되고 나열된 바와 같음)을 인코딩할 수 있으며, 이는 숙주 면역계을 자극시키는 역할을 하여 아쥬반트로서 작용한다. 이러한 생성물은 본원 개시내용 전반에 걸쳐 기재된 바와 같이 박테리아에서 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있고, 항원을 인코딩하는 mRNA와 함께 다시스트론성 작제물 상에서 인코딩될 수 있고/있거나, 단백질로의 전사/번역을 위해 진핵 프로모터의 제어 하에 인코딩될 수 있다. 이러한 단백질은 전사를 위해 설계될 수 있거나, 적절하다면 이것이 제시를 위해 막에 앵커링되도록 변형될 수 있다. 면역자극성 박테리아, 예컨대 이. 콜라이는 이것이 인코딩되고 *rck*를 발현하여 보체에 대한 내성을 증가시키도록 변형될 수 있다.

[0498] **11. 항병원체 치료 및 백신으로 사용하기 위한, 그리고 항암 치료 및/또는 예방을 위한, 병원체 및 종양으로부터의 항원을 포함하는 특정 항원에 대한 박테리아 백신**

[0499] 백신은 질환에 걸리거나 장애 또는 암이 발생하는 것을 예방(위험 감소)하기 위해 또는 질환, 장애 또는 암 및 이의 조합에 대한 치료로서 사용될 수 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 및 다른 백신이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0500] 항종양 반응과 항바이러스 반응 사이의 면역 반응의 유사성 때문에, 본원에서 제공되는 면역자극성 박테리아는 또한 감염성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 박테리아는 바이러스 또는 박테리아 생성물의 저해제, 또는 바이러스 또는 박테리아 생성물의 발현 저해제, 또는 바이러스 또는 박테리아 항원과 같은 항바이러스 또는 항박테리아 치료제를 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아로부터의 면역 반응 및 치료적 항병원체 생성물, 및 또한 면역자극성 단백질 및 인코딩된 면역자극성 단백질에 대한 조합은 감염성 질환, 특히 바이러스 감염, 만성 바이러스 감염 및 잠복 바이러스 감염과 관련된 질환에 대한 백신화 및/또는 치료를 위한 치료적 면역자극성 박테리아를 제공한다. 관심 대상은 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 대상포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T 세포 백혈병 바이러스(HTLV), 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 홍역 바이러스 및 대상체를 만성적으로 감염시키는 다른 이러한 바이러스에 의한 감염과 같은 만성 바이러스 감염이다. 면역자극성 박테리아는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 및 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(COVID-19를 유발하는 SARS-CoV-2)와 같이 코로나바이러스 및 만성 인플루엔자에 의한 초기 감염과 같은 급성 감염의 치료에 사용될 수 있다. 면역자극성

박테리아는 바이러스 항원과 같은 병원체의 항원을 인코딩할 수 있으며 감염을 예방하거나 기존 감염을 치료하기 위한 백신으로 사용될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 T-세포와 같은 항원 제시 세포와 같은 면역 세포에 축적되는 능력으로 인해 바이러스에 대한 T-세포 반응을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 면역자극성 박테리아는 T-세포의 기능을 향상시켜 항바이러스 반응을 촉진하는 아스파라기나아제 II가 결핍되어 있다. 예를 들어 코로나바이러스의 경우 뉴클레오캡시드, M 및/또는 S 단백질의 항원과 같은 필수 바이러스 단백질의 항원과 같은 바이러스 항원의 발현 조합은 중화 항체, 및 장기 수명의 순환형 및 조직-체류 $CD8^+$ T 세포의 증강을 초래할 수 있고, 효과적인 백신 및 치료를 제공한다.

[0501] 결핵(TB)에 대한 바실러스 칼메트-게렝(BCG) 백신과 같은 불활성화 또는 약독화 백신과 같은 기존 백신의 효능은 아스파라기나제가 발현되지 않도록 게놈을 변형하여 면역 억제를 무효화함으로써 향상될 수 있다. BCG 백신 효과는 종종 감소한다. 이는 백신 박테리아가 분비하는 아스파라기나제때문에 T 세포의 활동을 감소시켜 면역억제 효과가 나타난다. 이는 아스파라기나제 활성을 감소시키거나 제거하기 위해 박테리아를 변형함으로써 완화될 수 있다. 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 박테리아에 대한 TLR2 또는 TLR2/4/5 반응을 감소시키거나 제거하는 다른 변형은 TLR2, TLR4, TLR5 또는 다른 박테리아에 대한 톨-유사 수용체의 활성 또는 반응에 의한 I형 IFN의 임의의 차단 또는 저해를 무효화한다. 본원에 기재된 바와 같이, 박테리아에 대한 TLR의 반응은 I형 IFN을 차단하거나 저해할 수 있으며; 이러한 TLR의 반응을 제거함으로써 본원에서 박테리아의 변형은 이러한 바람직하지 않은 효과를 제거한다.

[0502] 상기 섹션에서 논의된 바와 같이, 면역자극성 박테리아는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제, 또는 면역화를 위한 항원을 인코딩할 수 있다. 이러한 치료제는 복제 및/또는 패키징에 필요한 단백질과 같은 바이러스 유전자 및 단백질의 저해제를 포함하거나, 면역자극성 박테리아는 바이러스가 표적 세포 내로 유입되는 것을 용이하게 하거나 제공하는 수용체 또는 수용체와 바이러스의 결합 또는 상호작용을 방지하는 치료제를 인코딩할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 단백질은 원핵 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 위 섹션에서 논의한 바와 같이 박테리아는 RNA를 전달하는 박테리아일 수 있다.

[0503] 위에서 논의한 바와 같이, 박테리아는 SARS-CoV, SARS-CoV-2, 인플루엔자 및 다른 병원체와 같은 병원체에 대한 백신화를 위한 mRNA를 포함하는 RNA를 전달하고 또한 항종양 요법을 위해 사용될 수 있다. 박테리아는 또한 면역자극제 또는 다른 면역계 증강제 또는 면역 체크포인트 단백질과 같은 면역저해제 저해제를 인코딩할 수 있다. 이의 예는 본원에서 제공되는 변형된 STING 단백질, 사이토카인 및 다른 이러한 면역 자극 단백질을 포함하는 STING 단백질이다. 종양을 치료하기 위한 결합된 페이로드를 포함하는 본원에 기재된 임의의 페이로드는 또한 박테리아에 의해 인코딩/전달될 수 있다. 항종양 반응과 항바이러스 반응은 비슷하다. 백신의 경우 면역자극 페이로드는 면역 반응을 향상시키는 아쥬반트 역할을 한다. 병원체 항원을 인코딩하는 핵산은 원핵생물 프로모터의 제어 하에 있다. 다른 페이로드는 또한 병원체 항원-인코딩 핵산을 갖는 폴리시스트론 작제물로서 제공될 수 있거나, 항-종양 치료제에 대해 본원에 기재된 바와 같이 진핵생물 프로모터의 제어 하에 인코딩될 수 있다.

[0504] 식세포에 페이로드를 전달하고 전달 특성을 향상시키는 다양한 게놈 변형을 함유하는 본원에 제공된 박테리아와 같은 박테리아는 RNA를 전달하는 데 사용될 수 있다. 박테리아는 RNA가 박테리아 세포질에 전달되고 유형 I IFN을 자극하는 아쥬반트를 포함하기 때문에 나노입자 및 다른 전달 비히클보다 우수한 비히클이다. RNA 전달을 위해 본원에서 제공되는 박테리아의 이점 중에는 하기와 같은 것이 있다: 1) "RNA 없이" RNA 전달을 가능하게 하는 박테리아 전달 비히클은 복잡한 RNA 안정성/제조에 대한 필요성을 제거한다; 2) 식세포 항원 제시 세포(APC)를 직접 표적화한다; 3) 유형 I IFN 아쥬반트 활성을 제공하는 페이로드의 포함을 허용한다; 4) 박테리아가 내인성 *asd* 활성을 불활성화하고 플라스미드에서 인코딩하지 않음으로써 박테리아를 asd^-로 만드는 것과 같이 박테리아가 진핵생물(예를 들어 인간) 숙주에서 복제되지 않도록 게놈 변형을 포함한다; 그리고 5) 편모 제거, LPS 변형, 생물막 형성 감소 또는 제거, 아스파라기나제 II 활성 제거와 같은 게놈 변형에 의한 불량 아쥬반트인 세균 생성물의 제거가 가능하다. 이러한 박테리아의 예는 $msbB^-/pagP^-$ 및 플라젤린-, 및 임의로 $ansB^-$, 및 $csgD^-$이며, purI 유전자의 완전한(깨끗한) 결실을 갖는다. 비히클로서의 박테리아는 또한 신속한 조작 및 배치를 허용한다; 박테리아는 쉽게 확장 가능하고 제조하기 용이하다; 복수의 상이한 RNA가 단일 세균에서 코딩될 수 있다; 그리고 박테리아는 안정적이며 실온에서 보관할 수 있고 동결건조할 수 있으며 비강내 전달 또는 흡입 전달 및 정맥 전달용으로 제형화할 수 있으며 다른 적합한 전달 경로를 위해 제형화할 수 있다. 일부 TLR2 활성을 유지하면 박테리아 $csgD^-$를 만드는 게놈 변형을 포함하여 내피 혈관 세포가 누출된다.

[0505] 항암 치료 생성물을 종양/종양 미세 환경으로 전달하기 위해 인코딩된 생성물은 분비 신호와 같은 트래피킹 신호에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 생성물은 또한 종양 상주 골수 세포 및 다른 식세포의 세포 표면과 같은 세포 표면에서의 발현을 위해 설계될 수 있다. 유전자 생성물은 막 고정되도록 변형될 수 있다. 예를 들어, IL-12는 C-말단에 막횡단 도메인을 추가하여 막 고정되도록 여기에서 변형되었다. 예를 들어, IL-2, IL-12, IL-12p35, IL-21, IL-15 및 FLT-3L을 포함하는 다른 단백질은 막관통 도메인 또는 GPI 앵커와 같은 다른 앵커 도메인을 추가함으로써 유사하게 변형될 수 있다. 박테리아에 감염된 세포의 막에 이러한 단백질을 고정하면 독성이 감소하여 전신적으로 분비되지 않고 종양 미세 환경에서 작용한다. 특히, 이러한 생성물 및 이의 조합을 인코딩하는 면역자극성 박테리아는 게놈 변형, 예를 들어 박테리아가 $msbB^{-}/pagP^{-}$가 되고 편모를 갖지 않게 하는 변형과 같은 게놈 변형을 갖는 것이고, 이로써 톨-유사 수용체(TLRs) 2, 4 및 5에 의한 반응은 게놈 변형이 없는 박테리아에 비교하여 감소된다.

[0506] **12.M2 표현형 대식세포로부터 M1 및 M1-유사 표현형 대식세포로의 전환**

[0507] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 대식세포에 축적되고/거나 대식세포를 표적으로 한다. 대식세포는 식세포 면역 세포이다. 이는 노화 세포 및 세포 사멸 세포를 제거하고 면역 관련 복합체 및 병원균의 식균 작용, 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 대식세포의 표현형과 기능은 미세환경에 의해 양극화될 수 있다. M1형(고전적으로 활성화된 대식세포)과 M2형(대체로 활성화된 대식세포)의 두 가지 유형이 있다.

[0508] M1 대식세포의 역할은 전염증성 사이토카인과 케모카인을 분비하고 항원을 제시하여 긍정적인 면역 반응에 참여하고 면역 모니터로서의 기능을 하는 것이다. M1 대식세포는 IL-6, IL-12 및 TNF-알파를 포함한 염증유발 사이토카인을 생성한다. M2 대식세포는 아르기나제 1, IL-10, TGF-β 및 다른 항염증성 사이토카인을 분비하여 염증을 감소시키는 기능을 하고 종양 성장 및 면역억제 기능에 기여한다. 따라서, 암 및 다른 이러한 질환 및 장애의 치료를 위해 M1 또는 M1-유사 표현형이 유리하다.

[0509] M2 대식세포는 M1 대식세포 또는 M1-유사 표현형을 갖는 대식세포로 전환될 수 있다. 대식세포를 감염시키는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 M2 대식세포를 M1 또는 M1-유사 표현형을 갖는 대식세포로 전환할 수 있다. M1 대식세포 표현형 마커에는 CD80(B7, B7.1 또는 BB1로도 알려짐), CD86(B7.2로도 알려짐), CD64(고친화도 면역글로불린 감마 Fc 수용체 I로도 알려짐), CD16 및 CD32(또한 저친화도 면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 IIb로 알려짐)가 있다. M1 대식세포에서 산화질소 합성효소(iNOS)의 발현도 표현형 마커로 작용할 수 있다. CD163 및 CD206은 M2 대식세포의 식별을 위한 마커이다. 아르기나제 1(Arg1) 및 DECTIN-1은 또한 M2 대식세포의 식별을 위한 이상적인 표현형 지표이다. 표현형 전환은 이러한 마커, 및/또는 대식세포 표현형의 특징인 다른 마커의 발현에 의해 모니터링되거나 평가될 수 있다.

[0510] 종양-연관 대식세포(TAM)는 면역억제성 M2 표현형과 관련이 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이러한 대식세포를 M1 또는 M1-유사 표현형을 갖는 대식세포로 전환할 수 있다. 유형 I 인터페론(IFN)의 발현을 유도하는 치료제를 인코딩하는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이러한 전환에 영향을 미칠 수 있다. 이는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 고유한 특성이며, 대식세포의 감염을 초래하는 게놈 변형을 포함하는 박테리아의 능력을 이용한다. 인코딩된 치료 생성물에는 STING 변이체(본원에 자세히 설명됨)와 같은 세포질 DNA/RNA 센서 경로의 일부인 생성물이 포함된다. 인코딩 면역자극성 박테리아는 종양-체류 대식세포의 감염 및 치료제(들)의 발현 시 M1 표현형(또는 M1-유사 표현형)으로의 감염된 대식세포의 전환에 영향을 미칠 수 있다. 대식세포 표현형을 전환하는 이러한 능력은 하기 실시예 12에서 입증되고 예시된다. 대식세포를 감염시키고 STING 단백질을 발현하는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 의한 변형된 STING 단백질의 발현은 M2 대식세포의 표현형을 M1-유사 표현형으로 전환시킨다.

[0511] 편모 및 LPS 변형의 제거와 같은 본원에 기재된 게놈 변형을 포함하는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 감염된 M2 대식세포를 M1 대식세포의 사이토카인 프로파일 특징 중 일부 또는 모두를 유도하는 것으로 전환시킨다. 인간 1차 M2 대식세포에서 항시적 유형 I IFN 발현을 초래하는 변이체 STING 단백질을 발현하는 면역자극성 박테리아는 이러한 세포를 M1-유사(M1 대식세포의 전형적인 표현형 마커 및/또는 발현 프로파일을 가짐) 유형 I IFN 생산 세포로 전환시킨다.

[0512] **D.종양 미세환경에서 면역 반응을 자극시키는 유전자 페이로드를 인코딩하는 증강된 치료 지수를 갖는 면역자극성 박테리아**

[0513] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 진핵 프로모터의 제어 하에 인코딩된 치료 생성물이 발현되는 종양 미세환경 및 종양-체류 골수성 세포에 축적되도록 변형된다. 박테리아는 면역계를 자극하고/하거나 종양의 면역억제

효과를 역전 또는 완화시키는 생성물을 포함하여 치료 생성물, 특히 항암 생성물을 인코딩한다. 본원에 기재된 바와 같이, 박테리아는 복수의 생성물을 인코딩할 수 있고, 여기서 각각의 생성물의 발현은 별개의 프로모터의 제어 하에 있거나, 생성물의 발현은 하나의 프로모터의 제어 하에 있고, 발현 카세트는 별개의 생성물의 발현을 초래하는 서열을 포함할 수 있으며, 적절한 경우 인코딩된 생성물이 종양 미세환경으로 분비되도록 하는 조절 서열을 포함한다. 면역자극성 박테리아는 플라스미드에 인코딩된 치료 생성물을 발현한다. 본원에 논의된 바와 같이, 플라스미드는 하나의 생성물 또는 이의 다수를 인코딩할 수 있다. 각각의 생성물은 다른 진핵생물 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있거나, T2A(서열 327), P2A(SEQ ID NO: 328), E2A(SEQ ID NO: 329), 및 F2A(SEQ ID NO: 330)와 같은 코딩 부분 사이에 2A 자가 절단 펩타이드를 포함하는 것과 같이 단일 프로모터의 제어 하에 다중 인코딩된 생성물이 발현될 수 있다. 인코딩된 생성물은 본원에 기재된 것을 포함하며, 활성이 상보적인 항암 면역 자극 생성물일 수 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 전신 투여되는 경우 너무 독성이 있는 다중 면역조절 생성물 또는 페이로드(다중화된 페이로드)의 조합 투여를 허용한다. 다중화된 페이로드의 예는 하나 이상의 사이토카인(들), 유형 I IFN의 발현을 자극하거나 유도하기 위한 면역자극성 단백질, 예컨대 증가된 활성을 갖거나 항시적으로 활성인 STING 또는 이의 변이체, 및 조작된 4-1BBL 공동자극성 분자와 같은 공동자극성 분자를 포함한다.

[0514] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 다중화된 페이로드 또는 단일 작용제 페이로드로 IV 투여한 후와 같은 치료의 제공을 포함하는 강력한 항종양 효과를 갖는다. 면역자극성 박테리아는 전신 투여될 때 고형 종양, TME 및 종양-체류 골수성 세포에 침투하여 농축되며, 여기서 인코딩된 치료제가 발현된 다음 종양 미세환경에 국소적으로 전달된다. 종양-체류 골수성 세포에 의한 소비(식균작용) 시, 박테리아는 종양-특이적 방식으로 이소성, 단일 또는 다중 페이로드 발현을 허용하는 유전자 페이로드-인코딩 플라스미드를 전달한다.

[0515] **1.면역자극성 단백질**

[0516] 본원에서 면역자극성 박테리아는 항종양 반응을 촉진하거나, 유도하거나, 증강시키는 하나 이상의 면역자극성 단백질을 인코딩하도록 변형될 수 있다. 보누언에 예시되고 기재된 바와 같이, 인코딩 핵산이 플라스미드 상에 배열되는 순서는 전반적인 발현을 향상시킬 수 있고, 플라스미드에 대한 변형, 예컨대 유전자의 완전 결실 또는 비활성화는 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 박테리아의 적합도를 향상시킬 수 있다.

[0517] 면역자극성 단백질(들)은 진핵생물 대상체, 특히 면역자극성 박테리아가 투여될 대상체, 예컨대 인간에서의 발현을 위해 진핵생물 프로모터, 예컨대 RNA 폴리머라제 II에 의해 인식되는 프로모터의 제어 하에 박테리아 내 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있다. 면역자극성 단백질(들)을 인코딩하는 핵산은 진핵생물 프로모터에 더하여, 세포에서의 발현 또는 트래피킹을 위해, 예컨대 세포 표면 상에서의 분비 또는 발현을 위해 다른 조절 신호를 포함할 수 있다.

[0518] 면역자극성 단백질은 적절한 환경, 예컨대 종양 미세환경 (TME)에서 면역자극성 박테리아가 투여되는 대상체에 의한 항종양 반응을 촉진하거나 이에 참여하거나 이를 증강시킬 수 있는 것이다. 면역자극성 단백질은 사이토카인, 케모카인, 및 공동자극성 분자를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 이는 사이토카인, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, IL-36γ, GM-CSF, IFNα, IFNβ, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, 및 IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2; 케모카인, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, 및 CXCL11; 및/또는 공동자극성 분자, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, CD40, CD40L, OX40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, 절두된 또는 결실된 세포질 도메인을 갖는 4-1BBL(4-1BBLΔCyt), TNF/TNFR 슈퍼계열의 구성원(예를 들어, CD27 및 CD27L), 및 B7-CD28 계열의 구성원(예를 들어, CD80, CD86, ICOS, 및 ICOS 리간드(B7RP1))을 포함한다.

[0519] 종양 치료에 사용되거나, 당업자에게 알려진, 항종양 반응을 촉진, 향상 또는 달리 증가 또는 유발시킬 수 있는 이러한 다른 면역자극성 단백질은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 인코딩하기 위해 고려된다. 예를 들어, 면역자극성 박테리아는 APC 상에서의 발현을 위해 전체 또는 부분 세포질 도메인 결실과 함께 절두된 공동자극성 분자(예를 들어, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 및 OX40L)를 인코딩하는 유전자 페이로드를 전달할 수 있으며, 여기서 절두된 유전자 생성물은 공동자극성 수용체 결합을 통해 T-세포에 대한 항시적 면역-자극 신호전달이 가능하고 결실되거나 절두된 세포질 도메인으로 인해 APC에 대한 역조절 신호를 할 수 없다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 예를 들어 4-1BBL의 변형된 절두된 세포질 도메인은 단백질의 발현을 증가시키는 단백질 도메인의 적절한 배향을 보장하기 위해 특정 잔기를 함유한다. 공동자극성 분자의 세포질 도메인의 결실(전체 또는 부분) 및 변형은 면역억제성 역 신호전달 없이 공동자극성 분자의 활성화를 강화시킨다.

[0520] a.사이토카인 및 케모카인

[0521] 일부 구현예에서, 본원의 면역자극성 박테리아는 면역계를 자극하여 예를 들어 IL-2, IL-7, IL-12, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-15:IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15Rα-IL-15sc), IL-18, IL-21, IL-23, IL-36ɣ, IL-2Ra에의 약화된 결합을 갖는 IL-2, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형되는 IL-2, IFN-α 및 IFN-β를 포함하지만 이로 제한되지 않는 사이토카인을 발현하하도록 조작된다. 사이토카인은 종양 부위에서 면역 이펙터 세포와 기질 세포를 자극하고 세포독성 세포에 의한 종양 세포 인식을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 면역자극성 박테리아는 예를 들어 CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 및 CXCL11과 같은 케모카인을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0522] IL-2

[0523] 암 치료용으로 승인된 최초의 사이토카인인 인터루킨-2(IL-2)는 세포독성 T 림프구(CTL) 성장의 활성화 및 촉진, 림포카인 활성화 킬러(LAK) 세포의 생산, 조절 T-세포(Treg 세포) 성장 및 증식의 촉진, 종양 침윤 림프구(TIL)의 자극, 및 T-세포, B 세포 및 NK 세포 증식 및 분화의 촉진에 관여한다. 재조합 IL-2(rIL-2)는 전이성 신세포 암종(RCC) 및 전이성 흑색종의 치료에 대해 FDA 승인을 받았다(예를 들어, Sheikhi 등 (2016) *Iran J. Immunol.* 13(3):148 -166).

[0524] IL-7

[0525] IL-2 슈퍼계열의 구성원인 IL-7은 T-세포의 생존, 증식 및 항상성에 연루되어 있다. IL-7 수용체의 돌연변이는 T-세포의 손실과 중증 복합 면역결핍 질환(SCID)의 발병을 초래하는 것으로 나타났으며, 이는 IL-7이 T-세포 발달에서 하는 중요한 역할을 강조한다. IL-7은 휴식 중인 미접촉 T-세포와 기억 T-세포에 지속적인 신호를 제공하고 림프구감소증 상태 동안 축적되어 T-세포 증식과 T-세포 레퍼토리 다양성을 증가시키는 항상성 사이토카인이다. IL-2와 비교하여 IL-7은 CD4+FOXP3+ 조절 T-세포보다 CD8+ T-세포를 확장하는 데 선택적이다. 재조합 IL-7은 백신화 및 생쥐의 입양 세포 치료 후 항원 특이적 T-세포 반응을 증가시키는 것으로 나타났다. IL-7은 또한 조혈모세포 이식의 화학요법 후 T-세포 회복을 촉진하는 역할을 할 수 있다. 진행성 악성종양 환자에 대한 초기 단계 임상 시험은 재조합 IL-7이 내약성이 우수하고 생물학적 활성 용량(즉, 순환하는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포의 수가 3-4배 증가하는 용량)에서 독성이 제한됨을 보여주었다(예를 들어, Lee, S. 및 Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856-3893 참조). IL-7은 신경교종, 흑색종, 림프종, 백혈병, 전립선암 및 교모세포종과 같은 종양에서 항종양 효과를 갖는 것으로 나타났으며 뮤린 모델에서 IL-7의 생체내 투여는 암세포 성장을 감소시켰다. IL-7은 또한 래트 신경교종 종양에서 IFN-ɣ의 항종양 효과를 향상시키고 단핵구에 의한 IL-1α, IL-1β 및 TNF-α의 생성을 유도하여 흑색종 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 추가로, 소아 육종의 치료 후 재조합 IL-7의 투여는 면역 회복의 촉진을 초래하였다(예를 들어, Lin 등 (2017) *Anticancer Research* 37:963-968 참조).

[0526] IL-12(IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35))

[0527] 세포-매개 면역을 촉진하는 생리활성 IL-12(IL-12p70)는 p35 및 p40 하위단위로 구성된 이종이량체인 반면, IL-12p40 단량체 및 동종이량체는 IL-12 길항제로서 작용한다. 항원 제시 세포에 의해 분비되는 IL-12는 NK 및 T-세포로부터 IFN-ɣ의 분비를 촉진하고, 종양 혈관신생을 억제하며, NK 세포, CD8+ T-세포 및 CD4+ T-세포의 활성화 및 증식을 초래하고, 미접촉 CD4+ T-세포의 Th1 세포로의 분화를 강화하고, 종양 세포에 대한 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 촉진한다. IL-12는 흑색종, 결장 암종, 유선 암종 및 육종의 쥐 모델에서 항종양 효과를 나타내는 것으로 나타났다(예를 들어, Kalinski *et al.* (2001) *Blood* 97:3466-3469; Sheikhi *et al.* (2016) *Iran J. Immunol.* 13(3):148-166; 및 Lee, S. and Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856-3893).

[0528] IL-15 및 IL-15:IL-15Rα(IL-15/IL-15Rα)

[0529] IL-15는 구조적으로 IL-2와 유사하며 IL-2와 IL-15는 모두 T-세포의 증식 및 활성화를 위한 조기 자극을 제공하지만 IL-15는 IL-2 유도 세포자멸사를 차단하며, 이는 자극된 T-세포를 제거하고 T-세포 내성을 유도하여 기억 T-세포 반응을 제한하고 IL-2 단독의 치료 효능을 잠재적으로 제한하는 과정이다. IL-15는 또한 장기 항종양 면역력을 유지하기 위한 기억 CD8+ T-세포의 지속성을 지원하며 항원-독립적인 방식에서 CD8+ 이펙터 T-세포의 직접 활성화를 통해 전임상 쥐 모델에서 상당한 항종양 활성을 입증하였다. CD8+ T-세포에 더하여, IL-15는 이펙터 자연 살해(NK) 세포의 발달, 증식 및 활성화를 담당한다(예를 들어, Lee, S. and Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856- 3893 및 Han 등 (2011) *Cytokine* 56(3):804-810).

[0530] I1-IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체는 IL-15 대신에 사용될 수 있는데, 왜냐하면 이것이 단량체성 IL-15보다 더

긴 생체내 안정성을 갖고, 면역 세포 상에서 IL-15보다 10배 내지 100배 이상 활성이기 때문이다. IL-15/IL-15Rα는 NK 세포, γδ(감마 델타) T-세포 및 T-세포의 성숙, 증식 및 항-세포자멸사 유지를 자극시키고; 이는 활성화된 T-세포(CTL)의 생존 및 장기-수명의 CD8+ $CD44^{hi}$ T-세포 기억 세포의 생성을 촉진시킨다. 임상적으로, IL-15는 IL-2보다 우수한데, 이것이 면역억제성 Tregs 상에 위치한 IL-2R알파에 결합하지 않고 활성화-유도 세포 사멸(AICD) 또는 광범위한 모세관 누출 증후군(capillary leak syndrome)을 유도하지 않기 때문이다. 본원에서 CD8+ 세포 기능을 증강시키기 위해, 조작된 STING에 의해 유도되는 유형 I 인터페론 사이에 상승작용이 존재하는 것으로 제시된다. 골수성-매개 T-세포 모집 및 CD8+ T-세포 기능을 증강시키기 위한 상승작용이 존재한다. 이는 인간 수지상 세포(DC)를 활성화시켜 항바이러스 CD8+ T-세포 반응을 유도함으로써 항암 면역을 유도하기 위해 상승작용적으로 작용한다. 본원에서 이러한 조합은 동물 모델에서 높은 치유율을 유도하는 것으로 제시된다. 뮤린 동소 T-모델에서 강한 T-세포 침윤은 종양, 및 간질 종양 연관 대식세포(TAM) 장벽의 분해를 배제하였다. 유의한 T-세포 및 NK 모집이 관찰되었다.

[0531] IL-15 및 IL-15 수용체 알파(IL-15Rα)는 단핵구 및 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포에 의해 공동으로 발현되고, IL-15는 CD8+ T-세포와 NK 세포의 표면 t사에서 발현되는 IL-15RβγC 수용체 복합체에 IL-15Rα에 의해 트랜스로 제시된다. 가용성 1L-15:IL15-Rα(IL-15/IL-15Rα) 복합체는 IL-15RβγC 복합체를 통해 면역 반응을 조절하는 것으로 나타났으며, IL-15의 생물학적 활성은 미리 형성된 IL-15와 가용성 IL-15Rα의 복합체에 투여함으로써 50배 증가된 것으로 나타났으며, 이는 IL-15 단독과 비교하여 반감기가 증가하였다. IL-15Rα와의 사전-연관에 의한 IL-15의 치료 효능의 이러한 상당한 증가는 뮤린 종양 모델에서 입증되었다(예를 들어, Han 등 (2011) *Cytokine* 56(3):804-810 참조).

[0532] **IL-18**

[0533] IL-18은 NK 및 CD8+ T-세포에 의한 IFN-γ의 분비를 유도하여 독성을 향상시킨다. IL-18은 또한 대식세포를 활성화하고 Th1 헬퍼 CD4+ T-세포의 발달을 자극한다. IL-18은 여러 전임상 마우스 모델에서 유망한 항종양 활성을 보였다. 예를 들어, 재조합 IL-18(rIL-18)의 투여는 CD4+ T-세포 및/또는 NK 세포-매개 반응의 활성화를 통해 동계 마우스에서 흑색종 또는 육종의 퇴행을 초래하였다. 다른 연구에서는 IL-18 항종양 효과가 IFN-γ에 의해 매개되고 항혈관신생 기전과 관련이 있음을 보여주었다. IL-18과 IL-12와 같은 다른 사이토카인 또는 CD80과 같은 공동자극성 분자와의 조합은 IL-18-매개 항종양 효과를 향상시킨다. 진행성 고형 종양 및 림프종 환자를 대상으로 한 1상 임상 시험에서 IL-18 투여가 안전하고 면역 조절 활성을 가져오고 환자에서 그리고 중등도의 임상 반응에서 혈청 IFN-γ 및 GM-CSF 수준이 증가하는 것으로 나타났다. 임상 시험은 IL-18이 단일클론 항체, 세포독성 약물 또는 백신과 같은 다른 항암 치료제와 조합될 수 있음을 보여주었다(예를 들어, Fabbi 등 (2015) *J. Leukoc. Biol.* 97:665- 675, 및 Lee, S. 및 Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856-3893).

[0534] IL-18을 발현하도록 조작된 *살모넬라 티피무리움*의 약독화 균주는 전신 투여 후 독성 효과 없이 동계 마우스에서 피하(S.C.) 종양 또는 폐 전이의 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이 조작된 박테리아를 사용한 치료는 종양에서 T-세포, NK 세포 및 과립구의 축적을 유도하였고, 결과적으로 사이토카인의 종양내 생성을 초래하였다(예를 들어, Fabbi 등 (2015) *J. Leukoc. Biol.* 97:665- 675).

[0535] **케모카인**

[0536] 케모카인은 손상 또는 염증 부위로의 백혈구 이동을 매개하고 면역 및 염증 반응 매개에 관여하는 작은 사이토카인 계열이다. 케모카인은 서열에서 시스테인 잔기의 위치, 즉 XC-, CC-, CXC- 및 CX3C-케모카인 리간드 또는 XCL, CCL, CXCL 및 CX3CL에 따라 4개의 서브계열로 분류된다. 케모카인 리간드는 동족 수용체에 결합하고 면역 세포의 순환, 귀환 및 보유를 조절하며, 각각의 케모카인 리간드-수용체 쌍은 특정 유형의 면역 세포를 선택적으로 조절한다. 상이한 케모카인은 상이한 백혈구 집단을 유인하고, 유인된 면역 세포가 더 높은 농도의 케모카인을 향해 구배를 통해 이동하면서 생체내 농도 구배를 형성한다(예를 들어, Argyle D. and Kitamura, T. (2018) *Front. Immunol.* 9:2629; 및 Dubinett *et al.* (2010) *Cancer J.* 16(4):325-335). 케모카인은 면역 세포가 종양으로 침투하는 것을 증가시키고 항원 제시 세포(APC)를, 미접촉 T-세포 및 B 세포를 프라이밍하는 종양 배출 림프절로 이동시키는 것을 촉진하여 항종양 면역 반응을 향상시킬 수 있다(Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340)). 본원의 면역자극성 박테리아는 CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 및 CXCL11을 포함하지만 이로 제한되지 않는 케모카인을 인코딩하도록 조작될 수 있다.

[0537] **CCL3, CCL4, CCL5**

[0538] CCL3, CCL4 및 CCL5는 고도의 상동성을 공유하고 인간과 마우스 모두에서 미성숙 DC 및 T-세포를 포함한 여러

세포 유형에서 CCR5(CCL3, CCL4 및 CCL5) 및 CCR1(CCL3 및 CCL5)에 결합한다. 치료 T-세포는 CCL3, CCL4 및 CCL5의 종양-특이적 분비를 통해 내재성 면역 세포의 종양 부위에 대한 화학주성을 유도하는 것으로 나타났다(예를 들어, Dubinett 등 (2010) *Cancer* J. 16(4) :325-335).

[0539] T 헬퍼 세포 유형 1(Th1) 반응의 유도는 CCL3을 방출한다. 생쥐에 대한 생체 외 및 시험관 연구에서 CCL3이 호중구와 단핵구 모두에 대해 화학주성인 것으로 나타났으며; 구체적으로, CCL3는 골수로부터 골수 전구체 세포(MPC) 동원을 매개할 수 있고 MPC 조절 및 자극 효과를 갖는다. CCL3으로 형질주입된 인간 난소 암종 세포는 종양 내에서 향상된 T-세포 침윤 및 대식세포를 보여 개선된 항종양 반응을 일으켰고, 호중구의 CCL3-매개 화학주성이 종양 성장을 저해함을 나타내었다. CCL3에 의해 모집된 종양 항원 인간 흑색종 관련 유전자(MAGE)-1로 형질주입된 DC는 흑색종 마우스 모델에서 림프구 증식, 세포용해 능력 및 생존 증가, 종양 성장 감소를 비롯한 우수한 항종양 효과를 나타냈다. MAGE-1에 대한 항원 특이적 플랫폼과 CCL3의 조합 사용도 위암 치료에 사용되었다. 고도로 면역원성인 뮤린 결장 종양인 CT26에 의한 CCL3 생산은 생체 내 종양 성장을 늦추었으며; 이 과정은 자연 살해(NK) 세포의 CCL3 의존적 축적, 따라서 IFNɣ에 의해 유도되어 CXCL9 및 CXLC10을 생성한다(예를 들어, Allen *et al.* (2017) *Oncoimmunology* 7(3):e1393598; 및 Schaller *et al.* (2017) *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13(11):1049-10600).

[0540] CCL3는 암 치료를 위한 보조제로 사용되었다. 마우스 간세포 암종에서 고주파 절제 후 CCL3 활성 변이체인 ECI301의 투여는 종양-특이적 반응을 증가시켰고, 이 기전은 CCR1의 발현에 의존하는 것으로 추가로 나타났다. CCL3은 또한 백혈병/림프종 모델에서 CCL3 및 IL-2 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)로 백신을 접종한 마우스가 증가된 생존율을 나타내는 전신암에서 보조제로서의 성공을 보여주었다(예를 들어, Schaller *et al.* (2017) *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13(11):1049-1060).

[0541] CCL3 및 CCL4는 흑색종 및 결장암의 원발성 종양 부위로 CD8+ T-세포 침윤을 지시하는 역할을 한다. CCL4의 종양 생산은 CD103+ DC의 축적으로 이어진다. WNT/β-카테닌 의존성 경로를 통한 CCL4의 억제는 흑색종 종양의 CD103+ DC 침윤을 방지하였다(예를 들어, Spranger 등 (2015) *Nature* 523(7559):231-235 참조). CCL3은 또한 결장암의 마우스 모델에서 원발성 종양 부위에 대한 CD4+ 및 CD8+ T-세포 침윤을 향상시키는 것으로 나타났다(예를 들어, Allen 등 (2017) *Oncoimmunology* 7(3):e1393598 참조).

[0542] CCL3 또는 CCL5가 수용체(CCR1 및 CCR5)에 결합하면 미성숙 DC, 단핵구, 기억 및 T 이펙터 세포가 순환계에서 염증 또는 감염 부위로 이동한다. 예를 들어, 결장직장 종양에서 CCL5 발현은 T 림프구 화학유인 및 생존에 기여한다. CCL3 및 CCL5는 여러 전임상 모델에서 종양 퇴행 및 면역을 유도하기 위해 단독으로 또는 병용 요법으로 사용되었다. 예를 들어, 연구에 따르면 CCL3을 발현하도록 유전적으로 변형된 차이니즈 햄스터 난소 세포의 피하 주사는 종양 억제 및 호중구 침윤을 초래하였다. 또 다른 연구에서 CCL5(Ad-RANTES-E1A)를 발현하는 재조합 종양용해성 아데노바이러스는 원발성 종양 퇴행을 초래하고 유선 암종 쥐 모델에서 전이를 차단하였다(예를 들어, Lechner 등 (2011) *Immunotherapy* 3(11): 1317-1340).

[0543] 결장직장암에 대한 번역 연구에서 CCL5는 대식세포에서 "항바이러스 반응 패턴"을 유도하였다. 결장직장암에서 간 전이의 침습적 변연에서 림프구의 CXCR3-매개 이동의 결과로 CCL5가 생성된다. CCL5 수용체인 CCR5의 차단은 IFN 및 활성 산소 종을 생성하는 대식세포에 의해 구동되는 종양 사멸을 초래한다. 대식세포가 종양 미세환경에 존재하는 동안, CCR5 억제는 M2 표현형에서 M1 표현형으로의 표현형 이동을 유도한다. CCR5 차단은 또한 결장직장암 환자에서 임상 반응을 유도한다(예를 들어, Halama 등 (2016) *Cancer Cell* 29(4):587-601 참조).

[0544] CCL3, CCL4, 및 CCL5는 림프 종양, 방광암, 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 또는 간암을 포함하는 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호. US 2015/0232880 및 국제 출원 공개 번호 WO 2015/059303, WO 2017/043815, WO 2017/156349 및 WO 2018/191654).

[0545] **CXCL9, CXCL10, CXCL11**

[0546] CXCL9(MIG), CXCL10(IP10) 및 CXCL11(ITAC)은 IFN-ɣ의 생산에 의해 유도된다. 이러한 케모카인은 활성화된 T-세포에서 우선적으로 발현되는 CXCR3에 결합하고, 혈관정지 및 백혈구 동원 및 활성화 모두에서 기능한다. 결장직장암의 예후는 종양 침윤 T-세포, 특히 Th1 및 CD8+ 이펙터 T-세포와 강한 상관관계가 있으며; CXCL9, CXCL10 및 CXCL11의 높은 종양내 발현은 좋은 예후를 나타낸다. 예를 들어, 결장암 환자 163명의 시료에서 CXCL9 또는 CXCL11 수치가 높은 사람은 수술 후 생존율이 증가하였으며 CXC 발현이 높은 환자는 상당히 더 높은 수의 CD3+ T-세포, CD4+ T 헬퍼 세포, 및 CD8+ 세포독성 T-세포를 가졌다. 결장직장암 환자의 간 전이에서, CXCL9 및 CXCL10 수준은 침습성 변연에서 증가하였으며, 이펙터 T-세포 밀도와 상관관계가 있었다. CXCR3에 대한 CXCL9

및 CXCL10의 작용을 통한 림프구 이동의 자극은 침습성 변연에서 CCL5의 생성을 유도한다(예를 들어, Halama *et al.* (2016) *Cancer Cell* 29(4):587-601; 및 Kistner *et al.* (2017) *Oncotarget* 8(52):89998-90012).

[0547] 생체 내에서, CXCL9는 종양 침윤 림프구(TIL), 활성화된 말초 혈액 림프구, 자연 살해(NK) 세포 및 Th1 림프구에 대한 화학 유인 물질로 기능한다. CXCL9는 또한 피부 종양의 T-세포-매개 억제에 중요하다. 예를 들어, 전신 IL-2와 결합할 때 CXCL9는 CXCR3+ 단핵 세포의 종양 내 침윤 증가를 통해 종양 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 결장암의 쥐 모델에서 huKS1/4-IL-2 융합 단백질과 CXCL9 유전자 요법의 조합은 CD8+ 및 CD4+ T 림프구의 화학유인 및 활성화를 통해 우수한 항종양 효과와 연장된 수명을 달성하였다(예를 들어, Dubinett *et al.* (2010) *Cancer J.* 16(4):325-335; 및 Ruehlmann *et al.* (2001) *Cancer Res.* 61(23):8498-8503).

[0548] 활성화된 단핵구, 섬유아세포, 내피 세포 및 각질세포에 의해 생성되는 CXCL10은 활성화된 T-세포에 대한 화학주성이며 생체내에서 혈관신생의 저해제로 작용할 수 있다. 결장직장 종양에서 CXCL10의 발현은 세포독성 T 림프구 화학유인 및 더 긴 생존에 기여하는 것으로 나타났다. IL-12와 같은 면역자극성 사이토카인의 투여는 CXCL10에 의해 생성된 항종양 효과를 향상시키는 것으로 나타났다. 종양 세포 용해물로 프라이밍되고 CXCL10으로 형질주입된 수지상 세포(DC) 백신은 마우스에서 면역학적 보호 및 효과가 증가하였으며; 동물은 종양 공격에 대한 내성, 종양 성장의 둔화 및 더 긴 생존 시간을 보여주었다. CXCL10-뮤신-GPI 융합 단백질을 사용한 마우스의 생체내 및 시험관내 연구는 융합 단백질로 치료하지 않은 종양과 비교하여 모집된 NK 세포 수준이 더 높은 종양을 초래하였다. 인터페론(형질세포양 수지상 세포에 의해 생성될 수 있으며; 이러한 세포는 원발성 흑색종 병변과 연관되고 CCL20에 의해 종양 부위로 모집될 수 있음)은 마우스 흑색종 모델에서 CXCL9/10을 생성하는 것으로 나타난 CD103+ DC와 같은 종양 DC 하위집합에 작용할 수 있고, 인간 질환에서 CXCL9/10과 관련이 있다. CXCL10은 또한 원발성 흑색종 시료와 비교하여 인간 전이성 흑색종 시료에서 더 높은 발현을 나타냈다. 치료적으로, 보조 IFN-α 흑색종 요법은 CXCL10 생성을 상향 조절하는 반면, 화학요법제 시스플라틴은 CXCL9 및 CXCL10을 유도한다(예를 들어, Dubinett *et al.* (2010) *Cancer J.* 16(4):325-335; Kuo *et al.* (2018) *Front. Med. (Lausanne)* 5:271; Li *et al.* (2007) *Scand. J. Immunol.* 65(1):8-13; 및 Muenchmeier *et al.* (2013) *PLoS One* 8(8):e72749).

[0549] CXCL10/11 및 CXCR3 발현은 기저 세포 암종(BCC)에서 유래된 인간 각질세포에서 확립되었다. CXCL11은 또한 인간 기저 세포 암종에서 면역억제성 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO) 발현을 촉진할 수 있을 뿐만 아니라, 침윤성 CXCR3+ 이펙터 T-세포의 항종양 활성을 감소시킬 수 있는 각질세포 증식을 향상시킬 수 있다(예를 들어, Kuo *et al.* (2018) *Front. Med. (Lausanne)* 5:271).

[0550] CXCL9, CXCL10 및 CXCL11은 암 치료를 위한 종양용해성 바이러스에서 인코딩될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2015/0232880; 및 국제 출원 공개 번호 WO 2015/059303 참조). 의사형(peudotyped) 종양용해성 바이러스 또는 CXCL10에 대한 유전자를 인코딩하는 유전자 조작된 박테리아는 또한 암을 치료하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO 2018/006005 및 WO 2018/129404 참조).

[0551] **b.공동자극성 분자**

[0552] 공동자극성 분자는 종양 세포에 대한 면역 반응을 증강시키고, 공동자극성 경로는 종양 세포에 의해 저해되어 종양발생을 촉진한다. 본원에서 면역자극성 박테리아는 공동자극성 분자, 예를 들어, CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, 세포질 도메인의 결실을 갖는 4-1BBL(4-1BBLΔcyt), 절두된 세포질 도메인을 갖는 4-1BBL, OX40(CD134), OX40L(CD252), TNFR 슈퍼계열의 다른 구성원(예를 들어, CD27, CD27 리간드, GITR, CD30, Fas 수용체, TRAIL-R, TNF-R, HVEM, 및 RANK), B7, CD80, CD86, ICOS, ICOS 리간드(B7RP1), 및 CD28을 발현하도록 조작될 수 있다. 추가로, 면역자극성 박테리아는 항원 제시 세포(APC) 상에서의 발현을 위해 완전 또는 부분(세포에서 발현될 때 적절한 배향을 보장하기 위해 완전, 또는 절두된, 또는 변형됨) 세포질 도메인 결실을 갖는 절두된 공동자극성 분자(예를 들어, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L)를 인코딩하고 발현할 수 있다. 완전 결실을 포함하여 절두된 세포질 도메인을 갖는 유전자 생성물은 공동자극성 수용체 연계를 통해 T-세포로의 항시적 면역자극성 신호전달을 나타내고, 절두된 또는 결실된(또는 다르게는 본원에 기재된 바와 같이 변형된) 세포질 도메인으로 인해 APC로의 역조절 신호를 할 수 없는 것으로 제시된다. 절두는 신호전달을 제공하고, 변형된 공동자극성 분자의 경우 APC로의 역조절 신호를 할 수 없기에 충분하다. 본원에 기재된 바와 같이 공동자극성 분자의 세포질 도메인의 완전 또는 부분 결실은 면역억제성 리버스 신호전달 없이 공동자극성 분자의 활성화를 강화시킨다. 세포질 도메인의 부분 결실(또는 절두)은 공동자극성 분자의 발현, 또는 발현된 공동자극성 분자의 배향에 영향을 미치지 않으면서 이러한 효과를 달성하기에 충분한 결실이다.

[0553] 공동자극성 분자는 또한, 삽입, 결실, 및/또는 대체를 포함하여 세포질 도메인 내 아미노산에 대한 변형에 의해

면역억제성 세포내/리버스 신호전달을 무효화하거나 감소시키도록 변형될 수 있다. 특히, 공동자극성 분자는 세포질 도메인 인산화 부위의 변형, 예컨대 대체에 의해 변형된다. 예를 들어, 인간 4-1BBL에 대해서와 같이 적절한 좌위 또는 좌위들에서 하나 이상의 Ser 잔기, Ser5 및 Ser8을, 리버스 신호전달을 감소시키거나 무효화하는 잔기로 대체한다.

[0554] 본원에서 면역자극성 박테리아는 또한 항종양 면역 반응을 증강시키기 위해 공동자극성 분자(예를 들어, 4-1BBL)에 대한 작용제 항체를 발현하도록 조작될 수 있다.

[0555] **TNF 수용체 슈퍼계열**

[0556] 리간드의 TNF 수퍼계열(TNFSF) 및 이의 수용체(TNFRSF)는 종양 및 면역 이펙터 세포의 증식, 분화, 활성화 및 생존에 관여한다. 이 계열의 구성원에는 세포자멸사를 유도하는 CD30, Fas-L, TRAIL-R 및 TNF-R과 B 및 T-세포 면역 반응을 조절하는 CD27, OX40L, CD40L, GITR-L 및 4-1BBL이 있다. 다른 구성원으로는 헤르페스바이러스 진입 매개체(HVEM)가 있다. 본원에서 면역자극성 박테리아에 의한 TNFSF 및 TNFRSF의 발현은 항종양 면역 반응을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 뮤린 종양에서 4-1BBL의 발현은 면역원성을 향상시키고 OX40L의 발현이 증가된 수지상 세포(DC)의 종양내 주사는 뮤린 모델에서 종양 거부를 초래할 수 있는 것으로 나타났다. 연구에 따르면, 재조합 GITR을 발현하는 아데노바이러스를 B16 흑색종 세포에 주사하면 T-세포 침윤이 촉진되고 종양 부피가 감소한다. 4-1BB, OX40 및 GITR과 같은 분자에 대한 자극 항체는 면역자극성 박테리아에 의해 인코딩되어 면역계를 자극할 수도 있다. 예를 들어, 작용성 항-4-1BB 단일클론 항체는 항종양 CTL 반응을 향상시키는 것으로 나타났으며, 작용성 항-OX40 항체는 이식 가능한 종양 모델에서 항종양 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, 작용성 항-GITR 항체는 항종양 반응 및 면역을 향상시키는 것으로 나타났다(예를 들어, Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; 및 Peggs *et al.* (2009) *Clinical and Experimental Immunology* 157:9-19).

[0557] **CD40 및 CD40L**

[0558] TNF 수용체 슈퍼계열의 구성원인 CD40은 APC와 B 세포에 의해 발현되는 반면, 이의 리간드인 CD40L(CD154)은 활성화된 T-세포에 의해 발현된다. CD40과 CD40L 사이의 상호작용은 B 세포를 자극하여 사이토카인을 생성하여 T-세포 활성화와 종양 세포 사멸을 초래한다. 연구에 따르면 항종양 면역 반응은 T-세포의 CD40L 또는 수지상 세포의 CD40 발현 감소로 인해 손상된다. CD40은 여포성 림프종, 버킷 림프종, 림프구성 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병과 같은 여러 B 세포 종양의 표면에서 발현되며, CD40L과의 상호작용은 B7-1/CD80, B7-2/CD86 및 CD40+ 종양 세포에서 인간 백혈구 항원(HLA) 부류 II 분자의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 항원 제시 능력을 증강시키는 것으로 나타났다. 다발성 골수종의 뮤린 모델에서 CD40L의 이식유전자 발현은 CD4+ 및 CD8+ T-세포의 유도, 국소 및 전신 항종양 면역 반응 및 종양 성장 감소를 초래하였다. 항-CD40 작용제 항체는 또한 항-종양 T-세포 반응을 유도하였다(예를 들어, Marin-Acevedo *et al.* (2018) *Journal of Hematology & Oncology* 11:39; Dotti *et al.* (2002) *Blood* 100(1):200-207; 및 Murugaiyan *et al.* (2007) *J. Immunol.* 178:2047-2055).

[0559] **4-1BB 및 4-1BBL**

[0560] 4-1BB(CD137)는 T-세포와 NK 세포에 의해 주로 발현되는 유도성 공동자극 수용체이며; DC, B 세포 및 단핵구를 포함한 APC에서 발현되는 리간드 4-1BBL에 결합하여 면역 세포 증식 및 활성화를 유발한다. 4-1BB는 활성화된 T-세포의 더 길고 광범위한 반응을 초래한다. 항-4-1BB 작용제 및 4-1BBL 융합 단백질은 CD4+ Th1 및 종양-특이적 CTL 활성에 의해 매개되는 육종 및 비만세포종 종양에 대한 면역-매개 항종양 활성을 증가시키는 것으로 나타났다(예를 들어, Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; 및 Marin-Acevedo *et al.* (2018) *Journal of Hematology & Oncology* 11:39). 4-1BBL은 세포질 신호전달 도메인에 의해 부정적으로 조절된다. T-세포에 대한 대식세포 상의 4-1BBL 리게이션의 후기 단계에서, 4-1BBL 세포질 도메인의 역 신호전달은 4-1BBL의 표면 전위를 유도하여 TLR4와 신호전달 복합체를 형성하도록 결합한다. 이는 TLR4의 LPS 활성화에 필적하는 높은 수준의 TNF-α를 유도하여 적응 면역 반응의 면역억제를 유도한다(예를 들어, Ma 등 (2013) *Sci. Signaling* 295(6):1-11 참조). 본원에 기재된 바와 같이 4-1BBL의 세포질 도메인의 결실은 면역억제 역방향 신호전달 없이 4-1BBL의 활성화를 강화한다.

[0561] **OX40 및 OX40L**

[0562] OX40(CD134)은 활성화된 이펙터 T-세포에서 발현되는 TNF 수용체 슈퍼계열의 구성원이며, 그 리간드인 OX40L은 TLR 작용제 및 CD40-CD40L 신호전달에 의한 활성화 후 DC, B 세포 및 대식세포를 포함한 APC에서 발현된다. OX40-OX40L 신호전달은 T-세포의 활성화, 강화, 증식 및 생존, 뿐만 아니라 NK 세포 기능의 조절 및 Treg의 억제 활성의 억제를 초래한다. OX40을 통한 신호전달은 또한 사이토카인(IL-2, IL-4, IL-5 및 IFN-γ)의 분비를

일으켜 Th1 및 Th2 세포 반응을 촉진한다. 종양 침윤 림프구(TIL)에 의한 종양 항원의 인식은 개선된 예후와 상관관계가 있는 TIL에 의한 OX40의 발현을 증가시킨다. 연구에 따르면 항-OX40 작용제 항체 또는 Fc-OX40L 융합 단백질로 치료하면 흑색종, 육종, 결장암 및 유방암의 쥐 모델에서 종양-특이적 CD4+ T-세포 반응이 향상되고 생존이 증가하는 반면, Fc-OX40L은 종양 세포 백신에 통합되어 유방암 세포에 대한 후속 공격으로부터 마우스를 보호하였다(예를 들어, Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; 및 Marin-Acevedo *et al.* (2018) *Journal of Hematology & Oncology* 11:39).

[0563] **B7-CD28 계열**

[0564] CD28은 항원 제시 세포에서 발현되는 공동자극성 분자인 B7-1(CD80) 및 B7-2(CD86)에 대한 수용체로 작용하는 T-세포 표면에서 발현되는 공동자극성 분자이다. CD28-B7 신호전달은 T-세포 활성화 및 생존, 그리고 T-세포 무산소증의 예방에 필요하며 결과적으로 IL-6과 같은 인터루킨의 생성을 초래한다.

[0565] 최적의 T-세포 프라이밍에는 (1) MHC 제시 항원의 T-세포 수용체(TCR) 인식 및 (2) T-세포 CD28과 APC에서 발현되는 B7-1(CD80) 또는 B7-2(CD86)의 연결로 인한 공동자극 신호의 두 가지 신호가 필요하다. T-세포 활성화 후, CTLA-4 수용체가 유도되어 B7-1 및 B7-2 리간드에 대한 결합에 대해 CD28을 능가한다. 종양 세포에 의한 항원 제시는 B7-1/CD80 및 B7-2/CD86과 같은 공동자극성 분자의 발현 부족으로 인해 불량하여 T-세포 수용체 복합체를 활성화하지 못하게 한다. 결과적으로 종양 세포 표면에서 이러한 분자의 상향 조절은 면역원성을 향상시킬 수 있다. 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 면역요법은 예를 들어 B7의 종양 세포 발현 또는 가용성 B7-면역글로불린 융합 단백질을 통해 B7에 의해 성공적으로 유도되었다. ICAM-3 및 LFA-3과 같은 다른 공동자극 리간드와 조합된 B7의 바이러스-매개 종양 발현은 만성 림프구성 백혈병 및 전이성 흑색종의 치료를 위한 전임상 및 임상 시험에서 성공적이었다. 또한, 가용성 B7 융합 단백질은 단일 작용제 면역요법으로서 고형 종양의 면역요법에서 유망한 결과를 입증하였다(예를 들어, Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; 및 Dotti *et al.* (2002) *Blood* 100(1):200-207).

[0566] **2.면역 반응 및/또는 유형 I IFN을 자극시키는 항시적 활성 단백질, 비-인간 STING 단백질, STING 키메라, 및 변형된 형태**

[0567] 유형 I 인터페론(IFN, 인터페론 유형 1이라고도 함)은 IFN-α 및 IFN-β를 포함하며 항바이러스, 항종양 및 면역조절 활성을 갖는 다면성 사이토카인이다. IFN-β는 대부분의 세포 유형에서 생성되며; IFN-α는 주로 조혈세포, 특히 형질세포양 수지상 세포에 의해 생성된다. 유형 I IFN은 패턴 인식 수용체(PRR)에 의한 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)의 감지 후에 생성된다. 이는 병원체, 주로 바이러스에 대한 내재성 면역 반응에 관여하며, 항원 제시를 촉진하고, 수지상 세포(DC) 성숙을 매개하고, 세포독성 T 림프구(CTL), 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포를 활성화하고, 고친화도 항원 특이적 T-세포 및 B 세포 반응 및 면역학적 기억의 발달을 촉진함으로써 적응 면역력계를 활성화시킨다.

[0568] 유형 I IFN은 종양에 대한 항증식 및 세포자멸사 효과를 나타내고 종양 신생혈관에 대한 항혈관신생 효과를 갖는다. 이는 종양 세포 표면에서 MHC 부류 I 분자의 발현을 유도하고, 종양 세포의 면역원성을 증가시키고, 종양 세포에 대한 세포독성을 활성화한다. 유형 I IFN은 암 및 바이러스 감염의 치료를 위한 치료제로 사용되었다. 예를 들어, IFN-α(상표 Intron®/Roferon®-A로 판매됨)는 모세포 백혈병, 악성 흑색종, AIDS 관련 카포시 육종 및 여포성 비호지킨 림프종의 치료용으로 승인되고; 이는 또한 만성 골수성 백혈병(CML), 신세포 암종, 신경내분비 종양, 다발성 골수종, 비여포성 비호지킨 림프종, 데스모이드 종양 및 피부 T-세포 림프종의 치료에도 사용되지만 전신 면역독성으로 인해 사용이 제한된다(예를 들어, Ivashkiv and Donlin (2014) *Nat. Rev. Immunol.* 14(1):36-49; Kalliolias and Ivashkiv (2010) *Arthritis Research & Therapy* 12(Suppl 1):S1; 및 Lee, S. and Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856-3893).

[0569] 종양 및 종양 미세환경에서 유형 I 인터페론의 발현은 본원의 면역자극성 박테리아가 유발하도록 설계된 면역반응 중 하나이다. 유형 I 인터페론을 유도하거나 유발하는 것은 암 치료를 위한 항종양 면역력을 제공한다.

[0570] **a.항시적 STING 발현 및 기능-획득 돌연변이**

[0571] 유형 I IFN, 전염증성 사이토카인 및 케모카인의 유도는 바이러스 병원체에 의한 감염을 예방하거나 억제하는 면역 반응을 시작하는 데 필요하다. 이 반응은 또한 항종양제로도 효과적일 수 있다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질을 인코딩한다. 이러한 단백질 중에는 면역 반응 조절제의 과잉 생산과 관련된 다양한 질환 또는 장애를 가진 개체에서 발생하는 단백질이 있다. 예를 들어, 유형 I IFN 및 전염증성 사이토카인의 과잉 생산 또는 과도한 생산, 또는 음성 조절 결함은 염증 및 자가면역 질환과 같은

바람직하지 않은 영향을 초래할 수 있다. 일반적으로 만성 유형 I IFN의 과잉 생산을 포함하는 장애는 인터페론병증이라고 한다(예를 들어, Lu and MacDougall (2017) *Front. Genet.* 8:118; 및 Konno *et al.* (2018) *Cell Reports* 23:1112-1123 참조). 유형 I 인터페론병증과 관련된 장애 및 임상 표현형에는 아이카르디-구티에르 증후군(AGS), STING-연관된 유아기 발병 혈관병증(SAVI), 싱글레톤-마르텐 증후군(SMS: Singleton-Merten syndrome), 비정형 SMS, 가족성 소인 루푸스(FCL), 전신성 루푸스 홍반(SLE), 양측 선조체 괴사(BSN), 뇌혈관 질환(CVD), 유전성 염색체이상증(DSH), 경직 마비(SP), X-연관 망상 색소 장애(XLPDR), 프로테아좀-연관 자가염증 증후군(PRAAS), 두개내 석회화(ICC), 마이코박테리아 질환에 대한 멘델식 감수성(MSMD), 및 척추연골이형성증(SPENCD)이 포함된다(예를 들어, Rodero 등 (2016) *J. Exp. Med.* 213(12):2527.-2538 참조) 이러한 표현형은 유형 I IFN의 유도에 관여하는 생성물의 항시적 활성을 유도하는 유전자의 돌연변이를 포함하는 특정 유전자형과 관련이 있다.

[0572] 인터페론 신호전달의 지속적인 활성화는 1) 세포질 DNA 증가로 이어지는 기능 상실 돌연변이(예를 들어, TREX1 및 SAMHD1의 돌연변이) 또는 세포질 RNA/DNA 하이브리드 증가(예를 들어, RNASEH2A, RNASEH2B의 돌연변이, RNASEH2C 및 POLA1); 2) RNA 편집의 결함 및 세포질 내 자가 핵산 RNA 종의 비정상적인 감지를 초래하는 기능 상실 돌연변이(예를 들어, ADAR1의 돌연변이); 3) 세포질 IFN 신호전달 경로의 항시적 활성화를 유도하는 기능-획득 돌연변이/세포질 핵산 리간드에 대한 민감도 증가(예를 들어, RIG-I, MDA5 및 STING의 돌연변이); 4) 펼친 단백질 반응의 장애로 인한 MAVS를 통한 비정상적인 RNA 신호전달로 이어지는 기능 상실 돌연변이(예를 들어, SKIV2L의 돌연변이); 5) IFN 수용체(IFNAR1/2) 신호전달 제한을 담당하는 분자의 기능 상실 돌연변이로 인해 조절되지 않는 IFN-자극 유전자(ISG) 생산(예를 들어, USP18 및 ISG15의 돌연변이); 6) 미지의 기전을 통해 증가된 IFN 신호전달을 유발하는 프로테아좀 기능장애(예를 들어, PSMA3, PSMB4 및 PSMB8의 돌연변이); 및 7) TRAP/ACP5 및 C1q의 기능 상실 돌연변이로 인한 것일 수 있으며, 여기서 유형 I IFN 신호전달을 유도하는 기전은 여전히 불분명한다(예를 들어, Rodero 등 (2016) *J. Exp. Med.* 213(12) 참조: 2527-2538).

[0573] 여기서 흥미로운 것은 기능-획득(GOF)을 유도하는 돌연변이이다. STING, MDA5 및 RIG-I에는 인코딩된 단백질의 항시적 활성화 및/또는 향상된 감도 또는 증가된 친화도 또는 내인성 리간드에 대한 결합과 관련된 알려진 돌연변이가 있다. 예를 들어, STING의 GOF 돌연변이는 SAVI 및 FCL에 연결되며; MDA5의 GOF 돌연변이는 AGS 및 SMS와 연결되고; RIG-I의 GOF 돌연변이는 비정형 SMS와 연결된다.

[0574] ***TMEM173* STING 대립유전자**

[0575] 인터페론 유전자 자극제(STING)는 약 7 kb 길이의 유전자인 막횡단 단백질 173(TMEM173) 유전자에 의해 인코딩된다. 인간 TMEM173 유전자는 대립유전자의 상당한 이질성과 집단 계층화를 특징으로 한다. 가장 일반적인 인간 TMEM173 대립유전자는 R232로 지칭된다(잔기 232에 존재하는 아미노산 참조; 예를 들어, 다양한 인간 TMEM173 대립유전자의 서열을 제시하는 SEQ ID NO: 305-309 참조). 미국 인구의 절반 이상이 R232/R232가 아니다. 제2의 가장 흔한 대립 유전자는 *R71H-G230A-R293Q* (*HAQ*)이다. 다른 일반적인 대립 유전자에는 *AQ* (*G230A-R293Q*), *Q* (*Q293*) 및 *R232H*(Glen Barber가 데이터베이스에서 처음으로 식별하고 분류한 참조 STING 대립 유전자의 이름을 따서 REF로 명명됨)가 포함된다.

[0576] *R232/R232*는 유럽인에서 가장 흔한 유전자형이고 *HAQ/R232*는 동아시아인에서 가장 흔한 유전자형이다. 아프리카인은 *HAQ/HAQ* 유전자형이 없지만 Q 대립유전자가 있으며 아프리카인의 약 4%는 *AQ/AQ*이며 다른 민족 집단에는 없다(예를 들어, Patel and Jin (2018) *Genes & Immunity*, doi:10.1038/s41435-018-0029-9). REF, AQ 및 Q 대립유전자는 3'3' c-디-GMP와 같은 박테리아 유래 CDN에 대해 매우 성불응이다(예를 들어, Corrales 등 (2015) *Cell Reports* 11:1018-1030 참조).

[0577] **STING 기능-획득 돌연변이**

[0578] STING의 유전자인 TMEM173의 여러 활성화 또는 기능-획득(GOF) 돌연변이는 유전되고 새로운 것으로, 희귀 자가염증성 질환인 SAVI(STING 관련 혈관병 및 유아기 발병)와 관련이 있다. SAVI는 상염색체 우성 질환이며 전신 염증, 간질성 폐 질환, 피부 혈관염 및 재발성 박테리아 감염이 특징이다. 새로운 TMEM173 돌연변이가 있는 SAVI는 일반적으로 조기 발병(< 8주) 및 심각한 표현형을 특징으로 하는 반면, 가족 돌연변이는 늦게 발병(10대에서 성인) 및 경미한 임상 증상을 초래한다. 유전된 TMEM173 활성화 돌연변이에는 G166E 및 V155M이 포함되는 반면, 새로운 돌연변이에는 N154S, V155M, V147M, V147L, C206Y, R284G, R281Q 및 S102P/F279L이 포함된다(예를 들어, Patel and Jin (2019) *Genes & Immunity* 20:82-89). 식별된 다른 활성화 *TMEM173* 돌연변이는 R284M, R284K, R284T, E316Q, 및 R375A를 포함한다(예를 들어, 미국 출원 공개 번호 2018/0311343 참조). *TMEM173*의 또 다른 기능-획득 돌연변이는 R284S로, 이는 매우 항시적으로 활성인 STING을 유발하고, 활성화 CDN이 없을 때

내재성 면역 신호를 유발하여 전염증성 사이토카인의 만성 생성을 유발하는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, Konno 등 (2018) Cell Reports 23:1112 1123 참조).

[0579] N154S, V155M 및 V147L과 같은 *TMEM173* 돌연변이, 및/또는 아래 표에 나열된 돌연변이 중 하나는 단독으로 또는 이러한 및 N154S/R284G와 같은 다른 이러한 돌연변이와 조합하여 발생하여, 항시적으로 활성이고 리간드 자극을 필요로 하지 않거나 과민하여 STING-인터페론 경로의 만성 활성화를 유도하는 기능 획득 STING을 초래한다. 이는 입증되었다(예를 들어, Liu 등 (2014) N. Engl. J. Med. 371:507-518 참조). 돌연변이된 TMEM173(교체 V147L, N154S, V155M 및 기능 상실 돌연변이 V155R 각각 포함) 및 돌연변이되지 않은 TMEM173의 작제물을 STING 음성 HEK293T-세포에 형질주입시키고 STING 리간드 cGAMP로 자극하였다. N154S, V155M 및 V147L 돌연변이로 형질주입된 세포는 고도로 상승된 IFNB1(IFN-β를 인코딩하는 유전자) 리포터 활성을 나타내었으며, 이는 STING 리간드 cGAMP로의 자극에 의해 유의하게 부스트되지 않았다. 기능 상실 돌연변이(V155R), 돌연변이되지 않은 TMEM173 또는 대조군 플라스미드로 형질주입된 세포는 유의한 기준선 활성화가 없었다. cGAMP를 사용한 자극은 돌연변이되지 않은 TMEM173이 있는 세포에서 용량 의존적 방식으로 반응을 일으켰고, 기능 상실 돌연변이를 발현하는 세포에서 가장 높은 cGAMP 농도에서만 최소 반응을 나타내었다(예를 들어, Liu 등 (2014) N. Engl. J. Med. 371:507-518). 이러한 결과는 활성화된 TMEM173 돌연변이가 cGAMP에 의한 자극이 없는 경우에도 STING의 항시적 활성화를 초래한다는 것을 보여준다.

[0580] G207E는 탈모증, 광과민성, 갑상선 기능 장애 및 SAVI 기능을 유발하는 또 다른 기능-획득 STING 돌연변이이다. G207E 돌연변이는 HEK 세포에서 염증 관련 경로의 항시적 활성화뿐만 아니라 환자 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 비정상적인 인터페론 신호 및 인플라마솜 활성화를 유발한다. R232 또는 H232 대립유전자 및 GOF 돌연변이 G207E가 있는 STING 변이체를 사용하여 CDN으로 자극한 후 R232 + G207E 변이체가 IFN-β 및 STAT1/2 경로에서 활성이 약간 증가하는 반면 H232에서는 + G207E 변이체, IFN-β 수준은 일정하게 유지되었고 STAT1/2는 감소된 활성을 나타내었다. 두 변이체 모두 자극 후 유사한 STAT3 및 NF-κB 경로 활성화를 보여주었다. 이러한 결과는 위치 232의 잔기 R이 cGAMP 결합 및 IFN 유도에 중요함을 보여주고, G207E 돌연변이가 STING 신호전달 경로의 항시적 활성화 및 NF-κB 경로의 리간드-의존적 과활성화를 초래한다는 것을 보여준다. R232 대립유전자와 G207E 돌연변이를 가진 환자는 더 심각한 질환을 가지고 있었다. 이 다형성은 돌연변이 STING의 항시적 활성화를 강화하여 IFN, IL1-β 및 IL-18과 같은 다운스트림 표적의 과발현을 유도한다(예를 들어, doi.org/10.1101/394353에서 제공되는 Keskitalo 등 (2018) 참조).

[0581] 뮤린 STING(SEQ ID NO: 369)의 67개 아미노산이 환식 디-GMP(c-디-GMP) 결합 및/또는 IFN 유도에 관련된 아미노산을 식별하기 위해 개별적으로 또는 군으로 돌연변이되었다(Burdette 등 (2011) Nature 478(7370):515-518 참조). 식별된 돌연변이 중에는 낮은 수준의 형질주입에서 자발적으로 IFN을 유도하고 c-디-GMP에 반응하지 않는 과활성 돌연변이체 R196A/D204A, S271A/Q272A, R309A/E315A, E315A, E315N, E315Q 및 S271A(R197A/D205A, EA16, EA16, EA16, S232A/Q27에 상응하고, 각각 SEQ ID NO: 305-309에 기재된 인간 STING의 서열과 관련됨), 및 과발현되었을 때 IFN을 유도하였으나 c-디-GMP에 반응하지 않은 돌연변이체 R374A, R292A/T293A/E295A/E299A, D230A, R231A, K235A, Q272A, S357A/E359A/S365A, D230A/R231A/K235A/R237A, 및 R237A(R375A, R293A/T294A/E296A(인간 STING의 E299에 대한 등가물이 존재하지 않음), D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, 및R238A, 각각 SEQ ID NO: 305-309로 표시된 인간 STING를 참조로 함)였다. 이 대립유전자는 여전히 내인성 CDN 2'3' c-디-GAMP에 반응할 수 있는데, 나중에 일부 인간 STING 돌연변이가 c-디-GMP와 같이 박테리아에 의해 생성된 3'3' CDN에 대해 낮은 친화도를 갖는다는 것이 발견되었기 때문이다(예를 들어, Corrales 등 (2015) Cell Reports 11:1018-1030 참조).

[0582] 기능-획득 돌연변이를 갖는 이러한 단백질을 인코딩하는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 유형 I IFN 및 전염증성 사이토카인의 생산을 증가시키기 위해 이러한 단백질의 항시적 활성화를 이용한다. 기능-획득 돌연변이와 함께 STING, IRF3, IRF5, IRF7, MDA5, 및/또는 RIG-1을 인코딩하는 종양-표적화 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경에서 유형 I IFN-매개 사이토카인 및 케모카인 생성을 증가시켜 항종양 면역 반응을 강화하고 면역자극성 박테리아의 치료 효능을 향상시킨다. STING을 인코딩하는 유전자는 *TMEM173*으로 지칭되고, MDA5를 인코딩하는 유전자는 *IFIH1*이고, RIG-I를 인코딩하는 유전자는 *DDX58*이다. 각각의 유전자에 대해 수많은 대립 유전자가 있으며, 대립 유전자가 있는 유전자에서 발생할 수 있는 알려진 돌연변이로 인해 기능-획득 또는 항시적 활성화가 발생한다. 아래 나열된 돌연변이는 단독으로 발생할 수도 있고 조합하여 사용할 수도 있다. 기능-획득을 초래하는 다른 돌연변이는 일상적인 스크리닝/돌연변이 프로토콜에 의해 식별될 수 있다. 하기 표는 STING/TMEM173(SEQ ID NO: 305-309), MDA5/IFIH1(SEQ ID NO: 310), RIG-I/DDX58(SEQ ID NO: 311), IRF3(SEQ ID NO: 312), 및 IRF7(SEQ ID NO: 313) 각각에서 예시적인 기능

-획득 돌연변이를 나열한다. STING의 S324/L325/S326 → S324A/L325/S326A와 같은 인산화 부위의 결실 또는 교체와 같은 다른 돌연변이, 및 STING에서 핵인자-κB(NF-κB), 또는 이러한 신호전달을 이용하는 다른 단백질의 신호전달을 감소시키기 위해 인산화 부위를 제거하기 위한 다른 대체가 또한 도입될 수 있다.

[0583] 생성된 단백질은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 인코딩될 수 있다. 단백질은 면역자극성 박테리아의 플라스미드에 인코딩된다.

[0584] 야생형 STING을 인코딩하는 핵산을 투여하면 면역 반응을 유도할 수 있으며; 종양-표적화된 면역자극성 박테리아에 본원에 제공된 바와 같은 항시적 활성을 갖는 기능-획득 STING 돌연변이체의 투여는 보다 강력한 면역 반응 및 보다 효과적인 항암 치료제를 유도한다. 항시적으로 활성인 STING의 종양 표적 투여, 또는 본원에 제공된 바와 같은 MDA5, RIG-I, IRF3 또는 IRF7의 기능-획득 돌연변이체와 같은 다른 변형된 DNA/RNA 센서에 의한 강화된 면역 반응은 치료적으로 더 효과적인 항암 치료를 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 면역자극성 박테리아가 상피 세포를 감염시키지 않지만 종양-체류 면역 세포를 포함하는 식세포를 감염시키는 능력을 유지하도록 면역자극성 박테리아를 변형하는 것은 면역자극성 박테리아를 종양 미세환경에 효과적으로 표적화하여 치료 효율을 개선하고, 바람직하지 않은 전신 면역 반응을 방지한다. 이러한 종양 표적 박테리아는 기능-획득 STING, MDA5, RIG-I, IRF3 또는 IRF7 돌연변이를 인코딩하도록 조작되었으며, 이는 예를 들어 리간드 자극이 없는 경우에도 항시적으로 활성이며, 이로써, 종양 미세환경에서 항암 면역 반응을 개선하기 위한 강력한 유형 I IFN 반응을 제공한다. .

[0585] 따라서, 예를 들어, 항시적으로 활성화된 STING의 투여는 암의 면역요법적 치료를 위한 STING 신호전달을 증가시키는 대안적인 수단을 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 종양-표적화 면역자극성 박테리아는 S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, R197A, D205A, R197A/D205A, C206Y, G207E, D231A, R232A, K236A, R238A, D231A/R232A/K236A/R238A, S272A, Q273A, S272A/Q273A, F279L, S102P/F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R293A, T294A, E296A, R293A/T294A/E296A, R310A, E316A, E316N, E316Q, R310A/E316A, S324A/S326A, S358A, E360A, S366A, S358A/E360A/S366A, 및 R375A로부터 선택되는 기능 획득 돌연변이, 뿐만 아니라 이의 보존적 돌연변이를 갖는 STING/TMEM173(SEQ ID NO: 305-309)을 인코딩하도록 변형될 수 있다. 이에 더하여, STING 기능-획득 돌연변이, 예컨대 N154S/R284G의 조합은 단일 돌연변이 대응물과 비교하여 STING 신호전달을 유의하게 증가시킨다. 이러한 돌연변이는 STING의 항시적 활성을 초래한다.

예시적인 기능 획득 돌연변이체의 표

유형 I IFN 의 지속적인 발현을 이끄는 기능 획득 돌연변이

STING	RIG-I	MDA5	IRF3	IRF7
V147L	E373A	T331I	S396D	S477D/S479D
N154S	C268F	T331R	S396D/S398D	S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D
V155M		A489T	S396D/S398D/S402D/T404D/S405D	Δ247–467
G166E		R822Q		S475D/S477D/S479D
C206Y		G821S		
G207E		A452T		
R281Q		A946T		
R284G		R337G		
R284S		D393V		
R284M		G495R		
R284K		R720Q		
R284T		R779H		
S102P		R779C		
F279L		L372F		
R197A				
D205A				
S102P/F279L				
R197A/D205A				
S272A/Q273A				
R310A/E316A				
R310A				
E316A				
E316N				
E316Q				
S272A				
R375A				
R293A				
T294A				
E296A				
R293A/T294A/E296A				
D231A				
R232A				

[0586]

STING	RIG-I	MDA5	IRF3	IRF7
K236A				
Q273A				
S358A				
E360A				
S366A				
S358A/E360A/S366A				
D231A/R232A/K236A/R238A				
R238A				
V147M				
S324A/S326A				
N154S/R284G				

[0587]

[0588] SEQ ID NO: 305-309로 표시된 바와 같이 인간 STING에 기재된 임의의 서열을 참조로, 아미노산 잔기 R197, D205, R310, R293, T294, E296, S272, Q273, E316, D231, R232, K236, S358, E360, S366 및 R238은 SEQ ID NO: 369로 표시된 바와 같이 뮤린 STING을 참조로 아미노산 잔기 R196, D204, R309, R292, T293, E295, S271, Q272, E315, D230, R231, K235, S357, E359, S365, 및 R237에 상응한다. 또한 각각의 대체물의 보존적 치환이 포함된다(각 아미노산에 대한 예시적인 보존적 돌연변이를 나열하는 정의 섹션의 표 참조).

[0589] **b. 항시적 IRF3 발현 및 기능-획득 돌연변이**

[0590] IRF3(인터페론 조절 인자 3, 또는 IRF-3) 및 IRF7(또는 IRF-7)은 유형 I IFN 유전자의 주요 활성제이다. 바이러스 유도 C-말단 인산화(TBK1에 의한) 후, 활성화된 IRF3 및 IRF7은 동종이량체를 형성하고, 세포질에서 핵으로 전위되고, IFN 자극 반응 요소(ISRE)에 결합하여 유형 I IFN 반응을 유도한다. IRF3는 자극되지 않은 세포에서

항시적으로 발현되어 불활성 세포질 형태로 존재하는 반면, IRF7은 세포에서 항시적으로 발현되지 않고 IFN, 지질다당류 및 바이러스 감염에 의해 유도된다. IRF3의 과발현은 유형 I IFN 유전자의 바이러스-매개 발현을 상당히 증가시켜 항바이러스 상태를 유도한다. IRF3 활성화는 또한 바이러스 감염 후 CC-케모카인 RANTES(CCL5)의 전사를 상향 조절하는 것으로 나타났다(예를 들어, Lin 등 (1999) Mol. Cell Biol. 19(4):2465-2474 참조).

[0591] IRF3의 C-말단 도메인에 있는 잔기 S385, S386, S396, S398, S402, T404 및 S405는 바이러스 감염 후 인산화되어 IRF3의 활성화를 초래하는 구조적 변화를 유도한다. IRF3 활성화는 바이러스 감염뿐만 아니라 지질다당류(LPS) 및 폴리(I:C)에 의해 유도된다. IRF3의 C-말단 클러스터에서 인산화될 수 있는 7개 잔기 중 단일 점 돌연변이인 S396D는 항시적으로 활성인 형태의 IRF3 생성에 충분하다. IRF3(S396D)는 야생형 IRF3와 비교하여 IFNα1, IFN-β 및 RANTES 프로모터의 트랜스활성화(transactivation)를 각각 13배, 14배 및 11배 향상시킨다. 또 다른 돌연변이체 IRF3(S396D/S398D)는 야생형 IRF3와 비교하여 IFNα1, IFN-β 및 RANTES 프로모터의 트랜스활성화를 각각 13배, 12배, 12배 향상시킨다. IRF3의 또 다른 구성 활성 돌연변이체는 IRF3(5D)이며, 여기서 396, 398, 402, 404 및 405 위치의 세린 또는 트레오닌 잔기가 포스포모방 아스파르트산 잔기로 대체된다(IRF3(S396D/S398D/S402D/T404D/S405D). 유형 I 인터페론 유도와 같은 면역 반응 매개체의 항시적 활성으로 이어지는 유사한 기능-획득 돌연변이는 면역 반응 신호전달 경로에 있는 RIG-I, MDA5 및 STING과 같은 다른 단백질에서 세린 잔기를 포스포모방체 아스파르트산으로 돌연변이시켜 달성할 수 있다.

[0592] IRF3(5D)는 항시적 DNA 결합 및 트랜스활성화 활성, 이량체 형성, 전사 보조 활성화제 p300(EP300 또는 E1A 결합 단백질 p300이라고도 함)/CBP(CREB 결합 단백질 또는 CREBBP라고도 함) 및 핵 위치와의 연관성을 표시한다. 이의 트랜스활성화 활성은 바이러스 감염에 의해 더 이상 유도되지 않는다. IRF3(5D)는 IFN-β 및 ISG-15 유전자 발현의 매우 강력한 활성제이며; IRF3(5D) 단독은 바이러스 감염만큼 강력하게 IFN-β 발현을 자극하고, 야생형 IRF3와 비교하여 IFNα1, IFN-β 및 RANTES 프로모터의 트랜스활성화를 각각 9배, 5.5배 및 8배 향상시킨다(예를 들어, Lin *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275(44):34320-34327; Lin *et al.* (1998) *Mol. Cell Biol.* 18(5):2986-2996; 및 Servant *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278(11):9441-9447). 위치 S385, S386, S396, S398, S402, T404 및 S405 중 임의의 것은 단독으로 또는 조합하여 돌연변이되어 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 항시적으로 활성인 IRF3 돌연변이체를 생성할 수 있다.

[0593] **c.증가된 또는 항시적 활성을 갖는 비-인간 STING 단백질과 이의 변이체, 및 증가된 또는 항시적 활성을 갖는 STING 키메라와 이의 변이체**

[0594] 위에서 논의한 바와 같이, 세포질 이중 가닥 DNA(dsDNA)는 전사 인자 인터페론 조절 인자 3을 활성화하는 소포체(ER)-상주 어댑터 단백질 STING(IFN 유전자 자극제)을 통해 유형 I 인터페론(IFN) 생성을 자극한다(IRF3). TANK 결합 키나제 1(TBK1)/IRF3 축은 유형 I IFN의 유도, 수지상 세포(DC)의 활성화 및 CD8+ T-세포-매개 항종양 면역력을 활성화하기 위한 종양 항원의 교차 제시를 초래한다. STING 신호전달은 또한 활성화된 B 세포(NF-κB) 신호전달 축의 핵인자 카파-경쇄 증강 인자를 활성화시켜 염증유발 반응을 일으키지만 항종양 면역력에 필요한 DC 및 CD8+ T-세포의 활성화에는 영향을 미치지 않는다.

[0595] 2'3' cGAMP를 인식하면 STING은 골지체를 통해 소포체에서 전위되어 TANK 결합 키나제 1(TBK1)의 모집과 전사 인자 IRF3 및 NF-κB의 활성화를 허용한다. STING의 카르복실 말단 테일(C 말단 테일 또는 CTT) 영역은 TBK1을 활성화하고 IRF3의 인산화를 자극하는 데 필요하고 충분하며; 또한 NF-κB 신호전달에도 관여한다. CTT는 STING 인산화 및 IRF3 모집에 필요한 서열 모티프를 포함하는 약 40개 아미노산의 구조화되지 않은 스트레치이다. IRF3 및 NF-κB 다운스트림 신호전달은 척추동물 종 사이에서 보존되는 STING의 C-말단 테일(CTT) 내의 특정 서열 모티프에 기인한다. IRF3-, TBK1- 및 TRAF6-결합 모듈을 포함하는 CTT의 모듈 모티프는 세포 신호 및 면역 반응의 강도와 특이성을 제어한다.

[0596] STING CTT 개별 요소의 종 및 해당 특성에 따라 IRF3 및 NF-κB 다운스트림 응답이 영향을 받을 수 있으며 때로는 반대이다. STING CTT 요소는 두 신호 경로 사이의 균형을 지시하고 미세하게 조정하여 다른 생물학적 반응을 유발한다. 예를 들어, 인간 및 마우스 면역 세포에서 STING 의존성 IRF3 활성화는 주로 유형 I 인터페론 반응을 초래한다. 인간 세포에서 STING 신호전달은 또한 TRAF6 모집을 통해 정규 및 비정규 NF-κB 경로를 통해 전염증 반응을 유도한다. 인간 STING 잔기 S366(예를 들어, SEQ ID NO: 305-309 참조)은 IRF3 결합에 필요한 CTT의 LxIS 모티프의 일부인 1차 TBK1 인산화 부위인 반면, 잔기 L374를 포함하는 제2 PxPLR 모티프는 TBK1 결합에 필요하다. LxIS 및 PxPLR 모티프는 모든 척추동물 STING 대립유전자에서 고도로 보존된다. 다른 종에서 STING 신호전달은 주로 NF-κB 신호전달 축의 활성화를 초래한다. 예를 들어, NF-κB 신호전달의 과활성화를 담당하는 제브라피쉬 CTT는 인간 및 다른 포유동물 STING 대립유전자에 존재하지 않는 극단적인 C-말단에 고도로 보존된

PxExxD 모티프가 있는 확장을 포함하며; 이 모티프는 종양 괴사 인자 수용체 관련 인자 6(TRAF6) 결합 부위와 유사성을 공유한다. 인간 STING 신호전달에서 TRAF6의 역할은 필수적이지 않지만 TRAF6 모집은 제브라피쉬 STING 유도 NF-κB 활성화에 필수적이다. 인간 STING이 제브라피쉬 STING CTT 모듈 DPVETTDY를 포함하도록 설계된 인간-제브라피쉬 STING 키메라는 NF-κB 활성화의 100배 이상 활성화를 유도하였으며, 이는 이 영역이 향상된 NF-κB 신호 활성화를 지시하는 데 필요하고 충분함을 나타낸다. 제브라피쉬 CTT를 첨가하면 STING 인터페론 반응이 증가하였다(문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) Cell Reports 27:1165-1175] 참조).

[0597] IRF3와 NF-κB 신호전달 사이의 균형에서 종 간의 차이는 NF-κB 신호전달이 감소되고/거나 선택적으로 IRF3 신호전달이 증가된 변형된 STING 단백질을 생성하기 위해 여기서 이용되어 STING 단백질이 전달되고 발현될 때 TME에서 결과적인 반응은 변형되지 않은 STING 단백질과 비교하여 증가된 항종양/항바이러스 반응이다.

[0598] 일부 구현예에서, NF-κB 신호전달 활성이 낮거나 없는 종으로부터의 STING 단백질은 본원에 기재되거나 당업자에게 알려진 임의의 면역자극성 박테리아를 비롯한 전달 비히클 뿐만 아니라 종양용해 벡터, 미니세포, 엑소좀, 리포솜을 포함하는 바이러스 벡터 및 세포 치료에 사용되고 박테리아 및 종양용해 벡터와 같은 비히클을 전달하는 데 사용되는 다른 전달 비히클에 제공된다.

[0599] 비-인간 STING 단백질은 하기 종으로부터의 STING 단백질일 수 있으나 이로 제한되지 않는다: 태즈메이니아 데빌(*사르코필루스 하리시이(Sarcophilus harrisii)*; SEQ ID NO: 349), 마모셋(*칼리트릭스 야쿠스(Callithrix jacchus)*; SEQ ID NO: 359), 소(*보스 타우루스(Bos taurus)*; SEQ ID NO: 360), 고양이(*펠리스 카투스(Felis catus)*; SEQ ID NO: 356), 타조(*스트루티오 카멜루스 오스트랄리스(Struthio camelus australis)*; SEQ ID NO: 361), 따오기 *니포니아 니폰(Nipponia nippon)*; SEQ ID NO: 362), 실러캔스 *라티메리아 칼룸내(Latimeria chalumnae)*; SEQ ID NO: 363-364), 야생돼지 *수스 스크로파(Sus scrofa)*; SEQ ID NO: 365), 박쥐(*로우세투스 애깁티아쿠스(Rousettus aegyptiacus)*; SEQ ID NO: 366), 바다소(*트리케쿠스 마나투스 라티로스트리스(Trichechus manatus latirostris)*; SEQ ID NO: 367), 은상어(*칼로린쿠스 밀리이(Callorhinchus milii)*; SEQ ID NO: 368), 및 마우스(*무스 무스쿨루스(Mus musculus)*; SEQ ID NO: 369). 이러한 척추동물 STING 단백질은 인간 세포에서 면역 신호전달을 쉽게 활성화시키며, 이는 STING 신호전달의 분자 기전이 척추동물에서 공유됨을 나타낸다(문헌[de Oliveira Mann 등 (2019) *Cell Reports* 27:1165-1175] 참조).

[0600] 다른 구현예에서, 비-인간 STING 단백질은 상기 기재된 인간 STING의 것에 상응하는 비-인간 STING의 상응하는 좌위에서 항시적 STING 활성화 및 기능-획득 돌연변이 중 임의의 것을 함유한다 (하기 실시예 17 참조, 이는 다양한 종에서 예시적인 정렬 및 상응하는 돌연변이를 제공하며, 또한 도 1-13 참조).

[0601] 다른 구현예에서, STING 단백질의 키메라가 제공된다. 키메라에서, 제1 종의 STING 단백질의 NF-κB 신호전달/활성을 부여하거나 이에 참여하는 CTT 영역 또는 이의 부분(들)은 제2 종의 상응하는 CTT 또는 이의 부분(들)으로 대체되고, STING 단백질은 인간보다 낮거나 매우 적은 NF-κB 신호 활성을 갖는다. 일반적으로 제1 종은 인간이고 대체 CTT 또는 이의 일부는 태즈메이니아 데빌, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 따오기, 실러캔스 및 은상어와 같은 종의 STING에서 유래하며, 이는 NF-κB 활성이 훨씬 낮다. 이에 의해 항종양 활성에 중요하고 NF-κB 활성이 제한되거나 전혀 없는 유형 I 인터페론을 유도하는 STING 단백질이 생성되는데, 이는 항종양 요법에서 바람직하지 않다. 키메라는 유형 I 인터페론 활성을 항시적으로 증가시키거나 유지되게 하기 위해 상응하는 좌위에서 인간 항시적 STING 활성화 및 기능-획득 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다. 모든 구현예에서, TRAF6 결합 모티프는 항종양 치료제에서 바람직하지 않은 활성을 추가로 감소 또는 제거하기 위해 결실될 수 있다. 이들 비-인간 STING 단백질, 키메라 및 돌연변이체는 종양용해성 바이러스 벡터, 세포 요법에 사용되는 세포, 예를 들어 줄기 세포 및 T-세포, 엑소좀, 미니세포, 리포좀, 및 본원에 기재된 면역자극성 박테리아를 포함하여 본원에 기재되거나 당업자에게 알려진 것과 같은 전달 비히클에 제공되며, 이는 종양-체류 면역 세포에 축적되고 인코딩된 단백질을 종양 미세환경 및 종양에 전달한다. 비-인간 STING 단백질, 변형된 STING 단백질, 및 STING 키메라는 본원에 기재된 바와 같은 종양의 치료를 위한 치료제로서 사용하기 위한 것, 또는 당업자에게 알려진 다른 방법에서의 사용을 위한 것이다. STING 단백질, 전달 비히클 및 인코딩 핵산을 함유하는 약학적 조성물도 제공된다.

[0602] **d.세포기질성 DNA/RNA 센서 및 이의 항시적 변이체로서 작용하는 다른 유전자 생성물**

[0603] 세포질 핵산을 감지하거나 상호작용하는 다른 유전자 생성물은 RIG-I 및 MDA5(흑색종 분화 관련 단백질 5)를 포함하는 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I) 유사 수용체(RLR)이다. RLR은 바이러스 dsRNA 및 박테리아에 의해 분비되는 핵산의 세포질 센서이며 RIG-I, MDA5 및 LGP2(유전학 및 생리학 연구소 2)를 포함한다. 바이러스 dsRNA와 같은 리간드가 결합하면 RIG-I 및 MDA5가 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 관련 인자(TRAF)를 모집하는 미토콘드

리아 항바이러스 신호 어댑터 단백질 또는 MAVS를 활성화하여 미토콘드리아 외막의 복합체에서 신호전달 복합체를 조립한다. 다운스트림 신호 구성요소는 TRAF에 의해 추가로 모집되어 IRF3(인터페론 조절 인자 3), IRF7, NF-κB(활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄-인핸서) 및 AP-1(활성제 단백질 1)의 인산화 및 활성화를 유발한다. 그 결과, IFN, 전염증성 사이토카인, 및 병원체 제거에 관여하는 다른 유전자의 발현이 유도된다(예를 들어, Lu and MacDougall (2017) Front. Genet. 8:118 참조). STING과 마찬가지로 기능-획득 돌연변이로 인한 MDA5 및 RIG-I의 항시적 활성화는 유형 I IFN의 유도를 유도하며, 이는 면역자극성 박테리아에서 항종양 면역 반응을 향상시키는 데 활용할 수 있다.

[0604] i.RIG-I

[0605] DDX58(DEXD/H-박스 헬리카제 58)로도 알려진 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I)은 항시적 활성화가 비정형 스미스-마제니스 증후군과 같은 인터페론병증의 발병과 관련이 있는 또 다른 단백질이다. MDA5/IFIH1과 같은 RIG-I는 RIG-I 유사 수용체(RLR) 계열의 구성원이며 바이러스 dsRNA의 검출에서 기능하는 925-잔기 세포질 패턴 인식 수용체이다. RIG-I는 유형 I 및 유형 III IFN 및 전염증성 사이토카인의 발현을 촉진하는 독립적인 경로를 통해 바이러스 RNA에 대한 내재성 면역 반응을 개시한다(예를 들어, 문헌[Jang 등 (2015) Am. J. Hum. Genet. 96: 266-274, Lu and MacDougall (2017) Front. Genet. 8:118).

[0606] 특징적인 치아 기형은 없지만 녹내장, 대동맥 석회화 및 골격 이상을 포함한 다양한 표현형을 가진 비정형 스미스-마제니스 증후군은 레티노산 유도성 유전자 I(RIG-I)를 인코딩하는 DEXD/H-박스 헬리카제 58 유전자(DDX58)의 돌연변이에 의해 유발되는 것으로 밝혀졌다. 특히, DDX58의 돌연변이 E373A 및 C268F는 RIG-I에서 기능-획득을 유발하는 것으로 확인되었다. 돌연변이된 DDX58의 증가된 양은 NF-κB 리포터 유전자 활성의 기본 수준의 상당한 증가와 연관되었으며, 이 활성은 dsRNA 유사체 폴리(I:C)로의 자극에 의해 추가로 증가되었다. RIG-I 돌연변이는 또한 기초 수준에서 IRF3 인산화 및 이량체화를 기저 수준에서 유도하고, 기저 세포와 폴리(I:C) 형질주입된 HEK293FT-세포 둘 다에서 IFNB1, 인터페론 자극 유전자 15(ISG15) 및 케모카인(C-C 모티프) 리간드 5(CCL5)의 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 돌연변이된 DDX58/RIG-I가 항시적 활성화를 초래하여 IFN 활성 및 IFN-자극된 유전자 발현을 증가시킨다는 것을 나타낸다(예를 들어, Jang *et al.* (2015) *Am. J. Hum. Genet.* 96:266-274; 및 Lu and MacDougall (2017) *Front. Genet.* 8:118). 본원에 제공된 종양-표적화 면역자극성 박테리아는 E373A 및 C268F와 같은, 그러나 이로 제한되지 않는 기능-획득 돌연변이를 단독으로 또는 조합으로 갖는 RIG-I/DDX58(예를 들어, SEQ ID NO: 311 참조)을 인코딩하도록 변형될 수 있다.

[0607] ii.MDA5/IFIH1

[0608] 또 다른 인터페론병증 유전자는 세포질 DExD/H 박스 RNA 수용체의 RIG-I 유사 계열의 구성원인 흑색종 분화 관련 단백질 5(MDA5)라고도 하는 헬리카제 C 도메인 함유 단백질 1(IFIH1)로 IFN 유도된다. IFIH1에 의해 인코딩된 MDA5는 1,025개 아미노산의 세포질 패턴 인식 수용체로서, 세포질에서 바이러스 이중 가닥 RNA(dsRNA)와 분비된 박테리아 핵산을 감지하고 어댑터 분자인 MAVS(미토콘드리아 항바이러스-신호전달 단백질)를 통해 유형 I IFN 신호전달을 활성화한다. MAVS는 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 관련 인자(TRAF)를 모집하고, 이는 차례로 다운스트림 신호전달 구성요소를 모집하여 IRF3(인터페론 조절 인자 3), IRF7, NF-κB(활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄-증강제), 및 AP-1(활성화제 단백질 1)의 인산화 및 활성화를 초래한다. 이는 IFN, 전염증성 사이토카인 및 병원체 제거에 관여하는 다른 유전자의 발현을 초래한다(예를 들어, Rutsch *et al.* (2015) *Am. J. Hum. Genet.* 96:275-282; Rice *et al.* (2014) *Nat. Genet.* 46(5):503-509; 및 Lu and MacDougall (2017) *Front. Genet.* 8:118).

[0609] 기능-획득(GOF) *IFIH1* 변이체는 눈에 띄는 혈관 염증을 특징으로 하는 아이카르디-구티에르 증후군(AGS) 및 싱글레톤-마르텐 증후군(SMS)을 포함한 자가면역 장애가 있는 대상체에서 발생한다. AGS는 특히 뇌와 피부에 영향을 미치는 염증성 질환으로 인터페론-유도 전사체의 상향조절이 특징이다. AGS는 일반적으로 DNA 엑소뉴클레아제 TREX1, RNase H2 엔도뉴클레아제 복합체의 3개 비대립유전자 구성요소, 데옥시뉴클레오사이드 트리포스페이트 트리포스포하이드롤라제 SAMHD1, 및 이중 가닥 RNA 편집 효소 ADAR1을 인코딩하는 임의의 유전자의 돌연변이로 인해 발생한다. AGS가 있는 일부 환자는 이러한 유전자에 돌연변이가 없지만 IFIH1에 GOF 돌연변이가 있으며, 이는 이 유전자가 AGS에도 관련되어 있음을 나타낸다. 싱글톤-메르텐 증후군은 혈관(예를 들어, 석회화), 치아(예를 들어, 조기 발병 치주염, 치근 흡수) 및 뼈(예를 들어, 골감소증, 말단 골용해, 골다공증)의 이상을 특징으로 하는 상염색체 우성 장애이다. 인터페론 시그니처 유전자는 IFIH1의 GOF 돌연변이와 연결된 싱글톤-메르텐 증후군 환자에서 상향조절된다(예를 들어, Rice 등 (2014) Nat. Genet. 46(5):503-509; 및 Rutsch 등 (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282).

[0610] 야생형 IFIH1, 및 AGS 환자에서 확인된 6개의 IFIH1 GOF 돌연변이체(R720Q, R779H, R337G, R779C, G495R, D393V)의 IFN-β 리포터 자극 활성을, 낮은 수준의 내인성 바이러스 RNA 수용체를 발현하는 HEK293T-세포에서 비교하였다. 야생형 IFIH1은 긴(> 1kb) dsRNA 유사체 폴리이노신-폴리시티딜산(폴리(I:C))의 결합 시 유도되었지만, 짧은 162 bp dsRNA에 의해 유도되지 않았으며, 외인성 RNA의 부재 하에 최소 활성을 가졌다. IFIH1 돌연변이체는 폴리(I:C)에 대한 강력한 신호전달 외에 짧은 162 bp dsRNA에 대한 반응으로 IFN 신호전달의 상당한 유도를 나타내었다. 돌연변이체는 또한 외인성 리간드의 부재 하에 4-10배 더 높은 수준의 기준선 신호전달 활성을 나타내었다(예를 들어, Rice 등 (2014) Nat. Genet. 46(5):503-509 참조).

[0611] 또 다른 기능-획득 IFIH1 돌연변이인 R822Q는 유형 I IFN 생성을 유발하고 조기 동맥 석회화와 치아 염증 및 흡수를 유발하여 싱글톤-메르텐 증후군을 유발하는 것으로 확인되었다. HEK293T-세포(가장 낮은 내인성 IFIH1 발현 수준을 가짐)를 사용하여 야생형 및 R822Q MDA5를 과발현시켰다. 야생형 IFIH1 발현은 용량 의존적 방식으로 IFNB1(인터페론, 베타 1, 섬유아세포)의 발현을 증가시킨 반면, 돌연변이된 IFIH1은 약 20배 더 많은 IFNB1 발현을 유도하였다. dsRNA 유사체 폴리(I:C)로 자극한 후, *R822Q IFIH1*은 야생형 IFIH1보다 더 높은 수준의 IFNB1 발현을 초래하였으며, 이는 *R822Q IFIH1*이 비자기 dsRNA에 대해 과활성임을 나타낸다. 싱글톤-메르텐 증후군 환자의 전혈 시료에서 *IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSG15, RSAD2* 및 *SIGLEC1*과 같은 인터페론 시그니처 유전자의 발현도 더 높았으며, 이는 R822Q IFIH1에 의해 IFNB1의 더 높은 발현 수준과 일치하였다(예를 들어, Rutsch 등 (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282 참조).

[0612] 또 다른 *IFIH1* GOF 돌연변이인 A489T가 있는 환자에서 관찰된 인터페론 신호는 유형 I 인터페론병증을 나타내며; *IFIH1* A489T는 증가된 인터페론 생산 및 아동형 루푸스, AGS 및 SMS와 유사한 표현형과 관련이 있다(예를 들어, Bursztejn 등 (2015) Br. J. Dermatol. 173(6):1505-1513 참조). A489T 변이체는 긴 dsRNA 유사체 폴리(I:C)뿐만 아니라 짧은 dsRNA로 자극한 후 IFN 유도를 초래하였다. IFIH1에서 2개의 추가 기능-획득 돌연변이, T331I 및 T331R가 IFN-유도 전사체의 상당한 상향 조절을 나타내는 SMS 표현형 환자에서 식별되었다. T331I 및 T331R 변이체는 MDA5의 관찰된 항시적 활성화와 일치하여 외인성 dsRNA 리간드가 없는 경우에도 IFN-β의 발현을 증가시켰다(예를 들어, Lu and MacDougall (2017) Front. Genet. 8:118 참조).

[0613] A946T는 유형 I IFN의 생성을 증가시켜 염증을 촉진하고 자가면역의 위험을 증가시키는 또 다른 IFIH1 GOF 돌연변이이다. IFIH1의 A946T 돌연변이는 STING의 TMEM173 R232 대립유전자 및 G207E GOF 돌연변이와 결합될 때 부가 효과를 일으켜 SAVI와 유사한 특징을 갖는 심각한 조기 발병 표현형을 초래한다(예를 들어, Keskitalo 등 (2018) preprint, doi.org/10.1101/394353에서 사용 가능). G821S는 마우스 모델에서 자발적으로 발달된 루푸스-유사 자가면역 증상을 유도하는 것으로 나타난 IFIH1의 GOF 돌연변이이며(예를 들어, Rutsch 등 (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282 참조), 한편 AGS를 가진 개체에서 확인된 IFIH1 미스센스 돌연변이 A452T, R779H 및 L372F는 유형 I 인터페론 과잉생산을 유발하는 것으로 나타났다(예를 들어, Oda *et al.* (2014) *Am. J. Hum. Genet.* 95:121-125).

[0614] 본원에 제공된 종양-표적화 면역자극성 박테리아는 단독으로 또는 조합으로 T331I, T331R, R337G, L372F, D393V, A452T, A489T, G495R, R720Q, R779H, R779C, G821S, R822Q, 및 A946T로부터 선택되는 기능 획득 돌연변이로 MDA5/IFIH1(예를 들어 SEQ ID NO: 310)을 인코딩하도록 변형될 수 있다.

[0615] **iii.IRF7**

[0616] IRF7(또는 IRF-7)의 항시적 활성 형태에는 IRF7(S477D/S479D), IRF7(S475D/S477D/S479D), 및 IRF7(S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D)을 포함하여 상이한 C-말단 세린이 인산모방체 Asp로 치환된 돌연변이가 포함된다. IRF7(S477D/S479D)은 IFNA 및 RANTES 유전자 발현을 위한 강력한 트랜스활성인자(transactivator)이며, 바이러스 감염이 없는 경우에도 유전자 발현을 자극한다. IRF7(S475D/S477D/S479D) 및 IRF7(S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D)은 IRF7(S477D/S479D)의 트랜스활성화 활성을 추가로 증가시키지 않지만, 모든 3개 돌연변이체의 모든 추가 트랜스활성화 활성은 바이러스 감염에 의해 추가로 자극된다. 비감염 세포의 핵에 국한되는 돌연변이체 IRF7(Δ247-467)은 IRF7의 매우 강력한 항시적 형태이며; 이는 비자극 세포 및 바이러스-감염 세포에서 야생형 IRF7보다 1500배 이상 더 높은 전사를 활성화한다(예를 들어, Lin 등 (2000) J. Biol. Chem. 275(44):34320-34327 참조). 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 잔기 475-477, 479, 483 및 487에 대체를 갖는 것 및 아미노산 결실을 갖는 것을 포함하여 항시적 활성 IRF7 돌연변이체를 인코딩하고 발현할 수 있다. 면역자극성 박테리아는 프로모터 및 인간을 포함한 포유동물 숙주에 의해 인식되는 임의의 다른 원하는 조절 신호의 제어 하에 플라스미드에서 이러한 단백질을 인코딩한다.

[0617] **e.다른 유형 I IFN 조절 단백질**

[0618] 유형 I IFN 반응을 활성화하는 DNA/RNA의 인식에 관여하는 다른 단백질은 항시적 유형 I IFN 발현을 생성하도록 돌연변이될 수 있다. 비변형 및/또는 변형된 단백질은 유형 I IFN의 발현을 증가시키기 위해 종양 미세환경, 예를 들어 종양-체류 면역 세포에 단백질을 전달하는 데 사용하기 위해 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 인코딩될 수 있다.

[0619] 이러한 단백질에는 TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9(DDX9), DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 및 SNRNP200로 표기된 단백질이 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

유전자	인코딩된 단백질	활성/기능
TRIM56	3 부(tripartite) 모티프-함유 단백질 56/ E3 유비퀴틴-단백질 리가제 TRIM56	dsDNA 자극에 반응하여 STING 의 이량체화를 촉진하여, IFN-β 의 생성을 이끌어냄; IFNB1 및 IFN-자극 유전자 *ISG15*, *IFIT1/ISG56*, *CXCL10*, *OASL* 및 *CCL5* 의 세포외 dsRNA-유도 발현을 강화시킴; TLR3 신호전달의 양성 조절자
RIP1/RIPK1	수용체-상호작용 세린/트레오닌 단백질 (키나제) 1	사멸 수용체 리게이션, 병원체 인식 수용체의 활성화 및 DNA 손상 후 염증성 및 세포-사멸 신호의 전달(프로그래밍된 괴사); NF-κB 를 간접적으로 활성화시킴; 마우스에서 LPS-유도 IFN-β 합성을 지시함
Sec5 (EXOC2)	세포외낭 복합체 구성요소 2	원형질막 상에서 융합 부위를 갖는 세포외수송 소낭의 도킹에 관여하는 세포외낭 복합체의 구성요소; 세포내 DNA 자극 후 STING 및 TBK1 와 함께 공동-위치하여 유형 I IFN 생성을 유도함
TRAF2	TNF 수용체-관련 인자 2	NF-κB 및 JNK/MAPK8 의 활성화를 조절함; 유형 I IFN 유도를 매개함
TRAF3	TNF 수용체-관련 인자 3	NF-κB 및 MAP 키나제의 활성화를 조절함; IRF3 의 활성화를 매개함; 유형 I IFN 유도를 매개함; 사이토카인 생성을 매개함
TRAF6	TNF 수용체-관련 인자 6	NF-κB, JUN 및 AP-1 을 활성화시킴; 바이러스 감염 및 세포내 dsRNA 에 반응하여 유형 I IFN

[0620]

유전자	인코딩된 단백질	활성/기능
		생성을 유도함; 전염증성 사이토카인의 생성을 유도함
STAT1	신호 전달자 및 전사 활성자 1	ISGF3 전사 인자의 일부를 형성하며 이는 IFN-자극 반응 요소(ISRE)에 결합하여 IFN-자극 유전자(ISG)의 전사를 활성화시킴
LGP2 (DHX58)	유전학 및 생리학 실험실 2 / 가능한 ATP-의존적 RNA 헬리카제 DHX58	RIG-I/DDX58-매개 및 IFIH1/MDA5-매개 항바이러스 신호전달을 조절함
DDX3 (DDX3X)	ATP-의존적 RNA 헬리카제 DDX3X	유형 I IFN의 생성을 촉진함; 바이러스 RNA 센서로서 작용함; TBK1 및 IKBKE-의존적 IRF3 활성화에 관여하여, IFNB의 유도를 이끌어냄; IFNB 프로모터와 회합됨; MAVS 및 RIG-I와 회합되어 감염의 초기 단계에서 신호전달을 유도함; MDA5에 결합하여 dsRNA의 인식을 증강시킴
DHX9/DDX9	DExD/H-박스 헬리카제 9 / ATP-의존적 RNA 헬리카제 A	바이러스 핵산을 감지함; 비-자기 DNA에 대한 숙주 반응을 MyD88-의존적 방식으로 유도함; MAVS와 상호작용하여, 바이러스 감염에 대한 NF-κB-매개 내재성 면역력을 자극시키고 IRF3 및 MAPK 경로를 활성화시킴; IL-6 및 IFN-β의 바이러스-유발 유도를 강화시킴
DDX1	ATP-의존적 RNA 헬리카제 DDX1	바이러스 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 감지하며, NF-κB 신호전달 경로를 활성화시키고, 유형 I IFN 및 전염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 멀티-헬리카제-TRIF 복합체의 구성요소
DDX21	핵소체 RNA 헬리카제 2	바이러스 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 감지하며, NF-κB 신호전달 경로를 활성화시키고, 유형 I IFN 및 전염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 멀티-헬리카제-TRIF 복합체의 구성요소
DHX15 (DDX15)	Pre-mRNA-스플라이싱 인자 ATP-의존적 RNA 헬리카제 DHX15	MAVS와 상호작용하여 유형 I IFN 및 전염증성 사이토카인 생성을 유도하는 바이러스 RNA 센서; IRF3, NF-κB, 및 MAPK 신호전달을 활성화시킴
DHX33 (DDX33)	ATP-의존적 RNA 헬리카제 DHX33	MAVS와 상호작용하고 유형 I IFN 반응을 유발하는 바이러스 dsRNA 센서; NF-κB, IRF3, 및 MAPK 신호전달 경로를 활성화시킴; NLRP3

[0621]

유전자	인코딩된 단백질	활성/기능
		인플라마솜(inflammasome)을 활성화시켜, 전염증성 사이토카인의 분비를 이끌어냄
DHX36 (DDX36)	ATP-의존적 DNA/RNA 헬리카제 DHX36	바이러스 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 감지하며, NF-κB 신호전달 경로를 활성화시키고, 유형 I IFN 및 전염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 멀티-헬리카제-TRIF 복합체의 구성요소
DDX60	가능한 ATP-의존적 RNA 헬리카제 DDX60	바이러스 RNA 및 DNA 를 감지함; RIG-I 유사 수용체와 복합체를 형성하여 항바이러스 활성을 촉진함; 바이러스 감염에 반응하여 RIG-I 및 MDA5-의존적 유형 I IFN 및 IFN-유도적 유전자 발현을 양성적으로 조절함; ssRNA, dsRNA, 및 dsDNA 에 결합함; dsRNA 에의 RIG-I 의 결합을 촉진함
SNRNP200	U5 작은 핵 리보핵단백질 200 kDa 헬리카제	바이러스 RNA 를 감지/결합하고 TBK1 과 상호작용하여 IRF3 활성화 및 유형 I IFN 생성을 촉진함

[0622]

[0623] 기능-획득 변이체는 예를 들어 스크리닝 및/또는 돌연변이유발에 의해 생성될 수 있다. 부위 지정 돌연변이유발은 시험관 내에서 수행되어 더 높은 수준 및/또는 항시적 유형 I IFN 발현을 유도하는 활성이 강화된 돌연변이를 식별할 수 있다. 온전한 게놈 DNA는 자가면역 및 자가염증 증상을 경험하는 관련이 없는 환자와 건강한 개인으로부터 얻을 수 있으며, 그 발현이 증가되거나 항시적인 유형 I IFN 발현을 유도하는 다른 생성물을 선별하고 식별할 수 있다. 전체 엑솜 시퀀싱을 수행할 수 있고 인트론 및 엑손을 분석하여 유형 I 인터페론의 증가 또는 항시적 발현과 관련된 경로에 돌연변이가 있는 단백질을 식별할 수 있다. 돌연변이 식별 후, 식별된 돌연변이(들)가 있거나 없는 전장 유전자를 인코딩하는 cDNA 분자는 유형 I 인터페론의 발현을 측정하는 리포터 세포주로 형질주입된다. 예를 들어, 루시페라제의 발현이 IFN-β에 대한 프로모터의 제어 하에 놓이는 리포터 세포주가 생성될 수 있다. 항시적으로 활성인 기능-획득 돌연변이는 IFN-β의 발현을 촉진하는 반면, 자극되지 않은 야생형 단백질은 그렇지 않다. 자극은 바이러스 감염, 박테리아 감염, 박테리아 핵산, LPS, dsRNA, 폴리(I:C)에 의해, 또는 단백질 리간드(예를 들어, CDN)의 외인성 수준 증가에 의한 것일 수 있다. 식별된 단백질은 또한 대상체에서 관심 항원(들)에 대한 면역 반응을 향상시키는 것을 포함한다. 면역 반응은 하기 중 하나 이상을 특징으로 하는 세포성 또는 체액성 면역 반응을 포함한다: (i) 유형 I 인터페론 경로 신호전달 자극; (ii) NF-κB 경로 신호전달 자극; (iii) 염증 반응 자극; (iv) 사이토카인 생성 자극; (v) 수지상 세포 발달, 활성 또는 동원의 자극; (vi) 그 발현이 면역 반응을 향상시키는 생성물을 나타내는 다른 반응; 및 (vii) (i) 내지 (vi) 중 어느 하나의 조합.

[0624] **3.항체 및 항체 단편**

[0625] 항체 공학의 발전으로 특히 제조, 조직 침투 및 사용 용이성 측면에서 기존의 단일클론 항체와 비교하여 많은 개선이 있는 재조합 항체 단편이 생성되었다. 이의 예는 일반적으로 $(G_4S)_3$ 서열인 가요성 펩타이드 링커에 의해 함께 연결된 항체 결합 부위의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역으로 구성된 단일 사슬 단편 가변(scFv)이다(Weisser *et al.* (2009) *Biotechnol. Adv.* 27(4):502-520). 다른 예는 scFv의 V_H 도메인이 Fc 영역에 연결된 scFv-Fc 항체 단편, 뿐만 아니라 당업자에게 알려진 항체의 이량체와 다량체 및 다른 조합과 형태를 포함한다. 항체 단편 및 다른 작제물은 플라스미드 상에 인코딩될 수 있고 본원에 예시된 바와 같이 면역자극성 박테리아에 의해 전달될 수 있는 방식으로 항원의 표적화를 허용한다. 표적화하는 항원의 예는 아래 실시예에서 논의된 것을 포함한 종양 항원, 및 아래와 본원 어디에서나 논의된 다른 예시적인 표적을 포함한다. 당업자에게 알려진 임의의 표적이 포함되며, 이는 회전배열(회전배열) 또는 구조의 변화 시 형성되는 네오항원이다.

[0626] **a.TGF-β**

[0627] 형질전환 성장 인자 베타(TGF-β)는 배아 발생, 상처 치유, 혈관 신생 및 면역 조절에서 수많은 역할을 하는 다

면발현성(pleiotropic) 사이토카인이다. 이는 포유류 세포, TGF-β1, TGF-β2 및 TGF-β3의 세 가지 이소형으로 존재하며; TGF-β1은 면역 세포에서 가장 우세하다(예를 들어, Esebanmen 등 (2017) Immunol. Res. 65:987-994 참조). 면역저해제로서의 TGF-β의 역할은 틀림없이 가장 지배적인 기능이다. 특히, 종양 미세환경에서 크립틱 형태로부터의 활성화는 DC 및 항원 특이적 T-세포를 관용하는 능력에 대해 뚜렷한 면역억제 효과를 갖는다. TGF-β는 또한 Th1 CD4+ T-세포를 면역억제성 Treg로 직접 전환시켜 종양 내성을 추가로 촉진할 수 있다(예를 들어, Travis 등 (2014) Annu. Rev. Immunol. 32:51-82 참조). 종양-특이적 면역억제 기능을 기초로 하고 알려진 암세포 성장 및 전이 촉진 특성과 상관없이, TGF-β의 저해는 암 치료 표적이다. 높은 수준의 TGF-β 신호전달은 결장직장암(CRC), 간세포암종(HCC), 췌관 선암종(PDAC) 및 비소세포폐암(NSCLC)을 포함한 여러 인간 종양 유형에서 입증되었다(Colak *et al.* (2017) *Trends Cancer* 3(1):56-71). TGF-β의 전신적 억제는 수용할 수 없는 자가면역 독성을 유발할 수 있으며, 그 억제는 종양 미세환경에 국한되어야 한다. 이를 달성하는 한 가지 방법은 TGF-β 결합을 위한 유인로서 작용하는 가용성 TGF-β 수용체를 생성하는 것이다(예를 들어, Zhang 등 (2008) J. Immunol. 181:3690-3697 참조). 이와 같이, 본원에 제공된 TGF-β 수용체 유인을 함유하는 종양 표적 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경으로부터 TGF-β에 결합 및 제거함으로써 종양 면역 관용을 방해하고 항종양 면역력을 자극할 수 있다.

[0628] TGF-베타 결합 유인 수용체에 더하여, 종양 미세환경에서 TGF-β에 결합하고 이를 제거하거나 감소시켜 종양 면역 관용을 방해하고 항종양 면역력을 자극할 수 있는 다른 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제가 포함된다. 이의 예는 항-TGF-베타 항체 또는 항체 단편, 항-TGF-베타 수용체 항체 또는 항체 단편, 및 가용성 TGF-베타 길항제 폴리펩타이드이다.

[0629] 종양 미세환경, 종양, 특히 종양-체류 면역 세포에 축적되고, 예를 들어 TGF-베타 결합 유인 수용체(TGF-β 수용체 유인), 항-TGF-베타 항체 또는 항체 단편, 항-TGF-베타 수용체 항체 또는 항체 단편, 및 가용성 TGF-베타 길항제 폴리펩타이드를 포함하여 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 항체 단편은 scFv 및 scFv-Fcs를 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0630] **b.이중특이적 scFvs 및 T-세포 연계자**

[0631] scFv의 사용은 종종 긴 링커에 의해 함께 연결된 하나 이상의 scFv 단편(이중특이적, 삼중특이적 등)의 사용을 통해 표적에 대한 결합 원자가를 증가시킴으로써 개선되었다. 이중특이적 T-세포 연계자(상표명 BiTE® 하에 입수 가능함) 작제물은 암 면역요법에 사용되는 인공 이중특이적 단일클론 항체의 한 부류이며, 2개의 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 연결함으로써 형성되어, 하나의 scFv가 세포독성 T-세포 표면의 CD3에 결합하고, 다른 하나는 특정 종양-연관 항원(TAA)에 결합한다. 따라서 BiTEs®는 MHC 부류 I 또는 공동자극성 분자와 무관하게 T-세포를 종양 세포로 표적화하여 T-세포 활성화, 사이토카인 생산 및 종양 세포 세포독성을 자극한다. 이중특이적 T-세포 연계자(BiTEs®)의 2개 예는 FDA의 승인을 받았으며, 여기에는 종양 항원 EpCAM 및 CD3에 대한 것이고 악성 복수의 치료에 사용되는 카투막소맙(catumaxomab), CD19 및 CD3에 대한 것이고 재발성, 불응성 급성 림프구성 백혈병(ALL)의 치료에 사용되는 블리나투모맙(blinatumomab)이 있다(예를 들어, Ahamadi-Fesharaki *et al.* (2019) *Mol. Ther. Oncolytics* 14:38-56 참조). 다른 이중특이적 T-세포 연계자(BiTEs®)은 예를 들어 암배아 항원(CEA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), EGFR, EphA2, HER2/neu, ADAM17/TACE, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 델타-유사 리간드 3(DDL3), 및 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)을 포함한 여러 가지 항원을 표적화한다. 본원에 예시된 바와 같이, BiTE® 항체는 또한 면역자극성 박테리아에 의한 전달 후 플라스미드로부터 발현될 수 있다.

[0632] **c.항-PD-1, 항-PD-L1 및 항-CTLA-4 항체**

[0633] **i.항-PD-1/항-PD-L1 항체**

[0634] 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)은 면역 반응의 음성 조절에 관여하는 면역억제 수용체이다. 이의 동족 리간드인 PD-L1(프로그램된 사멸-리간드1)은 항원 제시 세포(APC)에서 발현되며, T-세포의 PD-1에 결합하면 CD8+ T-세포 이펙터 기능의 상실을 유발하여 T-세포 관용을 유도한다. PD-L1의 발현은 종종 특정 인간 암에서 종양 공격성 및 감소된 생존과 관련이 있다(예를 들어, Gao 등 (2009) Clin. Cancer Res. 15(3):971-979 참조).

[0635] 항-PD-1(예를 들어, 펨브롤리주맙 및 니볼루맙) 및 항-PD-L1(예를 들어, 아테졸리주맙, 아벨루맙 및 더발루맙) 항체와 같은 면역 체크포인트를 차단하도록 설계된 항체는 T-세포 아네르기를 방지하고 면역 관용을 파괴할 수 있다. 그러나, 치료된 환자의 일부만이 임상적 이점을 나타내고, 종종 자가면역 관련 독성을 나타낸다(예를 들

어, Ribas (2015) *N. Engl. J. Med.* 373(16):1490-1492; 및 Topalian *et al.* (2012) *N. Engl. J. Med.* 366(26):2443-2454). 독성 획득 외에도, 항PD-1/항PD-L1 요법은 종종 내성을 유발하며, 항CTLA-4 항체(예를 들어, 이필리무맙)의 병용은 임상 시험에서 유의한 부가 독성으로 제한된 성공을 보였다. 독성을 제한하고 PD-1/PD-L1 차단의 효능을 향상시키기 위해, scFv 및 scFv-Fc와 같은 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아, 및 PD-1 또는 PD-L1에 대한 당업계에 알려져있고/있거나 본원에 기재된 다른 것은 면역 세포의 활성화와 상승작용을 일으켜 항종양 면역력을 강화할 것이다.

[0636] **ii.항-CTLA-4 항체**

[0637] CD152(분화 클러스터 152)로도 알려진 CTLA-4(세포독성 T-림프구 관련 단백질 4)는 면역 체크포인트로 기능하고 면역 반응을 하향조절하는 또 다른 면역억제 수용체이다. CTLA-4는 조절 T-세포(Treg 또는 T_{reg})에서 항시적으로 발현되고 억제 기능에 기여하지만 활성화 후에만 기존 T-세포에서 상향조절된다. CTLA-4는 T-세포에 억제 신호를 전달하여 면역 체크포인트 역할을 한다. CTLA-4는 T-세포 공동자극 단백질인 CD28과 상동성이며, 두 분자 모두 CD80(B7-1 또는 B7.1로도 알려짐) 및 CD86(B7-2 또는 B7.2로도 알려짐) 리간드에 결합한다. 항원제시세포(APC)에 대해 리간드에 대한 CTLA-4의 결합은 T-세포에 억제 신호를 전달하는 반면, CD28의 결합은 자극 신호를 전달한다.

[0638] T-세포 활성화 후 CTLA-4 수용체가 유도되어 APC 표면의 CD80 및 CD86 리간드에 결합하기 위해 T-세포의 CD28 수용체를 능가한다. CTLA-4는 CD80 및 CD86에 CD28보다 더 큰 친화력과 결합력으로 결합하여 리간드에 대해 CD28을 능가하여 억제 신호를 T-세포에 전달하고 면역억제 반응을 유발한다. T-세포 수용체와 CD28을 통한 T-세포 활성화는 CTLA-4의 발현을 증가시킨다.

[0639] 최적의 T-세포 프라이밍은 T-세포 CD28과 CD80 및/또는 CD86의 리게이션으로 인한 공동자극 신호가 필요하다. CTLA-4가 이러한 리간드에 결합하는 것을 차단하면 T-세포 프라이밍이 향상되고 항종양 면역 반응이 유도된다.

[0640] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 균주는 항-CTLA-4 scFv(예를 들어, 예시적인 인간 항-CTLA-4 scFv 단편에 대해서는 SEQ ID NO: 403 참조), 및 항-CTLA-4 scFv-Fc(예시적인 인간 항-CTLA-4 scFv-Fc 및 scFv-Fc 단편에 대해서는 동시계류중인 PCR 출원 국제 PCT 출원 PCT/US2020/060307호 참조; 또한 실시예 25 참조)와 같으나 이로 제한되지 않는 항-CTLA-4 항체 및 이의 단편을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다.

[0641] **d.추가 예시적인 체크포인트 표적**

[0642] scFv, 또는 이에 대한 임의의 다른 재조합 항체 단편이 제조될 수 있거나 본원에 예시된 예시적인 면역 체크포인트 표적은 하기 표에 열거된 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는다:

체크포인트 표적
CTLA-4
PD-L1 (B7-H1)
PD-L2
PD-1, PD-2
IDO1
IDO2
SIRP 알파 (CD47)
VISTA (B7-H5)
LIGHT
HVEM
CD28
LAG3, TIM3, TIGIT
갈렉틴-9
CEACAM1, CD155, CD112, CD226, CD244 (2B4)
B7-H2, B7-H3, CD137, ICOS, GITR, B7-H4, B7-H6
CD137, CD27, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD137 (4-1BB), 4-1BBL, CD200, CD272 (BTLA), CD160
A2a 수용체, A2b 수용체, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B
OX40, OX-40L, HLA-G, ILT-2/4
KIR, TIM1, TIM4
CLEVER-1/스타빌린-1

[0643]

[0644] **4.면역조절성 단백질의 조합은 상승작용 효과 및/또는 보완 효과를 가질 수 있다**

[0645] 사이토카인은 항종양 면역 반응의 강력한 조절자이다. 사이토카인 조합은 T-세포, NK 세포 및 골수성 세포(수지상 세포 및 대식세포 포함)를 포함하는 다양한 면역 구획에 깊은 상승 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 사이토카인은 수지상 세포에 의한 항원 프라이밍, 내재성 면역 세포 및 항원 특이적 T-세포의 생존과 증식, 및 NK 세포 및 T-세포의 세포독성 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 사이토카인 조합은 생물학적 반응을 최대화하고 항종양 면역력을 강화하기 위해 적절하게 선택되어야 한다. 예를 들어, 간염의 뮤린 모델에서 IFN-α 단독은 바이러스 감염된 세포의 CD8+ T-세포 세포용해 기능을 향상시키는 반면, IL-15 단독은 활성화된 림프구의 증식을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 더불어, 이는 B형 간염(HBV) 감염을 최대한 억제하였다(예를 들어, Di Scala *et al.* (2016) *J. Virol.* 90(19):8563-8574). 또 다른 예에서, 사이토카인 IL-15 + IL-18, 및 IL-15 + IL-21의 조합은 인간 NK 및 T-세포로부터 IFN-γ의 생산을 향상시킬 수 있었다(예를 들어, Strengell 등 (2003) J. Immunol.170(11):5464-5469). 또 다른 예에서, IL-2 + IL-18은 상승작용을 일으켜 IFN-γ 생산을 향상시키고 CD4+ T-세포, CD8+ T-세포 및 NK 림프구의 세포용해 기능을 증가시켰다(예를 들어, Son 등 (2001) Cancer Res. 61(3):884-888). 추가로, IL-12 및 IL-18은 상승작용을 일으켜 인간 T-세포로부터 항원-CD3 T-세포 리게이션-비의존적 IFN-γ 생산을 촉진하는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, Tominaga *et al.* (2000) *Int. Immunol.* 12(2):151-160). 사이토카인의 조합은 T-세포 기능의 강력한 증강제이지만 FDA 승인 항암 사이토카인은 너무 독성이 있어 전신적으로 투여할 수 없으므로 거의 사용되지 않으며 전신 투여되는 사이토카인의 조합은 독성을 악화시킬 뿐이다(예를 들어, Conlon 등 (2019) J. 인터페론 사이토카인 Res. 39(1):6-21).

[0646] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이러한 문제를 해결한다. 사이토카인 조합의 종양-특이적 전달, 및/또는 다른 치료 생성물, 예컨대 본원에 논의된 유형 I 인터페론의 유도제 및 공동자극성 분자, 케모카인, 항체 및 이의 단편을 포함하는 다른 것의 조합을 허용하는 면역조절 단백질과 같은 다중 치료제를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공된다. 이러한 면역자극성 박테리아는 사이토카인 및 다른 치료제의 직접 IV 투여와 관련된 전신 독성 및 약동학적(PK) 책임 없이 강력하고 상승작용적인 면역 활성화를 달성한다.

[0647] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 플라스미드에 인코딩될 수 있는 치료 생성물의 조합에는 예를 들어 2개 이상의 사이토카인; 하나 이상의 사이토카인 및 유형 I IFN의 유도제(예를 들어, STING, IRF3, IRF7, MDA5,

RIG-I 및 항시적으로 활성인 GOF 변이체), 및/또는 공동자극성 분자(예를 들어, 4-1BBL 및 4-1BBLΔcyt); TGF-β 유인 수용체 및 하나 이상의 사이토카인; TGF-β 유인 수용체 및 유형 I IFN의 유도제; TGF-β 유인 수용체, 하나 이상의 사이토카인, 및/또는 유형 I IFN의 유도제, 및/또는 공동자극성 분자; 항체(예를 들어, CTLA-4와 같은 면역 체크포인트에 대한 항체) 및 하나 이상의 사이토카인; 항체 및 유형 I IFN의 유도제; 항체, 하나 이상의 사이토카인, 및/또는 유형 I IFN의 유도제, 및/또는 공동자극성 분자; 공동자극성 분자 작용제(예를 들어, CD40 작용제) 및 하나 이상의 사이토카인; 공동자극성 분자 작용제 및 유형 I IFN의 유도제; 및 공동자극성 분자 작용제, 하나 이상의 사이토카인, 및/또는 유형 I IFN의 유도제, 및/또는 공동자극성 분자를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0648] 하기 논의된 바와 같이, 다중 치료 생성물 발현 카세트는 단일 프로모터 작제물 및/또는 이중/다중 프로모터 작제물, 뿐만 아니라 전사후 조절 요소, 및 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 종결인자, 신호 펩타이드 등과 같은 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 단백질 발현을 증가시키기 위해 최적화된 코돈일 수 있고, 일반적으로 진핵생물 프로모터의 제어 하에 있다. 특정 작제물 및 이의 세부사항은 본원의 다른 곳에서 설명된다.

[0649] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 중에는 면역자극성 단백질(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 공동자극성 분자) 및/또는 종양 미세환경에서 면역 반응을 증가시키는 기능-획득 돌연변이를 갖는 유전자 생성물(예를 들어, 유형 I IFN을 유도하는 세포질 DNA/RNA 센서), 및/또는 항체 및 이의 단편, 및/또는 TGF-β 및/또는 IL-6 유인 수용체와 같은 항종양 반응을 향상시키는 다른 치료제, 및/또는 TGF-β 길항 폴리펩타이드를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 것이 있다. 사이토카인, 기능-획득 생성물/유형 I IFN 경로 단백질, 및/또는 케모카인, 및/또는 공동자극성 분자, 및/또는 항체 및 이의 단편, 예를 들어 단일 사슬 항체, 및 본원에서 논의된 다른 치료 생성물을 인코딩하는 이러한 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경, 종양 및 종양-체류 면역 세포에 우선적으로 침투하는 면역자극성 박테리아를 포함한다. 면역자극성 박테리아는 또한, 게놈이 변형되어 종양-체류 면역 세포에서 세포 사멸을 덜 유도하여 면역자극성 박테리아가 종양-체류 골수성 세포에 축적되어, 다중화된 유전 페이로드의 높은 수준의 이소성 발현을 표적 세포에서 달성하고, 치료 생성물/면역자극성 단백질을 종양 미세환경(TME)에 전달하여, 종양에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함한다. 특히, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 아데노신 영양요구성, *csgD*⁻, *pagP*⁻, *msbB*⁻, 플라젤린⁻(*fliC*⁻/*fljB*⁻), *purI*⁻, *ansB*⁻, *asd*⁻, 및 종양 미세환경 및/또는 종양-체류 골수성 세포에의 표적화 또는 축적을 개선하거나, 안전성 및 내약성(더 높은 용량을 허용함)을 개선하며, 면역억제성 사이토카인 프로파일을 감소시키고, T-세포 품질 및 기능을 개선하며, 건강한 조직에서 복제를 제한하고, 생물막을 제거하며, 항종양 반응을 개선하거나, 본원 어디에서나 논의된 임의의 바람직하고 유리한 특성을 부여하는 것으로 본원에 기재되거나 알려진 임의의 다른 변형을 포함하지만 이로 제한되지 않는 본원에 기재된 바와 같은 최대 약 8개 또는 8개의 변형을 포함한다.

[0650] 면역자극성 박테리아는 특정 종양에 대한 반응을 향상시키기 위해 대상체의 종양에서 유래한 종양 항원과 같은 다른 치료제를 추가로 인코딩할 수 있다. 본원에 제공되고 상기 및 하기에 기재된 임의의 면역자극성 박테리아는 사이토카인, 케모카인, 공동자극성 분자 및 기능-획득 유형 I IFN 경로 생성물(들)과 같은 치료 생성물을 인코딩하도록 변형될 수 있다. 치료 생성물은 숙주에 의해 인식되는 프로모터의 제어 하에 플라스미드, 및 인간, 또는 다른 동물 또는 포유동물과 같은 진핵생물에서 인식되는 임의의 다른 원하는 조절 서열에 인코딩된다. 일반적으로 생성물을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터의 제어 하에 있다. 추가로, 변형을 위해 본원에 기재된 임의의 박테리아, 예컨대 *살모넬라*, *시겔라*, *이. 콜라이*, *비피도박테리아*, *리케치아*, *비브리오*, *리스테리아*, *클레브시엘라*, *보르데텔라*, *네이쎄리아*, *애로모나스*, *프란치셀라*, *콜레라*, *코리네박테리움*, *시트로박터*, *클라미디아*, *해모필루스*, *브루셀라*, *미코박테리움*, *미코플라즈마*, *레지오넬라*, *로도콕커스*, *슈도모나스*, *헬리코박터*, *바실러스*, 및 *에리시펠로트릭스*의 임의의 균주, 또는 이의 약독화된 균주, 또는 이의 변형된 균주는 숙주에 의해 인식되는 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 치료 생성물을 인코딩하는 핵산(들)을 함유하는 플라스미드를 함유하거나 도입하거나 박테리아 내 플라스미들 상에서 인코딩함으로써 변형될 수 있다. 치료 생성물은 감염된 대상체의 세포에서 발현된다. 면역자극성 박테리아는 종양, TME 및/또는 종양-체류 골수성 세포에 축적되거나 우선적으로 감염시키도록 본원에 기재된 바와 같이 변형된 것을 포함한다. 예를 들어, IFN-베타와 같은 유형 I 인터페론(IFN), 및/또는 본원에 논의된 바와 같은 다른 치료 생성물의 발현 또는 항시적 발현을 유도하는 기능-획득 생성물을 인코딩하는 면역자극성 박테리아는 추가로, 상피 세포를 감염시키는 능력이 감소되거나 능력이 없지만 종양-체류 면역 세포를 포함한 식세포를 감염시킬 수 있도록 변형되고/되거나 면역자극성 박테리아가 감염된 식세포를 사멸화시키지 않도록 변형된다.

[0651] 본원에 기재된 바와 같이, SPI-1 경로에 관여하는 유전자 및 편모는 식세포(면역 세포)에서 인플라마솜을 활성화시켜 파이롭토시스를 유발한다. SPI-1 유전자 및 편모를 인코딩하는 유전자를 넉아웃시키는 것은 식세포의 파

이롭토시스를 감소 또는 제거하고, 또한 상피 세포의 감염을 제거하여 식세포의 감염을 증가시킨다. 식세포, 특히 종양-체류 면역 세포, 예를 들어 골수 유래 억제 세포(MDSC), 종양-연관 대식세포(TAM) 및 수지상 세포(DC)에 축적되는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 여기서 이는 RNA 폴리머라제 II에 의해 인식되는 것과 같은 진핵 프로모터에 의해 제어되는 플라스미드에 인코딩된 유전자 페이로드/치료 생성물을 발현하고, 본원에 논의된 바와 같이 다른 진핵 조절 신호를 포함한다. 발현된 치료 생성물에는 종양 미세환경에서 숙주 반응을 증가시키는 유형 I 인터페론을 증가시키거나 유도하는 경로를 통해 면역 반응을 유발하는 생성물이 포함된다. 면역자극성 박테리아는 또한 본원에 논의된 바와 같이 면역자극성 단백질, 예컨대 IL-2 및/또는 다른 사이토카인, 및/또는 다른 면역자극성 단백질 및 치료 생성물을 인코딩할 수 있으며, 이는 종양 미세환경에서 면역 반응을 추가로 향상시킨다.

[0652] 면역자극성 박테리아는 세포의 세포질에서 RNA, DNA, 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드, 환식 뉴클레오타이드, 환식 디뉴클레오타이드 및 다른 이러한 분자와 같은 핵산에 노출될 때 면역 반응을 일으키는 세포질 DNA/RNA 센서라고 하는 생성물을 인코딩할 수 있다. 본원에서 면역자극성 박테리아는 면역 반응을 항시적으로 유발하는 변형된 치료 생성물을 인코딩하고, 세포질에서 DNA/RNA의 존재를 필요로 하지 않는다. 유형 I 인터페론 발현을 유도하는 경로의 구성요소가 이러한 예이다. 본원에서 고려되는 치료 생성물은 유형 I 인터페론(들)이 세포의 세포질에서 뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드, 환식 뉴클레오타이드, 환식 디뉴클레오타이드 및 다른 이러한 리간드의 부재 하에 발현되거나 생성되도록 항시적 활성 또는 증가된 활성(즉, 기능-획득 생성물)을 갖는 이러한 세포질 DNA/RNA 센서의 변형된 형태를 포함한다. 세포, 특히 종양-체류 면역 세포를 포함하는 종양 세포에서 이러한 변형된 생성물의 발현은 종양 미세환경에서 인터페론-β를 비롯한 유형 I 인터페론의 항시적 발현을 유도한다. 이러한 기능-획득 생성물을 발현하는 면역자극성 박테리아가 종양 세포/TME/종양-체류 면역 세포에 축적되거나 우선적으로 감염시키기 때문에, 치료제는 종양 미세환경에서 발현되어 종양 미세환경에서 면역 반응을 증가시킨다.

[0653] 면역자극성 박테리아 및 다른 비히클에서 인코딩될 수 있는 예시적인 유전자 생성물은 세포질 DNA/RNA를 인식하고 유형 I 인터페론 생산을 활성화하는 내재성 경로를 감지하거나 이에 관여하는 단백질을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 유형 I 인터페론을 활성화하는 내재성 DNA/RNA 인식과 관련된 단백질에는 하기가 포함되지만 이로 제한되지 않는다: STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF7, TRIM56, RIP1/RIPK1, Sec5/EXOC2, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2/DHX58, DDX3/DDX3X, DHX9/DDX9, DDX1, DDX21, DHX15/DDX15, DHX33/DDX33, DHX36/DDX36, DDX60, 및SNRNP200. 항시적 유형 I 인터페론 발현을 초래하는 이러한 단백질의 기능-획득 돌연변이는 알려져 있거나 식별될 수 있으며, 돌연변이는 예컨대 식세포의 감염에 의해 또는 종양 세포를 표적화하고 결합함으로써 면역자극성 박테리아에 의해 종양 미세환경으로 전달될 수 있다.

[0654] 기능-획득 돌연변이에는 항시적 유형 I 인터페론 발현으로 인한 장애가 있는 개체에서 식별된 돌연변이가 포함된다. 기능-획득 생성물의 예는 인터페론병증이 있는 대상체에서 발생하는 생성물이다. 위에서 언급한 바와 같이 돌연변이는 스크리닝에 의해 식별되어 기능-획득 생성물도 생성할 수 있다.

[0655] 치료 생성물을 인코딩하는 핵산은 발현 특성을 개선하기 위해 추가로 변형될 수 있다. 변형에는 예를 들어 포유동물, 특히 인간 대상체에서 전사 효율을 증가시키기 위한 코돈 최적화, 예를 들어 GC 함량 또는 CpG 디뉴클레오타이드 함량 감소, 크립틱(cryptic) 스플라이싱 부위 제거, CpG 섬의 첨가 또는 제거(일반적으로 제거), 샤인-달가노(SD) 서열의 대체, 및 전사 효율을 증가시키기 위한 TATA 박스 및/또는 말단 신호의 대체를 포함한다. 코돈 용법 편향 변경, GC 함량 감소, mRNA 2차 구조 감소, 조기 PolyA 부위 제거, RNA 불안정성 모티프(ARE) 제거, mRNA의 안정적인 자유 에너지 감소, 내부 카이(chi) 부위 및 리보솜 결합 부위의 변형, 및 RNA 2차 구조 감소에 의해 번역 효율을 높이기 위해 코돈을 최적화할 수 있다. 발현을 개선하고 박테리아 적합성을 유지 또는 향상시키기 위한 추가 변형이 면역자극성 박테리아에 통합되었다. 이는 아래 섹션에 설명되어 있으며 아래 작업실시예에서 상세하고 예시되어 있다.

[0656] 상기 기재된 바와 같이, 단일 가닥 및 이중 가닥 RNA, 환식 디뉴클레오타이드(CDN) 및 다른 이러한 형태의 핵산과 같은 세포질 핵산의 숙주 인식에 의해 매개되는 유형 I 인터페론 유도 경로는 유형 I IFN을 유도한다. 또한 세포질에서 단일 가닥(ss) 및 이중 가닥(ds) RNA의 숙주 인식에 의해 매개되는 톨-유사 수용체(TLR)-독립형 유형 I IFN 경로가 있다. 이는 레티노산-유도성 유전자 I(RIG-I), 흑색종 분화-연관 유전자 5(MDA5)를 포함한 RNA 헬리카제에 의해 그리고 IFN-β의 유도를 유도하는 IRF3 전사 인자의 IFN-β 프로모터 자극제 1(IPS-1) 어댑터 단백질-매개 인산화를 통해 감지된다(예를 들어, Ireton and Gale (2011) 바이러스 3(6):906-919 참조). 본원에서 논의된 바와 같이, 이러한 경로의 단백질은 변형될 수 있거나 변이체로 존재할 수 있으며, 이는 IFN-α 및 IFN-β를 포함하는 유형 I 인터페론(인터페론 유형 1로도 지칭됨)의 항시적 발현을 초래한다. 이러한 단백질의

예는 본원에 제공된 것을 포함하여 기재된 변형된 STING 단백질이다. 이는 유형 I 인터페론의 항시적 발현을 초래하는 돌연변이를 가져서 인터페론이 유도의 부재 하에 발현되게 되는 변형된 STING 단백질을 포함하며, 변형된 비(非)인간 STING 단백질 및 인간 STING 단백질, 및 또한 키메라 STING 단백질, 예컨대 C-말단 테일(CTT) 부분이 제2 종의 STING 단백질로부터의 CTT 부분으로 대체된 것을 포함하며, 여기서 제2 종의 STING 단백질은 인간 STING의 NF-κB 신호전달 활성보다 더 낮은 NF-κB 신호전달 활성을 가지며, CTT의 TRAF6 결합 부위는 선택적으로 결실되고, 하나 이상의 기능-획득 돌연변이를 추가로 포함하는 키메라 STING 단백질을 포함한다.

[0657] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아를 이용하는 요법은 체크포인트 저해제 요법, 및 상기 및 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 다른 암 치료 및 화학요법을 비롯한 임의의 다른 항암 요법과 조합될 수 있다.

[0658] **5.전구약물을 활성화시키는 분자**

[0659] 본원에 제공되는 면역자극성 박테리아의 플라스미드는 효소적 절단에 의해 활성화되는 화학요법 전구약물, 특히 독소를 포함하는 전구약물과 같은 치료 생성물의 일부를 절두함으로써 활성화하는 분자, 예컨대 효소를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 그 결과, 불활성 전구약물은 전신 투여될 수 있고 불활성이다. 효소와 같은 플라스미드-인코딩 활성화 분자는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 전달 후 종양 미세환경에서 발현되어, 불활성 전구약물이 종양 미세환경에서 활성화되어 항종양 효과를 발휘한다. 특정 뉴클레오사이드 및 독소 접합체를 포함하는 이러한 전구약물의 많은 예가 있다. 많은 이러한 전구약물 및 효소가 알려져 있다(예를 들어, 예를 들어, Malekshah *et al.*, (2016) *Curr. Pharmacol. Rep.* 2:299-308 참조). 이는 5-플루오로우라실(5-FU), 옥사자포스포린, 백금 약물, 및 데아미나제, 니트로리덕타제, 포스포릴라제, 시토크롬 P450 효소 등과 같은 효소의 전구약물, 및 많은 다른 것을 포함한다.

[0660] **6.병용 요법을 전달하는 면역자극성 박테리아**

[0661] 본원에서 면역자극성 박테리아는 하나 이상의 치료 생성물, 특히 항암 요법을 위한 생성물을 제공하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로 생성물은 항종양 면역 반응을 강화하고 재프로그래밍하기 위한 보완 생성물이다. 본원에 기재된 게놈 변형, 특히 *asd*$^-$, 플라젤린$^-$(예컨대 *fliC*$^-$/*fljB*$^-$), *pagP*$^-$, *csgD*$^-$, *purI*$^-$, 아데노신 영양요구성, *msbB*$^-$, *ansB*$^-$, 및 본원에 기재되거나 당업자에게 알려진 임의의 다른 변형 중 몇몇 또는 모두의 조합에 의한 면역자극성 박테리아는 종양 미세환경(TME)에 축적되어 종양-체류 면역 세포(골수성 세포)를 감염시킨다. 면역자극성 박테리아는 숙주에 의해 인식되는 프로모터의 제어 하에 보완 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드, 및 인간, 다른 동물 또는 포유동물과 같은 진핵생물에서 인식되는 임의의 다른 원하는 조절 서열을 함유하여, 인코딩된 생성물의 발현 및 생성물의 분비를 발휘한다. 면역자극성 박테리아는 TME, 특히 골수 유래 억제 세포(MDSC), 종양-연관 대식세포(TAM) 및 수지상 세포(DC)를 포함하는 종양-체류 면역 세포에 축적되며, 여기서 인코딩된 치료 생성물은 발현된 다음 종양 미세환경으로 분비되어 항종양 효과를 달성한다. 생성물의 적절한 조합에 의해 다양한 생성물과 숙주 면역계의 상호작용 덕분에 항종양 효과가 향상될 수 있다.

[0662] 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 단일 프로모터 및 개방 리딩 프레임(ORF)을 갖는 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아는 캡(cap)-독립적인 바이러스 내부 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용을 통해 또는 2A 펩타이드(예를 들어, T2A, P2A, E2A, F2A)의 번역 판독, 및 동일하게 발현되는 공동단백질로의 후속적인 자가-절단을 통해 2개(또는 그 이상)의 단백질을 발현할 수 있다. 대안적으로, 유전자 페이로드/치료 생성물은 이중 또는 다중 프로모터 작제물을 사용하여 발현될 수 있으며, 여기서 각각의 단백질은 별도의 프로모터의 제어 하에 발현된다. 3개 이상의 단백질을 발현하기 위한 단일 및 이중/다중 프로모터 작제물의 조합도 플라스미드에 포함될 수 있다. 일반적으로, 치료 생성물을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터의 제어 하에 있다. 예를 들어, 프로모터는 EF-1α, CMV, SV40, UBC, CBA, PGK, GUSB, GAPDH, EIF41A, CAG, CD68 및 합성 MND 프로모터를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 플라스미드는 전사후 조절 요소(PRE; 예를 들어, WPRE, HPRE), 폴리아데닐화 신호 서열, 종결인자, 인핸서, 분비 신호(신호 펩타이드/서열, 리더 펩타이드/서열로도 알려짐), DNA 핵 표적화 서열(DTS), 및 본원의 다른 곳에서 기재되거나 당업자에게 알려진 다른 조절 요소와 같은 다른 조절 요소를 포함할 수 있으며, 이는 인코딩된 치료 생성물의 발현 및/또는 분비를 향상시키거나 증가시킬 수 있다.

[0663] 플라스미드에 인코딩된 유전자 페이로드 또는 치료 생성물에는 사이토카인, 케모카인 및 공동자극성 분자와 같은 면역자극성 단백질; 유형 I IFN 및 기능-획득/항시적으로 활성인 돌연변이체/변이체를 유도하는 세포질 DNA/RNA 센서; 항체 및 이의 단편; 이중특이적 T-세포 연계자(BiTEs®); TGF-β, 또는 TGF-β 길항 폴리펩타이드에 결합하기 위한 유인물로 작용하는 가용성 TGF-β 수용체; IL-6 결합 유인 수용체; 간섭 RNA(예를 들어,

siRNA, shRNA, miRNA); 및 하기 및 본원의 다른 곳에서 논의되고 당업계에 알려진 바와 같은 다른 치료 생성물; 및 모든 선행 치료 생성물의 보완적 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 막횡단 도메인 및 콜라겐-결합 도메인과 같은 막 고정 모티프와 함께 면역자극성 박테리아 내의 플라스미드 상에 인코딩될 수 있다.

[0664] 플라스미드에 인코딩될 수 있는 사이토카인, 케모카인 및 공동자극성 분자를 비롯한 면역자극성 단백질에는 IL-2, IL-7, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-15/IL-15Rα 사슬 복합체, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36 감마, 인터페론-α, 인터페론-β, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하거나 이를 발휘하거나 강화시키는 단백질, CD40, CD40 리간드(CD40L), OX40, OX40 리간드(OX40L), 4-1BB, 4-1BB 리간드(4-1BBL), 세포질 도메인이 결여된 4-1BBL(4-1BBLΔcyt), ICOS, CD27, B7-CD28 계열의 구성원, 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼계열의 구성원을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 면역자극성 단백질은 또한 예를 들어 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 및 OX40L과 같은 절두된 공동자극성 분자를 포함하며, 이는 항원 제시 세포(APC)에서의 발현을 위한 세포질 도메인 결실을 갖고, 여기서 절두된 유전자 생성물은 공동자극 수용체 결합을 통해 T-세포에 항시적 면역자극 신호를 전달할 수 있고 결실된 세포질 도메인으로 인한 APC에 대한 역조절 신호를 할 수 없다.

[0665] 유형 I IFN 생성을 유도하거나 활성화하는 세포질 DNA/RNA 센서에는 STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF5 및 IRF7 및 기능-획득(GOF) 또는 이의 항시적으로 활성 변이체가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 유형 I IFN 반응을 활성화하며 항시적 유형 I IFN 발현을 생산하도록 변형될 수 있고 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있는 DNA/RNA의 인식에 관여하는 다른 단백질에는 TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 및 SNRNP200이 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[0666] 본원에서 면역자극성 박테리아에 의해 전달되는 플라스미드에 인코딩될 수 있거나 박테리아와 공동 투여될 수 있고 항종양 반응을 향상 또는 증가시키는 다른 치료 생성물에는 항체 및 이의 단편, 예를 들어, TGF-β 저해성 항체; 항-IL-6 항체; PD-1, PD-L1 및 CTLA-4와 같은 체크포인트 저해제에 대한 항체; 및 VEGF, CD73, CD38, Siglec-15, EGFR, Her2, 메조텔린 및 BCMA에 대한 항체 또는 저해제가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 플라스미드에서의 발현 또는 본원의 면역자극성 박테리아와의 공동 투여를 위해 또한 고려되는 것은 이중특이적 T-세포 연계자(BiTEs®), IL-6 결합 유인 수용체, TGF-베타 결합 유인 수용체 및 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제이다. 이러한 항체, 저해제, 또는 유인 수용체 중 임의의 것은 본원에서 면역자극성 박테리아와 공동-투여될 수 있다. 일부 구현예에서, PARP(폴리(ADP)-리보스 폴리머라제) 저해제, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 저해제 및/또는 화학요법은 또한 단독으로 또는 임의의 조합으로 상기 열거된 임의의 치료제와 공동 투여될 수 있다.

[0667] 본원에서 면역자극성 박테리아 내 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있는 치료 생성물의 보완 병용의 예는 하기를 포함하지만 이로 제한되지 않는다:

[0668] IL-2 및 IL-12p70; IL-2 및 IL-21; IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0669] IL-15/IL-15Rα 및 STING GOF 변이체; IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); IL-15/IL-15Rα 및 IL-12p70; IL-15/IL-15Rα 및 IL-21; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0670] IL-12p70 및 IL-21; IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); IL-12p70 및 STING GOF 변이체; IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); IL-12p70 및 IL-18; IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; 및 IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0671] TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-12p70; TGF-β 유인 수용체, IL-2, 및 IL-21; TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 TGF-β 유인 수용체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0672] TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70; TGF-β 유인 수용

체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 TGF-β 유인 수용체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0673] TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-21; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); TGF-β 유인 수용체 및 IL-12p70; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, 및 IL-18; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; TGF-β 유인 수용체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 TGF-β 유인 수용체 및 STING GOF 변이체;

[0674] 항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-12p70; 항-CTLA-4 항체, IL-2, 및 IL-21; 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 항-CTLA-4 항체, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0675] 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 항-CTLA-4 항체, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0676] 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-21; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 항-CTLA-4 항체 및 IL-12p70; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, 및 IL-18; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; 항-CTLA-4 항체, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 항-CTLA-4 항체 및 STING GOF 변이체;

[0677] CD40 작용제, IL-2, 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-2, 및 IL-21; CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-2, IL-21, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-2, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 CD40 작용제, IL-2, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함);

[0678] CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, 및 IL-21; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 CD40 작용제, IL-15/IL-15Rα, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및

[0679] CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-21; CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-12p70, IL-21, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); CD40 작용제 및 IL-12p70; CD40 작용제, IL-12p70, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-12p70, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); CD40 작용제, IL-12p70, 및 IL-18; CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, 및 STING GOF 변이체; CD40 작용제, IL-12p70, IL-18, STING GOF 변이체, 및 4-1BBL(4-1BBLΔcyt 포함); 및 CD40 작용제 및 STING GOF 변이체.

[0680] 하기 표는 실시예에서 논의되고 실증된 IL-15 또는 IL-15 복합체의 조합의 상승작용 효과를 포함하여 면역자극성 박테리아의 플라스미드에 인코딩될 수 있는 예시적인 생성물과 이러한 생성물의 일부 효과/특성을 나열한다.

인코딩된 생성물	효과/특징
조작된 STING - 유형 I IFN 발현을 증가시키기 위해	케모카인 구배는 T-세포를 모집함. 유형 I IFN의 유도, T-세포 활성화, APC 종양 항원 교차-제시. 유형 I 인터페론병증을 갖는 SAVI 환자에서 확증된 항시적 STING 변이체
IL-12	강한 Th1 면역 반응 구동자. 활성화된 APC, 특히 M1 대식세포 및 DC 에 의해 생성됨* 데이터는 이것이 IFN-γ의 강한 구동자임을 나타냄
IL-15 및/또는 IL-15 복합체(IL-15Rα-IL-15sc)	T-세포 및 NK 세포 증식을 자극함. IL-2 로 제시된 T_{reg} 자극이 결여됨.
IL-21	T-세포 및 NK 세포를 자극하는 다면발현성 사이토카인. M2 대식세포를 M1 대식세포로 전환시킴. TLR3 활성화(RNA 바이러스 감지) 시 생성됨.
IL-36γ	T-세포, NK 세포 및 γδT-세포에 의한 Th1 APC 및 IFN-γ 생성을 촉진함.
변형된 4-1BBL	T-세포 공동-자극을 제공하며, T-세포의 세포독성 및 기억 표현형을 향상시킴; 세포질 도메인의 결실 또는 절두, 및 N-말단 절두된 세포질 도메인에의 잉여의 양성 잔기의 첨가로 변형됨.
항-CTLA-4 scFV-Fc	더 약한 종양 항원에 대한 T-세포 프라이밍 및 활성화를 증강시킴.
TGF-β 유인 수용체 트랩	TGF-베타에 결합하고 제거하며, T-세포 및 Th1 APC 의 면역억제를 경감시킴.

*DC = 수지상 세포

[0681]

[0682] 위의 임의의 상보적 조합에서 TGF-β 유인 수용체는 TGF-β 길항 폴리펩타이드로 대체될 수 있다. 위에서 논의한 바와 같이, TGF-β 유인 수용체는 TGF-β에 결합하여 이를 제거하는 유인체로 작용하거나 TGF-β 길항 폴리펩타이드(예를 들어, 항-TGF-베타 항체 또는 항체 단편, 및 항-TGF-베타 수용체 항체 또는 항체 단편)이다. 유형 I IFN 생산을 유도하거나 활성화하는 STING 단백질, 또는 다른 DNA/RNA 센서는 GOF/항시적 활성 변이체일 수 있거나, 본원에 기재되고 제공되는 변형된 STING 폴리펩타이드 및 키메라 STING 폴리펩타이드를 포함하는 야생형 단백질일 수 있다 . 상기 상보적 조합 중 임의의 것은 또한 항-PD-1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-PD-L1 항체, 항-IL-6 항체, 항-Siglec-15 항체, 항-VEGF 항체, 항-CD73 항체, 항-CD38 항체, 항-EGFR 항체, 항-Her2 항체, 항-메조텔린 항체, 항-BCMA 항체 및 이의 항체 단편, 뿐만 아니라 PARP 저해제, HDAC 저해제, 또는 화학요법, 및 이의 조합 중 하나 이상과 병용 투여될 수 있다.

[0683] 본원에 제공된 플라스미드 및 면역자극성 박테리아는 치료 페이로드의 조합을 인코딩한다. 여기에는 위의 표에 나열된 생성물 중 일부 또는 전체를 인코딩하는 핵산의 조합이 포함된다. 상보적 페이로드의 조합이 평가되었으며, 예시적인 조합 및 그 효과가 실시예에 설명되어 있다. 다양한 조합의 페이로드가 항원 특이적 T-세포의 활성화와 항종양 T-세포 모집에 관여하는 핵심 케모카인인 골수성 세포에 의한 CXCL10 분비에 미치는 영향을 평가하였다. 예를 들어, 페이로드의 조합은 골수 수지상 세포(BMDC)에 의한 CXCL10의 강력한 분비를 유도할 수 있다. IL-36γ와 IL-12p70 및 STING R284G tazCTT의 조합은 BMDC에 의한 CXCL10 및 IFN-γ의 더 높은 분비를 유도하였다. 많은 조합이 CD8+ T-세포 반응(예를 들어, 4-1BB 발현)의 활성화 및 IFN-γ의 분비를 유도한다. 특

정 사이토카인 조합은 T-세포를 활성화시킬 수 있다. 예를 들어, IL-12p70 + IL-15의 조합; IL-12p70 + IL-15 + IFN-α2; IL-12p70 + IL-15 + 항-4-1BB 작용 항체; IL-12p70 + IL-15 + IL-36γ; IL-12p70 + IL-15 + IL-21; IL-12p70 + IL-21 + IL-36γ; IL-12p70 + IL-36γ + IFN-α2; IL-12p70 + IL-36γ + 항-4-1BB 작용 항체; IL-15 + IL-36γ + IFN-α2; 및 IL-15 + IL-36γ + 항-4-1BB 작용 항체는 T-세포에서 높은 수준의 IFN-γ를 분비하지만 상대적으로 낮은 수준의 IL-6을 분비하여 최적의 T-세포 활성화, 종양 미세환경에서 항종양 면역력 유도를 위한 이상적인 조합을 만든다.

[0684] 추가로, 사이토카인(IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, IL-12, IL-12p70, IL-15, IL-21, IL-36γ)과 4-1BB 결합의 여러 조합은 CD4+ 및 CD8+ T-세포에 대해 항-CD3ε 작용 항체에 의한 TCR 자극과 함께 그리고 이러한 자극 없이 높은 수준의 IFN-γ를 분비하도록 T-세포를 활성화시킨다. 본원에 기재된 STING 변이체 및 IL-12는 인간 CD8+ T-세포의 항원 특이적 활성화를 증가시킬 수 있다. 데이터는 또한 결장직장암의 마우스(mu) 모델에서 IL-15, 또는 4-1BBLΔcyt + IL-12의 조합을 발현하는 면역자극성 박테리아 균주가 4-1BBL(Δcyt) 또는 IL-12를 단독으로 발현하는 동일한 균주보다 종양 성장 저해를 보다 강력하게 억제한다는 것을 보여주었고, 높은 완전 반응율(50% 치료율)을 초래한다. 다른 조합도 시험되었으며 생체 내에서 강력한 항종양 활성을 갖는 것으로 나타났다.

[0685] 페이로드의 조합은 OX40L 폴리펩타이드 또는 4-1BBL 폴리펩타이드와 같은 공동자극성 분자, 또는 이의 세포질 결실 또는 절두된 변이체, 및/또는 본원에 기재되고 예시된 이의 변형된 형태 중 하나; 또는 항-CTLA-4 scFv-Fc 또는 항-CTLA-4 scFv와 같은 항-면역 체크포인트 항체 또는 이의 단편(각각 실시예 25 및 SEQ ID NO: 428 및 429 참조); 하나 이상의 사이토카인/케모카인, 예를 들어 IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IFN-β, IFN-α2 및 CXCL10; TGF-β 결합 유인 수용체 및 다른 TGF-베타 폴리펩타이드 길항제, 예를 들어 인간 IgG1 Fc와 융합된 인간 가용성 TGFβ 수용체 II(hu sTGFβRII-Fc; SEQ ID NO: 437), 항-TGF-베타 항체 또는 항체 단편, 항-TGF-베타 수용체 항체 또는 항체 단편, 및 가용성 TGF-베타 길항제 폴리펩타이드; 및 본원에 기재되고 예시된 바와 같은 STING 단백질 또는 변형 및/또는 키메라 STING 단백질 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0686] 페이로드/생성물/폴리펩타이드는 단일 프로모터(즉, 단일 프로모터 시스템) 및 필요에 따라 다른 조절 서열의 제어 하에 다시스트론 작제물로서 인코딩될 수 있으며, 또한 2A 폴리펩타이드 또는 다른 개별 생성물의 번역을 초래하는 이러한 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 페이로드는 또한 각각 상이한 프로모터(즉, 이중 프로모터 시스템)의 제어 하에 2개의 개별 개방 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 플라스미드에서 발현될 수 있다. 페이로드의 예시적인 조합은 플라스미드에 인코딩된 순서로 다시스트론 작제물에 인코딩된 2A 펩타이드를 포함하여 하기 표에 제시되어 있다. 표는 2A 펩타이드를 포함하지만, 다른 이러한 펩타이드는 치환될 수 있고/있거나 생성물은 별개로 인코딩될 수 있다.

생성물의 예시적인 조합 및 플라스미드 상에서의 예시적인 순서

제 1 인코딩된 생성물	제 1 2A 펩타이드	제 2 인코딩된 생성물	제 2 2A 펩타이드	제 3 인코딩된 생성물	제 3 2A 펩타이드	제 4 인코딩된 생성물
4-1BBL*	T2A	IL-12p70				
4-1BBL*	T2A	키메라 STING**				
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	키메라 STING**		
IL-12p70	T2A	키메라 STING**				
IL-12p70	T2A	IL-15				
IL-12p70	T2A	IL-21				
IL-12p70	T2A	IL-15				
IL-12p70	T2A	IL-21				
IL-21	T2A	IL-12p70				
IL-12p70	T2A	IL-36γ				
IL-36γ	T2A	IL-12p70				
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-15		
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-21		
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-36γ		
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-15	T2A	키메라 STING**
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-21	T2A	키메라 STING**
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-36γ	T2A	키메라 STING**
IL-12p70	T2A	IL-21	P2A	키메라 STING**		
IL-21	T2A	IL-12p70	P2A	키메라 STING**		
IL-12p70	T2A	IL-15	P2A	키메라 STING**		
IL-12p70	T2A	IL-36γ	P2A	키메라 STING**		
IL-36γ	T2A	IL-12p70	P2A	키메라 STING**		
항-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70				

[0687]

항-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	키메라 STING**		
항-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	IL-15	T2A	
항-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	IL-21	T2A	
항-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	IL-36γ	T2A	
4-1BBL*	T2A	sTGFβRIIFc#			T2A	
sTGFβRIIFc#	T2A	IL-12p70	P2A	키메라 STING**		
4-1BBL*	T2A	sTGFβRIIFc#	P2A	IL-12p70	T2A	
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	sTGFβRIIFc#	T2A	
IL-36γ	T2A	IL-23	P2A	OX40L		

*4-1BBL = 세포막에 관하여 올바른 배향을 보유하기 위해 잔여 세포질 도메인을 더 양성으로 되게 하기 위한 세포질 절두 및 잔기 변형을 갖는 변형된 4-1BBL.

**키메라 STING = 태즈메이니아 데빌 CTT 및 대체 R284G/N154S 를 갖는 STING.

sTGFβRIIFc# = 유형 II 수용체 베타글리칸.

[0688]

[0689] 생성물의 다른 조합이 고려된다(상기 논의 및 실시예 참조). 관심의 다른 이러한 조합은 임의의 변형된 STING 단백질 및 사이토카인, 예컨대 키메라 STING, 예컨대 태즈메이니아 데빌 CTT, 특히 하나 이상의 기능-획득 돌연변이, 예컨대 N154S/R284G를 갖는 인간 키메라를 포함한다. 본원에 논의된 보완 조합은 상승작용 결과를 제공할 수 있다. 예를 들어, 실시예에 제시된 키메라 STING 폴리펩타이드와 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15Rα-IL-15sc)의 조합은 상승작용적으로 작용하여 항종양 효과성을 향상시킨다.

[0690] 종양-체류 골수성 세포 및 TME에서의 축적과 같은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 특성, 및 발현될 수 있는 생성물/페이로드의 조합은 암 면역 주기를 커버하도록 선택될 수 있다. 주기의 각각의 단계와 면역자극성 박테리아 및 페이로드의 역할은 하기와 같이 요약된다:

[0691] 1) 암 세포 항원의 방출 - 면역자극성 박테리아가 종양-체류 골수성 세포에 축적됨.

[0692] 2) 암 항원 제시 - 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 STING 폴리펩타이드와 이의 변이체, 및 IL-12와 같은 면역 자극 인자를 인코딩하고 발현하여 IFN-α 및 IFN-β를 포함한 유형 I 인터페론의 발현을 유도함.

[0693] 3) 프라이밍 및 활성화 - 면역자극성 박테리아는 STING 폴리펩타이드와 이의 변이체, 및 4-1BBL과 IL-12와 같은 공동자극 단백질을 인코딩함.

[0694] 4) T-세포를 종양으로 트래피킹 - 인코딩된 STING 변이체가 발현되어 결과적으로 IFN-α 및 IFN-β가 발현됨.

[0695] 5) 종양으로 T-세포의 침윤 - 면역억제 골수성 세포의 혈관 누출 및 재분극;

[0696] 6) T-세포에 의한 암세포 인식 - 유형 I IFN, IFNɣ 및 MHC의 상향 조절; 및

[0697] 7) 암세포 사멸 - 인코딩된 사이토카인/케모카인, 예를 들어 IL-12, IL-15, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15Rα-IL-15sc), IL-21 및/또는 IL-36ɣ의 조합으로서, 이는 T-세포 증식 및 IFN-ɣ의 방출, 및 가용성 TGF-β 유인 수용체의 발현을 유도함.

[0698] 당업자는 본원의 개시내용 및 그들의 지식에 기초하여, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 항종양 활성을 향상시키기 위해 면역 활성화 및/또는 면역억제 효과를 갖는 다시스트론 작제물에 인코딩된 바와 같은 다른 생성물 페이로드 조합 및 생성물의 다른 순서를 확인할 수 있다.

[0699] **E.항바이러스 치료제 및 다른 감염성 병원체에 대한 치료제로서의 면역자극성 박테리아**

[0700] 숙주 면역 반응의 면역억제는 많은 감염성 질환, 특히 지속적 바이러스 감염에서, 뿐만 아니라 종양 면역억제에서 역할을 한다. 지속적 감염에서, 바이러스는 감염된 개체의 특정 세포에 남아 있다. 몇몇 유형의 지속적 바이러스-숙주 상호작용이 존재한다: 잠재, 만성, 및 느린 감염. 잠재 감염에서, 재발 질환의 에피소드 사이에 어떠한 검출 가능한 감염성 바이러스도 존재하지 않는다; 만성 감염에서, 1차 감염 후 감염성 바이러스의 지속적인 존재가 있고, 만성 또는 재발 질환이 존재한다. 느린 감염은 연장된 인큐베이션 기간, 뒤이어 진행성 질환을 특

징으로 한다. 지속적 감염 동안, 바이러스 게놈은 세포성 DNA 내로 안정하게 통합될 수 있거나, 에피솜적으로 유지될 수 있다. 지속적 감염은 인간 T-세포 백혈병 바이러스(T-Cell leukemia virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus), 헤르페스바이러스(herpesvirus), 대상 포진 바이러스(varicella zoster virus), 홍역 바이러스(measles virus), 파포바바이러스(papovavirus), 프리온(prion), 간염 바이러스(hepatitis virus)(A형, B형, C형, D형 및 E형 포함), 아데노바이러스(adenovirus), 파보바이러스(parvovirus), 코로나바이러스(coronavirus), 인간 면역결핍 바이러스(HIV: human immunodeficiency virus), 천연두 바이러스(smallpox virus), 폴리오바이러스(poliovirus), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 로타바이러스(rotavirus), 황열 바이러스(yellow fever virus), 유행성 이하선염 바이러스(mumps virus), 풍진 바이러스(rubella virus), 및 유두종바이러스(papillomavirus)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 수많은 바이러스 및 감염성 병원체에 의해 발생한다.

[0701] 박테리아는 백신 및 다른 항병원체 치료제를 위한 전달 비히클로서 사용되어 왔고, 박테리아 벡터에 대해 외래인 펩타이드에 대해 면역 반응을 이끌어내기 위한 백신으로서 사용되어 왔다. 예를 들어, VEGFR2-인코딩 플라스미드를 함유하는 *에스. 티피* TY21a 균주는 인간에서 VEGFR2-특이적 T-세포 반응을 유도한다(예를 들어, Schmitz-Winnenthal *et al.* (2016) *Journal of Clinical Oncology* 34(15_suppl):3091-3091, DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3091 참조). 그러나, 박테리아를 백신 비히클로서 사용하는 선행 접근법은 제한된 임상적 성공을 가졌다. FDA-승인된 박테리아-기초 백신만 다른 박테리아 질환에 대해 사용 가능하고. 인간에서 항종양 또는 항바이러스 면역을 효과적으로 유도하지 않았다. 본원에 논의된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아가 이러한 문제점을 해결한다.

[0702] 항바이러스 백신이 작동하는 하나의 방식은 외피화된 바이러스의 표면 당단백질에 특이적이거나 비(非)외피화된 바이러스의 캡시드 단백질에 특이적인 항체를 유도하는 항원의 전달에 의한 것이다. 항체는 적응 면역력의 1차 요소이고, 이는 보호적 수준에서 사전에 존재하도록 그리고 바이러스 병원체에의 재노출 동안 존재하거나 유도되도록 설계된다. 기존의 항체는 내재성 면역의 속도로, 그러나 더 큰 특이성, 더 높은 결합력(avidity), 및 표적화된 기능성으로 작용한다. 면역화를 위한 면역학적 목표는 지속적인 보호적 항체 반응의 유도이다. 보호적 항체 반응은 일반적으로 이것이 감염을 중화시키고 저해할 때 최상으로 작동한다. 중화는 3개의 주요 기전에 의해 발생할 수 있다. 제1 현상인 바이러스의 응집 또는 고정은 바이러스가 표적 세포에 도달하는 것을 방지함으로써 감염성 접종물을 감소시킨다. 제2 기전은 수용체-결합 도메인을 차단함으로써 표적 세포에의 바이러스의 부착을 직접적으로 차단하는 항체를 수반한다. 제3 기전인 중화는 세포 내로의 바이러스의 진입을 방지함으로써 또는 융합 저해를 통한 탈코팅(uncoating)에 의해 표적 세포에의 바이러스의 후부착(post-attachment)을 발생시킬 수 있다. 중화 항체는 이의 본래의 상태에서 또는 융합 과정의 완료 전에 일시적으로 존재할 수 있는 중간 형태에서 올리고머성 표면 단백질을 인식할 필요가 있다. 이러한 에피토프는 일반적으로 회전배열이고, 종종 4차 에피토프이고, 종종 단량체성 형태의 바이러스 단백질 상에 존재하지 않는다.

[0703] 항체가 백신-유도 보호적 면역의 1차 기전으로서 인식되긴 하지만, 바이러스-특이적 $CD8^+$ T-세포 반응 또한 바이러스 감염을 제어하고 질환의 중증도를 제한하는 데 중요하다(예를 들어, Graham (2013) *Immunol. Rev.* 255(1):230-242 참조). 항체-매개 이펙터 기전은 감염을 예방하기 위한 것이다; $CD8^+$ T-세포-매개 이펙터 기전은 바이러스-감염 세포를 인식하고 청소하기 위한 것이다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아가 골수성 세포를 감염시키기 때문에, 면역자극성 박테리아는 T-세포 매개 반응을 포함하여 T-세포에의 항원 제시를 증강시킬 수 있다. 항원-특이적 세포독성 T-림프구(CTL)는, 포유류 세포의 세포기질성 단백질에 대한 제시 경로인, 세포 표면 상에서 주조직적합성 복합체 부류 I(MHC I)과의 복합체로 존재하는 항원과의 상호작용에 의해 활성화되는 $CD8^+$ T-세포의 하위군이다. 항원은 박테리아 병원체에 의해 합성되거나, 박테리아 백신은 항원을 세포질 내로 방출시켜, CTL에 의한 세포성 면역 반응을 이끌어낸다. 이러한 활성화 후, CTL은 관련 항원 펩타이드를 MHC I과의 복합체로 표시하는 감염된 세포에 대해 유도된다. 항원은 또한, 항체의 B-세포 생산을 촉진할 수 있는 $CD4^+$ 헬퍼 세포에게 APC(항원-제시 세포) 상의 MHC 부류 II 분자에 의해 직접적으로 제시될 수 있다.

[0704] 선행 박테리아 백신 및 항병원체 전략의 한계는 이것이 박테리아 감지 경로를 본원에 기재된 바와 같이 강한 적응성 항바이러스 또는 항종양 면역력을 유발하지 않는 아쥬반트로서 의존한다는 점이다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 이러한 한계를 해결한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 강한 바이러스-감지 면역 경로의 맥락에서 효과적인 항바이러스 백신화, 및 또한 항종양 치료를 유발하는 바이러스 항원을 포함한 이종성 단백질 및 다른 항바이러스 치료제의 프라이밍을 제공한다. 본원에 상술된 바와 같이, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 많은 박테리아 TLR 감지 경로가 결여되고, 항바이러스 경로를 보유하는 한편 내재성 항박테리아 반

응으로의 면역력의 왜곡(skewing)을 무효화시킨다. 바이러스 감염 동안, 뿐만 아니라 암을 갖는 대상체에서, 톨-유사 수용체(TLR), 레티노산 유도적 유전자-I(RIG-I)-유사 수용체(RLR), 및 세포질 DNA 센서를 포함한 내재성 면역 신호전달 경로는 항바이러스 분자, 예컨대 유형 I 인터페론(IFN) 및 전염증성 사이토카인의 합성을 위해 활성화된다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 게놈 변형, 및 또한, 인코딩된 치료적 카고(cargo)(들), 예컨대 STING 단백질 및 변형된 STING 단백질, 사이토카인 및 케모카인으로 인해 이러한 경로를 자극시키도록 설계된다.

[0705] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 유리하게는 게놈 변형으로 인해, 그리고 선택적인 인코딩된 치료 생성물은 자연상에서 항바이러스에 대한 숙주 면역 반응을 지시할 수 있다. 논의된 바와 같이 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 인코딩된 항병원체 치료 생성물, 예컨대 항원, 항체 및 다른 인코딩된 치료제를 전달하기 위해 골수성 세포를 감염시키고, 숙주의 면역 반응을 증강시키기 위해 추가의 생성물, 예컨대 면역자극성 단백질을 인코딩할 수 있다. 그러므로, 면역자극성 박테리아는n 병원체 상에서 여러 가지 공격을 제공할 수 있다.

[0706] 종양을 갖는 대상체에서 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양-체류 면역 세포에 축적된다. 종양을 갖지 않는 대상체에서, 박테리아는, 진핵 머시너리에 의해 판독되고 이의 자연 맥락에서 단백질을 생산할 수 있는 플라스미드를 매우 잘 전달할 수 있는 세포인 포식성 항원-제시 세포(APC)를 주로 또는 이것만 감염시킨다. 플라스미드는 예를 들어, 바이러스 항원 및 다른 항바이러스 치료제를 포함한 단일의 또는 다수의 이종성 단백질을 인코딩하고, 또한 항바이러스 면역-감지 경로를 유도하는 단일의 또는 다중화된 면역 페이로드를 인코딩할 수 있다. 결과는 적절한 APC 활성화 및 T-세포의 항원 프라이밍이며, 이는 억제성 골수성 세포가 적응 면역력을 방지하는 만성 감염 환경에서도 지속적인 체액성 및 세포성 항바이러스 면역을 유발한다.

[0707] 그러므로, 단백질 항원과 항체, 및 병원체에 대한 백신화 또는 지속적 바이러스 감염을 포함하여 생성된 감염의 치료를 위한 다른 치료제를 전달하는 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 병원체는 질환 및 장애를 야기하는 박테리아, 원생동물, 바이러스, 및 프리온, 및 다른 프리온-유사 입자를 포함한다. 면역자극성 박테리아 중에는 그리고 이러한 박테리아의 예는 살모넬라, 예컨대 에스. 티피무리움의 균주/종이다. 면역자극성 박테리아는 박테리아 또는 진핵 프로모터의 제어 하에 항병원체 생성물을 인코딩할 수 있다. 프로모터는 항시적일 수 있거나 유도적일 수 있다. 프로모터 및 다른 조절 서열의 선택은 특정 생성물, 생성물의 발현 시기, 및 박테리아의 사용, 예컨대 이것이 기존의 감염의 치료를 위한 것인지 또는 백신화를 위한 것인지의 여부를 포함한 인자에 의존한다. 일반적으로 *asd*⁻인 박테리아는 플라스미드 상에서 *asd*를 인코딩하여 항생제 선택 카세트에 대한 임의의 필요성 없이 박테리아에 의한 숙주 세포의 감염 시 복제를 허용할 수 있다. 이는 박테리아가 생체내에서 복제되는 것을 허용한다. 대안으로서, 자살 시스템은 페이로드(즉, 치료 생성물)를 조직-체류 골수성 세포에 전달하는 데 사용될 수 있다. 이러한 맥락에서, 박테리아는 생체내에서 보완 *asd* 유전자 카세트를 함유하는 플라스미드가 결여된 *asd*⁻ 균주를 사용하여 투입된다. 시험관내에서, 디아미노피멜산(DAP)은 기능적 *asd* 유전자의 부재 하에 박테리아 복제를 용이하게 하기 위해 첨가된다; 이러한 박테리아는 생체내에서 성장할 수 없다. 박테리아 핵산의 하나의 볼루스는 포식작용 및 박테리아의 세포내 파괴 후 조직-체류 골수성 세포로 전달된다.

[0708] 살모넬라를 포함한 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 감염된 유기체에서 항원-제시 세포(APC)를 포함한 골수성 세포를 특이적으로 표적화한다. APC는 림프절, 비장 및 간 내로 이동하여, 림프절 체류 T-세포에의 발현된 항원의 제시를 제공할 수 있다. 박테리아는 수지상 세포에 의해 흡수될 수 있으며, 이 세포는 그 후에 MHC I 및 MHC II에 의한 제시 경로를 위한 항원을 발현하고, 이는 다시 특이적 T-세포 반응을 개시한다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 병원체, 예컨대 인플루엔자 바이러스, 에볼라 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 및 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2로서, COVID-19를 야기함), *포르피로모나스 긴기발리스*, 및 본원에 제시되고/되거나 당업자에 알려진 바와 같은 다른 것에 대해 보호하기 위해 백신으로서 또는 바이러스 항원 및/또는 다른 단백질을 인코딩하기 위해 사용될 때 이러한 경로를 활용할 수 있다. 표적은 단백질, 예컨대 코로나바이러스의 스파이크 단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 438 참조), 및 *포르피로모나스 긴기발리스*의 긴기파인(gingipain) 프로테아제(예를 들어, SEQ ID NO: 442-447 참조), 특히 피. *긴기발리스* 균주 ATCC 332277로부터의 라이신-긴기파인 프로테아제(Kgp 또는 Lys-긴기파인)(예를 들어, SEQ ID NO: 444 참조), 및 균주 83, FDC381, 및 HG66을 포함한 *포르피로모나스 긴기발리스*의 다른 균주로부터의 라이신-긴기파인 프로테아제(예를 들어, 각각 SEQ ID NO: 445-447)를 포함한다. 박테리아 병원체는 예를 들어, *에스케리키아, 클레브시엘라(Klebsiella)*, *스타필로콕커스*, *악시네토박터(Acinetobacter)*, 및 *슈도모나스*의 종, 특히 약물-내성 종 및 균주를 포함한다. 당업자는 항원을 표적에 식별시킬 수 있다. 항종양 적용을 위해, 종양 항원(예를 들어, 예시적인 종양 항원에 대한 예), 및 프로테아제,

역전사효소(RNA 바이러스의 경우), 및 DNA 폴리머라제, 및 다른 복제 효소가 표적일 수 있다. 병원체성 박테리아의 예시적인 종은: *이. 콜라이*, *에스. 아우레우스(S. aureus)*, *피. 애루기노사(P. aeruginosa)*, *케이. 뉴모니애(K. pneumoniae)*, *이. 패칼리스(E. faecalis)*, 및 *에스. 뉴모니애(S. pneumoniae)*를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0709] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)를 팬데믹으로 되게 하는 원인 제제(causative agent)인 신규 베타-코로나바이러스이다. 코로나바이러스 비리온은 숙주 세포 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2) 수용체에 결합하고 숙주 막과 바이러스 막의 융합을 통해 진입을 매개하는 자가 표면 스파이크(S) 당단백질을 함유한다. ACE2 수용체에의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 결합은 준안정한 융합전 회전배열로부터 고도로 안정한 융합후 회전배열로의 스파이크 단백질의 더 큰 회전배열 재배열을 야기하며, 이는 막 융합을 용이하게 한다. 이것이 세포 부착 및 진입을 매개하기 때문에, 스파이크(S) 단백질은 바이러스 생활 주기에 필수적이며, 중화 항체에 대한 1차 표적이고, 중요한 백신 항원이다(예를 들어, Hsieh *et al.* (2020) *Science* 369:1501-1505).

[0710] 최상의 또는 양호한 $CD8^{+}$를 초래한 SARS-COV2 바이러스 단백질은 하기를 포함한다(Cohen *et al.* (2021) *Cell. Rep. Med. 2*:100354):

SARS-CoV-2 단백질	CD8 T-세포 반응률	SEQ ID NO
S1	25%	438 (전장 스파이크 단백질); 439 (당단백질 유전자)
S2	12%	438 (전장 스파이크 단백질); 439 (당단백질 유전자)
외피 (E)	9%	450 (유전자); 451 (단백질)
막 (M)		452 (유전자); 453 (단백질)
뉴클레오캡시드 (N)	57%	462 (유전자); 463 (단백질)
ORF3a	16%	448 (유전자); 449 (단백질)
ORF6		454 (유전자); 455 (단백질)
ORF7a	25%	456 (유전자); 457 (단백질)
ORF7b		458 (유전자); 459 (단백질)
ORF8		460 (유전자); 461 (단백질)

[0711]

[0712] 스파이크 단백질의 S1 하위단위 내 수용체-결합 도메인(RBD; 예를 들어, SEQ ID NO: 440 참조)은 ACE2와 직접적으로 상호작용한다. S 단백질의 준안정한 융합전 회전배열은 "놓거나 아래로(laying or down)"인 것으로 지칭될 수 있는 한편, ACE2-실현 가능한 회전배열로의 회전배열 재배열은 "위로 또는 서 있는(up or standing)" 것으로 지칭될 수 있다. "아래로" 및 "위로"의 자세는 RBD의 회전배열 재배열에 기초하여 구별될 수 있다; 아래-위(down-to-up) 재배열은 수용체 결합을 용이하게 하는 한편, 위-아래(up-to-down)의 재배열은 바이러스가 면역 감시를 피하는 것을 돕는다(예를 들어, Shah *et al.* (2020) *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:3401-3414).

[0713] ACE2 수용체에의 결합에 뒤이어 막횡단 프로테아제 세린 2(TMPRSS2)의 절단이 이어진다. ACE2와 TMPRSS2는 둘 다 기도, 폐, 및 비강/구강 점막, 뿐만 아니라 장에서 풍부하게 발현된다. S 단백질에서 천연 발생 돌연변이는 중국(H49Y), 유럽(V367F 및 D614G), 및 미국(G476S 및 V483A)에서 식별되어 왔고, SARS-CoV-2의 세포 진입에 미치는 이의 효과에 대해 연구되어 왔다; ACE2 및 TMPRSS2를 발현하는 세포에서, G476S 돌연변이는 감소된 세포 진입을 초래하고, V483A 돌연변이는 세포 진입에 어떠한 효과도 갖지 않는 반면, D614G, V367F, 및 H49Y 돌연변이는 야생형 S 단백질과 비교하여 증강된 세포 진입을 초래한다. D614G 돌연변이는 인간 소기도 상피 세포에서도 관찰된 효과인, 야생형 S 단백질과 비교하여 3.5배 더 높은 수준의 진입 활성을 나타낸다. D614G 돌연변이는 또한 ACE2 수용체에 대해 증가된 결합 친화도를 초래한다. 더욱이, D614G 돌연변이체는 SARS-CoV-2 바이러스의 중화 민감도를 보유한다; 항-SARS-CoV-2 환자 혈청은 야생형 SARS-CoV-2와 D614G 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-

2를 둘 다 효과적으로 중화시킬 수 있었다(예를 들어, Ozono *et al.* (2021) *Nature Communications* 12:848). S 단백질은 삼량체로서 존재하고, 구조 분석은 D614G 돌연변이가 안정화되고 따라서 S 삼량체의 조기 해리를 방지함을 나타낸다(예를 들어, Zhang *et al.* (2021) *Science* 372:525-530). V367F 돌연변이체는 또한 2019년 12월 우한에서 처음으로 단리된 바와 같은 기준 균주 Wuhan-Hu-1과 비교하여 ACE2에 대해 더 높은 결합 친화도를 나타내는데, 이는 RBD 구조의 안정화로 인한 것일 수 있다. 바이러스 단리물은 또한 V367F 돌연변이와 D614G 돌연변이 둘 다로 식별되어 왔다. 계통 분석은 V367F 돌연변이가 D614G 돌연변이와 더불어 진화하였음을 시사하며, 이는 증가된 감염성의 상승작용 효과를 시사한다(예를 들어, Ou *et al.* (2021) *bioRvix*, doi:10.1101/2020.03.15.991844).

[0714] N501Y 돌연변이는 영국(B.1.1.7, 또는 20B/501Y.v1) 및 남아프리카(B.1.351, 또는 20C/501Y.v2)에서 SARS-CoV-2 계열에서 자연스럽게 출현하였고, SARS-CoV-2 S 단백질의 RBD 상의 인간 ACE2 결합 부위에서 발생한다. 분자의 역동적 자극은 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD에서의 N501이 인간 ACE2의 소수성 잔기 부근에 있음을 드러낸다; 그러므로, 친수성 N501로부터 소수성 잔기로의 돌연변이는 S 단백질과 인간 ACE2 사이의 상호작용을 향상시킬 수 있다. 실험적 스크린은, V, F, W 또는 Y로의 N501의 돌연변이가 RBD와 인간 ACE2의 결합을 증강시킬 수 있음을 시시한다. 이러한 결과는 시험관내 연구에서 확증되어 왔고, 돌연변이 N501Y, N501F, N501W, 및 N501V가 스파이크 단백질의 RBD와 인간 ACE2 사이에서 증강된 결합 친화도를 초래함을 보여준다(예를 들어, Luan *et al.* (2021) *FEBS Letters*, doi:10.1002/1873-3468.14076).

[0715] "HexaPro"로 표기된 프롤린 치환 F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, 및 V987P를 갖는 SARS-CoV-2 S-2P 변이체 스파이크 단백질의 돌연변이체(예를 들어, Hsieh *et al.* (2020) *Science* 369:1501-1505)는 이의 부모 작제물과 비교하여 증가된 발현 수준 및 안정성을 나타내었다. HexaPro 돌연변이체의 높은 수율 및 증가된 안정성은 하위단위 백신의 산업 생산을 가능하게 해야 한다; 이는 핵산 분자당 더 많은 항원을 생산하여 효능을 향상시키고/시키거나 필요한 투입량을 감소시킴으로써 DNA-기초 또는 mRNA-기초 백신을 향상시킬 수 있다(예를 들어, Hsieh *et al.* (2020) *Science* 369:1501-1505).

[0716] 발현 및/또는 ACE2 수용체에의 결합을 증강시키거나 향상시킬 수 있는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에서의 다른 돌연변이는 예를 들어, V417K(예를 들어, Shah *et al.* (2020) *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:3402-3414); G502D, N501T, 및 Q498Y, 뿐만 아니라 잔기 N439/R426, L452/R426, T470/N457, E484/P470, Q498/Y484 및 N501/T487에서의 돌연변이(예를 들어, Verkhivker *et al.* (2021) bioRxiv preprint; doi: 10.1101/2021.02.21.432165); 및 W436R 및 D364Y(예를 들어, Ou *et al.* (2021) *bioRvix*, doi:10.1101/2020.03.15.991844; 및 미국 특허 제10, 973,908호)를 포함한다.

[0717] 병원체, 예컨대 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2로서, COVID-19를 야기함)에 대해 보호하기 위해 백신으로서 사용되거나 바이러스 항원 및/또는 다른 단백질을 인코딩하기 위해 사용될 때 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 전장 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 438)을 인코딩할 수 있거나, SARS-CoV-2 스파이크 단백질(SEQ ID NO: 440)의 전장 수용체 결합 도메인(RBD)을 인코딩할 수 있거나, 면역 반응을 유도하거나 야기하기에 그리고/또는 SARS-CoV-2에 대해 면역화하거나 백신화하거나 보호하기에 충분한 스파이크 단백질 RBD의 부분을 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한, 스파이크 단백질 또는 RBD 또는 이의 일부의 발현을 증가시키거나 증강시키고/시키거나 ACE2 수용체에의 스파이크 단백질 또는 RBD 또는 이의 일부의 결합을 증가시키거나 증강시키는, 스파이크 단백질 또는 이의 일부, 예컨대 RBD 또는 이의 일부에 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 돌연변이체를 인코딩할 수 있다. 스파이크 단백질 또는 스파이크 단백질 RBD 돌연변이체는 돌연변이 V367F, D614G, G476S, V483A, H49Y, N501Y, N501F, N501W, N501V, F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P, V417K, G502D, N501T, Q498Y, W436R 및 D364Y를 포함하는 것, 및 스파이크 단백질 또는 이의 일부의 잔기 N439/R426, L452/R426, T470/N457, E484/P470, Q498/Y484 및 N501/T487에 상응하는 잔기에 돌연변이를 포함하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 본원에 기재되고 당업자에게 알려진 임의의 것을 포함한다. 면역자극성 박테리아는 예를 들어, 미국 특허 제10,973,908호 및 제10,702,600호에 기재된 스파이크 단백질 또는 RBD 또는 이의 일부를 포함한 임의의 항원 서열 또는 변형된 형태를 인코딩함으로써 SARS-CoV-2에 대한 백신으로서 사용될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한, Pfizer-BioNTech COVID-19 백신, 또는 Moderna COVID-19 백신에 활용되는 mRNA 서열을 전달하기 위해 백신으로서 사용될 수 있으며, 여기서:

[0718] 1) 세계 보건 기구에 의해 발표된 바와 같이 Pfizer-BioNTech COVID-19 백신에서 mRNA의 서열은 5'-캡핑 구조, 5' 비번역 영역(UTR), S 당단백질의 연장된 신호 서열, 돌연변이 K986P 및 V987P를 함유하는 전장 스파이크(S)

당단백질 서열을 인코딩하는 핵산, 및 poly(A) 테일을 포함하고, 하기 서열을 포함하며:

```
GAGAAΨAAAC ΨAGΨAΨΨCΨΨ CΨGGΨCCCCA CAGACΨCAGA GAGAACCCGC   50
CACCAΨGΨΨC GΨGΨΨCCΨGG ΨGCΨGCΨGCC ΨCΨGGΨGΨCC AGCCAGΨGΨG  100
ΨGAACCΨGAC CACCAGAACA CAGCΨGCCΨC CAGCCΨACAC CAACAGCΨΨΨ  150
ACCAGAGGCG ΨGΨACΨACCC CGACAAGGΨG ΨΨCAGAΨCCA GCGΨGCΨGCA  200
CΨCΨACCCAG GACCΨGΨΨCC ΨGCCΨΨΨCΨΨ CAGCAACGΨG ACCΨGGΨΨCC  250
ACGCCAΨCCA CGΨGΨCCGGC ACCAAΨGGCA CCAAGAGAΨΨ CGACAACCCC  300
GΨGCΨGCCCΨ ΨCAACGACGG GGΨGΨACΨΨΨ GCCAGCACCG AGAAGΨCCAA  350
CAΨCAΨCAGA GGCΨGGAΨCΨ ΨCGGCACCAC ACΨGGACAGC AAGACCCAGA  400
GCCΨGCΨGAΨ CGΨGAACAAC GCCACCAACG ΨGGΨCAΨCAA AGΨGΨGCGAG  450
ΨΨCCAGΨΨCΨ GCAACGACCC CΨΨCCΨGGGC GΨCΨACΨACC ACAAGAACAA  500
CAAGAGCΨGG AΨGGAAAGCG AGΨΨCCGGGΨ GΨACAGCAGC GCCAACAACΨ  550
GCACCΨΨCGA GΨACGΨGΨCC CAGCCΨΨΨCC ΨGAΨGGACCΨ GGAAGGCAAG  600
CAGGGCAACΨ ΨCAAGAACCΨ GCGCGAGΨΨC GΨGΨΨΨAAGA ACAΨCGACGG  650
CΨACΨΨCAAG AΨCΨACAGCA AGCACACCCC ΨAΨCAACCΨC GΨGCGGGAΨC  700
ΨGCCΨCAGGG CΨΨCΨCΨGCΨ CΨGGAACCCC ΨGGΨGGAΨCΨ GCCCAΨCGGC  750
AΨCAACAΨCA CCCGGΨΨΨCA GACACΨGCΨG GCCCΨGCACA GAAGCΨACCΨ  800
GACACCΨGGC GAΨAGCAGCA GCGGAΨGGAC AGCΨGGΨGCC GCCGCΨΨACΨ  850
AΨGΨGGGCΨA CCΨGCAGCCΨ AGAACCΨΨCC ΨGCΨGAAGΨA CAACGAGAAC  900
GGCACCAΨCA CCGACGCCGΨ GGAΨΨGΨGCΨ CΨGGAΨCCΨC ΨGAGCGAGAC  950
AAAGΨGCACC CΨGAAGΨCCΨ ΨCACCGΨGGA AAAGGGCAΨC ΨACCAGACCA 1000
GCAACΨΨCCG GGΨGCAGCCC ACCGAAΨCCA ΨCGΨGCGGΨΨ CCCCAAΨAΨC 1050
ACCAAΨCΨGΨ GCCCCΨΨCGG CGAGGΨGΨΨC AAΨGCCACCA GAΨΨCGCCΨC 1100
ΨGΨGΨACGCC ΨGGAACCGGA AGCGGAΨCAG CAAΨΨGCGΨG GCCGACΨACΨ 1150
CCGΨGCΨGΨA CAACΨCCGCC AGCΨΨCAGCA CCΨΨCAAGΨG CΨACGGCGΨG 1200
ΨCCCCΨACCA AGCΨGAACGA CCΨGΨGCΨΨC ACAAACGΨGΨ ACGCCGACAG 1250
CΨΨCGΨGAΨC CGGGGAGAΨG AAGΨGCGGCA GAΨΨGCCCCΨ GGACAGACAG 1300
GCAAGAΨCGC CGACΨACAAC ΨACAAGCΨGC CCGACGACΨΨ CACCGGCΨGΨ 1350
GΨGAΨΨGCCΨ GGAACAGCAA CAACCΨGGAC ΨCCAAAGΨCG GCGGCAACΨA 1400
CAAΨΨACCΨG ΨACCGGCΨGΨ ΨCCGGAAGΨC CAAΨCΨGAAG CCCΨΨCGAGC 1450
GGGACAΨCΨC CACCGAGAΨC ΨAΨCAGGCCG GCAGCACCCC ΨΨGΨAACGGC 1500
GΨGGAAGGCΨ ΨCAACΨGCΨA CΨΨCCCACΨG CAGΨCCΨACG GCΨΨΨCAGCC 1550
CACAAAΨGGC GΨGGGCΨAΨC AGCCCΨACAG AGΨGGΨGGΨG CΨGAGCΨΨCG 1600
AACΨGCΨGCA ΨGCCCCΨGCC ACAGΨGΨGCG GCCCΨAAGAA AAGCACCAAΨ 1650
CΨCGΨGAAGA ACAAAΨGCGΨ GAACΨΨCAAC ΨΨCAACGGCC ΨGACCGGCAC 1700
CGGCGΨGCΨG ACAGAGAGCA ACAAGAAGΨΨ CCΨGCCAΨΨC CAGCAGΨΨΨG 1750
GCCGGGAΨAΨ CGCCGAΨACC ACAGACGCCG ΨΨAGAGAΨCC CCAGACACΨG 1800
GAAAΨCCΨGG ACAΨCACCCC ΨΨGCAGCΨΨC GGCGGAGΨGΨ CΨGΨGAΨCAC 1850
CCCΨGGCACC AACACCAGCA AΨCAGGΨGGC AGΨGCΨGΨAC CAGGACGΨGA 1900
ACΨGΨACCGA AGΨGCCCGΨG GCCAΨΨCACG CCGAΨCAGCΨ GACACCΨACA 1950
ΨGGCGGGΨGΨ ACΨCCACCGG CAGCAAΨGΨG ΨΨΨCAGACCA GAGCCGGCΨG 2000
ΨCΨGAΨCGGA GCCGAGCACG ΨGAACAAΨAG CΨACGAGΨGC GACAΨCCCCA 2050
ΨCGGCGCΨGG AAΨCΨGCGCC AGCΨACCAGA CACAGACAAA CAGCCCΨCGG 2100
AGAGCCAGAA GCGΨGGCCAG CCAGAGCAΨC AΨΨGCCΨACA CAAΨGΨCΨCΨ 2150
GGGCGCCGAG AACAGCGΨGG CCΨACΨCCAA CAACΨCΨAΨC GCΨAΨCCCCA 2200
CCAACΨΨCAC CAΨCAGCGΨG ACCACAGAGA ΨCCΨGCCΨGΨ GΨCCAΨGACC 2250
AAGACCAGCG ΨGGACΨGCAC CAΨGΨACAΨC ΨGCGGCGAΨΨ CCACCGAGΨG 2300
CΨCCAACCΨG CΨGCΨGCAGΨ ACGGCAGCΨΨ CΨGCACCCAG CΨGAAΨAGAG 2350
CCCΨGACAGG GAΨCGCCGΨG GAACAGGACA AGAACACCCA AGAGGΨGΨΨC 2400
GCCCAAGΨGA AGCAGAΨCΨA CAAGACCCCΨ CCΨAΨCAAGG ACΨΨCGGCGG 2450
CΨΨCAAΨΨΨC AGCCAGAΨΨC ΨGCCCGAΨCC ΨAGCAAGCCC AGCAAGCGGA 2500
GCΨΨCAΨCGA GGACCΨGCΨG ΨΨCAACAAAG ΨGACACΨGGC CGACGCCGGC 2550
ΨΨCAΨCAAGC AGΨAΨGGCGA ΨΨGΨCΨGGGC GACAΨΨGCCG CCAGGGAΨCΨ 2600
GAΨΨΨGCGCC CAGAAGΨΨΨA ACGGACΨGAC AGΨGCΨGCCΨ CCΨCΨGCΨGA 2650
```

[0719]

CCGAΨGAGAΨ GAΨCGCCCAG ΨACACAΨCΨG CCCΨGCΨGGC CGGCACAAΨC 2700
ACAAGCGGCΨ GGACAΨΨΨGG AGCAGGCGCC GCΨCΨGCAGA ΨCCCCΨΨΨGC 2750
ΨAΨGCAGAΨG GCCΨACCGGΨ ΨCAACGGCAΨ CGGAGΨGACC CAGAAΨGΨGC 2800
ΨGΨACGAGAA CCAGAAGCΨG AΨCGCCAACC AGΨΨCAACAG CGCCAΨCGGC 2850
AAGAΨCCAGG ACAGCCΨGAG CAGCACAGCA AGCGCCCΨGG GAAAGCΨGCA 2900
GGACGΨGGΨC AACCAGAAΨG CCCAGGCACΨ GAACACCCΨG GΨCAAGCAGC 2950
ΨGΨCCΨCCAA CΨΨCGGCGCC AΨCAGCΨCΨG ΨGCΨGAACGA ΨAΨCCΨGAGC 3000
AGACΨGGACC CΨCCΨGAGGC CGAGGΨGCAG AΨCGACAGAC ΨGAΨCACAGG 3050
CAGACΨGCAG AGCCΨCCAGA CAΨACGΨGAC CCAGCAGCΨG AΨCAGAGCCG 3100
CCGAGAΨΨAG AGCCΨCΨGCC AAΨCΨGGCCG CCACCAAGAΨ GΨCΨGAGΨGΨ 3150
GΨGCΨGGGCC AGAGCAAGAG AGΨGGACΨΨΨ ΨGCGGCAAGG GCΨACCACCΨ 3200
GAΨGAGCΨΨC CCΨCAGΨCΨG CCCCΨCACGG CGΨGGΨGΨΨΨ CΨGCACGΨGA 3250
CAΨAΨGΨGCC CGCΨCAAGAG AAGAAΨΨΨCA CCACCGCΨCC AGCCAΨCΨGC 3300
CACGACGGCA AAGCCCACΨΨ ΨCCΨAGAGAA GGCGΨGΨΨCG ΨGΨCCAACGG 3350
CACCCAΨΨGG ΨΨCGΨGACAC AGCGGAACΨΨ CΨACGAGCCC CAGAΨCAΨCA 3400
CCACCGACAA CACCΨΨCGΨG ΨCΨGGCAACΨ GCGACGΨCGΨ GAΨCGGCAΨΨ 3450
GΨGAACAAΨA CCGΨGΨACGA CCCΨCΨGCAG CCCGAGCΨGG ACAGCΨΨCAA 3500
AGAGGAACΨG GACAAGΨACΨ ΨΨAAGAACCA CACAAGCCCC GACGΨGGACC 3550
ΨGGGCGAΨAΨ CAGCGGAAΨC AAΨGCCAGCG ΨCGΨGAACAΨ CCAGAAAGAG 3600
AΨCGACCGGC ΨGAACGAGGΨ GGCCAAGAAΨ CΨGAACGAGA GCCΨGAΨCGA 3650
CCΨGCAAGAA CΨGGGGAAGΨ ACGAGCAGΨA CAΨCAAGΨGG CCCΨGGΨACA 3700
ΨCΨGGCΨGGG CΨΨΨAΨCGCC GGACΨGAΨΨG CCAΨCGΨGAΨ GGΨCACAAΨC 3750
AΨGCΨGΨGΨΨ GCAΨGACCAG CΨGCΨGΨAGC ΨGCCΨGAAGG GCΨGΨΨGΨAG 3800
CΨGΨGGCAGC ΨGCΨGCAAGΨ ΨCGACGAGGA CGAΨΨCΨGAG CCCGΨGCΨGA 3850
AGGGCGΨGAA ACΨGCACΨAC ACAΨGAΨGAC ΨCGAGCΨGGΨ ACΨGCAΨGCA 3900
CGCAAΨGCΨA GCΨGCCCCΨΨ ΨCCCGΨCCΨG GGΨACCCCGA GΨCΨCCCCCG 3950
ACCΨCGGGΨC CCAGGΨAΨGC ΨCCCACCΨCC ACCΨGCCCCA CΨCACCACCΨ 4000
CΨGCΨAGΨΨC CAGACACCΨC CCAAGCACGC AGCAAΨGCAG CΨCAAAACGC 4050
ΨΨAGCCΨAGC CACACCCCCA CGGGAAACAG CAGΨGAΨΨAA CCΨΨΨAGCAA 4100
ΨAAACGAAAG ΨΨΨAACΨAAG CΨAΨACΨAAC CCCAGGGΨΨG GΨCAAΨΨΨCG 4150
ΨGCCAGCCAC ACCCΨGGAGC ΨAGCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4200
AAAAGCAΨAΨ GACΨAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4250
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 4284

[0720]

[0721] 여기서 ψ = 1-메틸-3'-슈도우리딜릴이고, 서열은 하기 특징을 갖고:

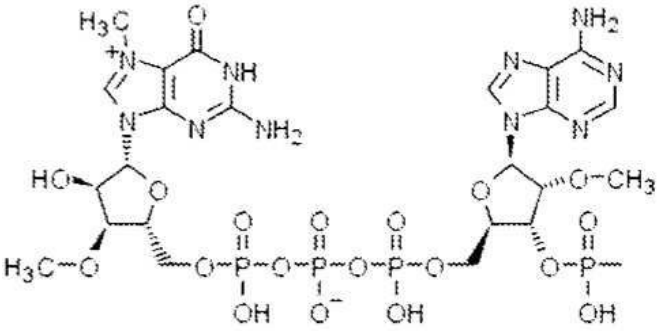
요소	설명	뉴클레오타이드 위치
캡	변형된 5'-cap1 구조($m^7G^+m^{3'}$-5'-ppp-5'-Am)	1-2
5'-UTR	최적화된 코작 서열을 갖는 인간 알파-글로빈 RNA 로부터 유래된 5'-비번역 영역	3-54
sig	S 당단백질 신호 펩타이드(연장된 리더 서열)로서, 소포체 내로의 신생 폴리펩타이드 사슬의 전좌를 가이드함.	55-102

[0722]

S 단백질_mut	S 당단백질이 항원적으로 최적의 융합전 회전배열에 남아 있는 것을 보장하기 위해 돌연변이 K986P 및 V987P 를 함유하는 전장 SARS-CoV-2 스파이크(S) 당단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 서열; 정지 코돈: 3874-3879(밑줄 표시)	103-3879
3'-UTR	3' 비번역 영역은 RNA 안정성 및 높은 총 단백질 발현을 부여하기 위해 미토콘드리아 인코딩된 12S 리보솜 RNA 및 분할(AES) mRNA 의 아미노-말단 인핸서로부터 유래된 2 개의 서열 요소를 포함함.	3880-4174
poly(A)	30 개의 아데노신 잔기, 뒤이어 10-뉴클레오타이드 링커 서열 및 또 다른 70 개 아미노산 잔기로 구성된 110-뉴클레오타이드 폴리(A)-테일.	4175-4284

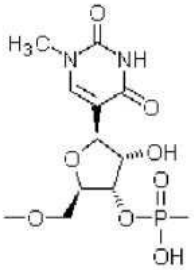
[0723]

[0724] 5' 캡핑 구조의 구조는 하기이며:



[0725]

[0726] m1ψ = 1-메틸-3'-슈도우리딜릴일 구조는 하기이고:



[0727] ; 및

[0728] 2) Moderna COVID-19 백신의 서열은 예를 들어, github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273/blob/main/Assemblies%20of%20putative%20SARS-CoV2-spike-encoding%20mRNA%20sequences%20for%20vaccines%20BNT-162b2%20and%20mRNA-1273.docx.pdf로부터 입수 가능하다.

[0729] 대안적으로, github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273/blob/main/Assemblies%20of%20putative%20SARS-CoV2-spike-encoding%20mRNA%20sequences%20for%20vaccines%20BNT-162b2%20and%20mRNA-1273.docx.pdf로부터 입수 가능한 바와 같이 Pfizer-BioNTech COVID-19 백신에서 mRNA에 대한 서열이 사용될 수 있다.

[0730] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 또한, 진드기-매개 및 다른 곤충-매개 질환, 및 다른 감염성 병원체, 예컨대 프리온 및 말라리아 병원체, 예컨대 *플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum)*, 뿐만 아니라 박테리아 및 바이러스 병원체로부터 보호하고/하거나 이를 치료하기 위해 항원을 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한, *플라스모듐*, *씨. 디피실레(C. difficile)*, 및 *리스테리아*를 포함한 박테리아 및 원생동물 병원체에 대한 백신으로서 사용될 수 있다. *살모넬라* 및 다른 박테리아는 백신에 사용되어 왔고; 임의의 이러한 기지의 백신은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 항원(들)을 인코딩함으로써 향상될 수 있다.

[0731] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 병원체, 특히 바이러스 병원체에 대한 면역력 또는 면역 반응을 유도하여 효과적인 항체 및 T-세포 반응을 초래할 수 있다. 면역자극성 박테리아, 예컨대 살모넬라 박테리아는 이러한 박테리아가 골수성 세포를 주로 또는 단독으로 감염시키게 하는 변형을 포함하고, 항바이러스 면역 반응을 자극시키거나 유도하는 치료 생성물, 예컨대 항원 및 항체, 뿐만 아니라 추가의 면역-자극 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 전달한다. 면역자극성 박테리아는 이러한 항원-제시 세포를 감염시키며, 여기서 인코딩된 치료 생성물(들)이 발현된다.

[0732] 면역자극성 박테리아는 항원을 인코딩할 수 있으며, 이는 바이러스 또는 박테리아 또는 다른 병원체가 감염된 세포에 도달하기 전에 이를 인식하는 항체를 포함하여 항체를 생산하는 숙주의 면역계를 초래한다. 항바이러스로서 사용하기 위한 면역자극성 박테리아는 항원을 인코딩할 수 있을 뿐만 아니라, 이는 항체 및 면역자극성 단백질을 인코딩하여 숙주의 항바이러스 반응을 증강시킬 수 있다. 백신으로서 사용하기 위해, 항원 및 다른 이종성 단백질을 인코딩하는 면역자극성 박테리아는 면역을 초래하거나 질환의 감소된 중증도를 초래하거나, 지속적 바이러스 감염의 재발을 방지한다. 인코딩된 항체는 이의 단일-사슬 형태, 예컨대 단일-사슬 가변 단편(scFv), 나노체(nanobody), 및 다른 이러한 구조를 포함한다. 항바이러스 면역 반응을 증강시키거나 촉진하는 인코딩 면역자극성 단백질(본원에 기재됨), 예컨대 STING으로부터 유래되는 것 및 또한 박테리아의 게놈 변형, 예컨대 아스파라기나제 II의 발현을 무효화시키거나 감소시켜 T-세포 반응을 증강시키는 변형을 포함한 박테리아의 면역자극성 특성은 유형 I IFN의 활성화를 포함하여 강력한 항병원체 치료제를 초래한다. 본원에 논의된 바와 같이, 비활성화된 병원체 백신, 예컨대 결핵에 대한 BCG 백신은 병원체를 변형시켜 아스파라기나제 활성을 비활성화시키거나 무효화시킴으로써 향상될 수 있다. 아스파라기나제는 백신에 대한 면역 반응을 감소시키거나 저해할 수 있다; 아스파라기나제 활성을 무효화시키거나 감소시키는 것은 백신, 예컨대 BCG 백신의 효과성을 향상시킬 수 있다.

[0733] **F.박테리아 전달을 위한 치료 생성물을 인코딩하는 예시적인 플라스미드의 작제**

[0734] 본원에서 면역자극성 박테리아는 항종양 반응을 촉진하거나, 유도하거나, 증강시킬 수 있는 면역조절성 단백질을 포함한 하나 이상의 치료 생성물을 인코딩하도록 변형될 수 있다. 치료 생성물은 진핵생물 대상체, 특히 면역자극성 박테리아가 투여될 대상체, 예컨대 인간에서의 발현을 위해 진핵생물 프로모터, 예컨대 RNA 폴리머라제 II에 의해 인식되는 프로모터의 제어 하에 박테리아 내 플라스미드 상에서 인코딩될 수 있다. 치료 생성물(들)을 인코딩하는 핵산은 진핵생물 프로모터에 더하여, 세포에서의 발현 또는 트래피킹을 위해, 예컨대 세포 표면 상에서의 분비 또는 발현을 위해 다른 조절 신호를 포함할 수 있다. 면역자극성 단백질은 적절한 환경, 예컨대 종양 미세환경(TME)에서 면역자극성 박테리아가 투여되는 대상체에 의한 항종양 반응을 촉진하거나 이에 참여하거나 이를 증강시킬 수 있는 것이다. 면역자극성 단백질은 사이토카인, 케모카인, 및 공동자극성 분자를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 이는 사이토카인, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, IL-2, IL-7, IL-12, IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-15/IL-15Rα 사슬 복합체, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2Ra에 대해 약독화된 결합을 갖는 IL-2, IL-2Ra에 결합하지 않도록 변형된 IL-2, IFN-α, 및 IFN-β; 케모카인, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, 및 CXCL11; T-세포의 모집 및/또는 지속에 관여하거나 이를 발휘하거나 강화시키는 단백질; 및/또는 공동자극성 분자, 예컨대 그러나 이로 제한되지 않는, CD40, CD40L, OX40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, 세포질 도메인의 결실을 갖는 4-1BBL(4-1BBLΔcyt), ICOS, ICOS 리간드, CD27, CD27 리간드, CD80, CD86, TNF/TNFR 슈퍼계열의 구성원, 및 B7-CD28 계열의 구성원을 포함한다. 당업자에게 알려진 종양의 치료에 사용되거나 항종양 반응을 촉진하거나, 증강시키거나, 다르게 증가시키거나 발생시킬 수 있는 다른 이러한 면역자극성 단백질은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에서 인코딩하는

데 고려된다.

[0735] 본원의 면역자극성 박테리아에 의해 인코딩되는 다른 치료 생성물은 STING, MDA5, RIG-I, IRF3 및 IRF7을 포함하여 유형 I 인터페론 생산을 유도하거나 활성화시키는 세포질 DNA/RNA 센서, 뿐만 아니라 이의 기능-획득 및 항시적 활성 변이체, 및 본원에 기재된 바와 같은 키메라 STING 폴리펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 항시적으로 활성인 STING 변이체는 돌연변이 V147L, N154S, V155M, C206Y, R281Q, 및/또는 R284G, 및 이의 조합, 예컨대 N154S/R284G, 및 본원에 기재되고 당업계에 알려진 다른 것을 포함하는 반면, 항시적으로 활성인 IRF3 변이체는 돌연변이 S396D, S398D, S402D, T404D, 및/또는 S405D, 및 본원에 기재되고 당업계에 알려진 다른 돌연변이를 갖는 것을 포함한다. 본원의 면역자극성 박테리아에 의해 인코딩되는 다른 치료 생성물에는 단일 사슬 단편 가변(scFv), Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, 이황화 결합 Fv(dsFvs), Fd 단편, Fd' 단편, 단일 사슬 Fab(scFab), 이중체, 항-이디오타입(항-Id) 항체, 합성 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 인간 항체, 비-인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 및 인트라바디, 또는 상기 중 임의의 것의 항원-결합 단편을 비롯한 항체 및 항체 단편이 포함된다. 항체는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO 1 및 2, CTNNB1(β-카테닌), SIRPα, VISTA 및 TREX-1 및 다른 당업계에 알려지거나 본원에 기재된 바와 같은 면역 체크포인트에 대해 지시될 수 있거나, TGF-β, VEGF, HER2, EGFR, STAT3 및 IL-6과 같은 다른 표적, 및 저해가 항종양 반응을 개선하는 다른 이러한 표적에 대해 지시될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한 TREX1과 같은 면역 체크포인트에 대한 siRNA(shRNA 및 miRNA)와 같은 RNAi, 및 저해, 억제 또는 방해가 항종양 반응을 개선하는 다른 표적을 인코딩할 수 있다.

[0736] 일부 구현예에서, 본원의 면역자극성 박테리아는 IL-2, IL-7, IL-12(IL-12p70(IL-12p4 0+ IL-12p35)), IL-15(및 IL-15:IL-15R 알파 사슬 복합체(IL-15/IL-Rα)), IL-18, IL-21, IL-23, IL-36 감마, IFN-알파 및 IFN-베타를 포함하지만 이로 제한되지 않는 면역계를 자극하기 위해 하나 이상의 사이토카인을 인코딩하도록 조작된다. 사이토카인은 종양 부위에서 면역 이펙터 세포와 기질 세포를 자극하고 세포독성 세포에 의한 종양 세포 인식을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 면역자극성 박테리아는 예를 들어 CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 및 CXCL11 중 하나 이상과 같은 케모카인을 인코딩하도록 조작될 수 있다. 임의의 치료 생성물의 상보적 조합은 인코딩되어 종양 미세환경으로 전달되어 면역자극성 박테리아의 항종양 효능을 향상시킬 수 있다. 이러한 변형 및 이를 인코딩하는 면역자극성 박테리아는 위에서 논의되고 아래에 예시되어 있다.

[0737] **1.단백질의 이중성 발현을 위한 항시적 프로모터**

[0738] 본원에 제공된 플라스미드는 포유동물 대상체에서 발현될 때 종양 미세환경에서 항종양 면역력을 부여하거나 이에 기여하는 면역자극성 단백질과 같은 치료 생성물을 인코딩하도록 설계되었으며; 면역자극성 단백질 또는 다른 치료 생성물은 RNA 중합효소 II(RNAP II)에 의해 인식되는 프로모터와 같은 진핵 프로모터의 제어 하에 박테리아의 플라스미드에 인코딩된다. 일반적으로 프로모터는 후기 진핵생물 바이러스 프로모터와 같은 항시적 프로모터이다. 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 신장 인자-1 알파(EF-1α) 프로모터, 유비퀴틴 C(UBC) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제 1(PGK) 프로모터, 닭 β-액틴(CBA) 프로모터 및 이의 유도체 프로모터 CAGG 또는 CAG, β-글루쿠로니다제(GUSB) 프로모터, MND 프로모터(골수증식성 육종 바이러스 인핸서 및 결실된 음성 대조군 영역이 있는 변형된 MoMuLV(몰로니 뮤린 백혈병 바이러스) LTR의 U3 영역을 포함하는 합성 프로모터), 진핵생물 개시 인자 4A-I(EIF4A1) 프로모터, CD68 프로모터 및 GAPDH 프로모터를 포함하지만 이로 제한되지 않는다(예를 들어, Powell *et al.* (2015) *Discov. Med.* 19(102):49-57). CAG 프로모터는 하기로 구성된다: (C) 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소; (A) 닭 베타-액틴 유전자의 프로모터, 제1 엑손 및 제1 인트론; 및 (G) 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체. MND는 변형된 MoMuLV(몰로니 뮤린 백혈병 바이러스) LTR의 U3 영역과 골수증식성 육종 바이러스 인핸서 및 결실된 음성대조군 영역과 함께 포함하는 합성 프로모터이다(뮤린백혈병 바이러스 유래 MND 프로모터(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성대조군 결실, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환됨), 예를 들어 Li 등 (2010) J. Neurosci. Methods 189:56-64 참조).

[0739] 이들 프로모터 중 2개 이상은 플라스미드 상의 다중 개방 리딩 프레임(ORF)에 인코딩될 수 있다. CMV를 포함하지만 이로 제한되지 않는 특정 프로모터는 다중 cAMP 반응 요소 결합 단백질(CREB) 부위를 포함한다. 이러한 요소를 포함하는 플라스미드가 세포질로 방출될 때, 예를 들어 박테리아 방해 후 세포질로 방출되는 *에스. 티피무리움* 내에 포함된 플라스미드는 CREB-매개 숙주 미세소관 기구를 사용하여 핵으로 효율적으로 셔틀될 수 있다(예를 들어, Bai 등 (2017) Biosci. Rep. 37(6):BSR20160616).

[0740] 플라스미드는 asd의 발현을 위한 박테리아 프로모터, 및 치료제의 발현을 위한 진핵생물 프로모터를 포함하는

다중 프로모터를 포함할 수 있다. 다양한 구성의 프로모터 및 다른 조절 서열이 치료 생성물의 발현을 개선하고 박테리아 성장 및 적합성을 개선하기 위해 평가되었다. 예를 들어, 시험된 구성 중에서 플라스미드 상의 진핵생물 발현 카세트의 방향을 역전시키고 하나 이상의 박테리아 종결인자를 포함하는 것은 인코딩된 페이로드 발현의 효율을 증가시킬 수 있고 박테리아 적합도를 개선할 수 있다.

[0741] **2.다수의 치료 생성물 발현 카세트**

[0742] **a.단일 프로모터 작제물**

[0743] 단일 작제물로부터 동일한 세포에서 다중 유전자의 발현이 달성될 수 있으며, 항종양 반응과 같은 원하는 생물학적 효과를 이끌어내기 위해 여러 단백질의 동시 발현이 필요할 때 유리하다. 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열은 단일 프로모터의 제어 하에 2개의 인코딩 서열을 분리하는 데 사용되었지만, 제2 단백질의 발현 수준은 제1 단백질와 비교하여 감소될 수 있고, IRES 서열의 길이는 포장 용량이 작은 바이러스를 사용할 때와 같은 특정 경우에는 금지된다. 리보솜 건너뛰기 이벤트를 매개하는 2A 펩타이드로 알려진 짧은(약 18개 내지 22개 아미노산 길이) 바이러스 유래 펩타이드 서열의 발견으로 단일 mRNA에서 유사한 수준의 여러 개별 펩타이드 생성물을 생성할 수 있다. 2A 펩타이드 인코딩 서열은 폴리펩타이드-코딩 이식유전자 사이에 포함된다(예를 들어, Daniels 등 (2014) PLoS One 9(6):e100637 참조).

[0744] IRES 요소 및 2A 펩타이드는 하나의 전사체에서 여러 유전자의 공동 발현을 위해 상이한 기전을 사용한다. 예를 들어, IRES 요소를 사용하여 하나의 mRNA에서 여러 유전자를 발현하는 경우, 프로모터의 바로 다운스트림에 있는 유전자는 표준 캡 의존성 기전에 의해 번역되고 IRES 요소의 다운스트림에 있는 유전자는 캡-독립적 기전에 의해 번역되며, 이는 캡 의존성 메카니즘보다 번역 효율이 낮아 IRES 구동 유전자의 낮은 발현과 함께 불균형 발현을 초래한다(예를 들어, Chng 등 (2015) mAbs 7(2):403-412 참조). 반면에 2A 연결된 유전자는 하나의 개방 리딩 프레임(ORF)에서 번역된다. 2A 서열에 의해 분리된 단백질의 절두는 펩타이드 결합이 종종 2A 펩타이드의 C-말단 글리신과 프롤린 사이에서 형성되지 않는(즉, 펩타이드 결합이"건너뛴") 비전통적인 과정에서 동시 번역적으로 발생한다. 그럼에도 불구하고 번역이 진행되고 두 개의 별개의 단백질이 동일한 양으로 생성된다. 2A 펩타이드 서열의 약 20개 아미노산을 인코딩하는 짧은 스트레치는 결합 건너뛰기를 유발하기에 충분하다. 그러나 결합 건너뛰기가 발생하지 않으면 이후에 절두되지 않는 융합 단백질이 생성된다(예를 들어, Daniels 등 (2014) PLoS One 9(6):e100637 참조).

[0745] 이들 2A 펩타이드 중 다수는 *테사 아시그나* 바이러스로부터의 T2A(예를 들어 SEQ ID NO: 327 참조), 돼지 테스코바이러스-1로부터의 P2A(예를 들어 SEQ ID NO: 328), 말 비염 A 바이러스로부터의 E2A(SEQ ID NO: 329 참조), 및 구제역 바이러스로부터의 F2A(예를 들어 SEQ ID NO: 330 참조)를 포함한다. 여러 연구에서 다양한 2A 펩타이드의 상충되는 절단 효율이 보고되었으며, 2A 펩타이드의 절두 효율은 발현된 단백질의 특성, 2A 서열을 플랭킹하는 유전자의 순서, 사용된 2A 펩타이드의 길이 및 업스트림 단백질과 2A 펩타이드 사이의 링커에 의해 영향을 받을 수 있다. 절단 효율 및 강화된 단백질 발현은 종종 펩타이드 푸린 절단 서열, RRKR과 같은 업스트림 바이러스 절단 서열의 사용을 통해 개선될 수 있을 뿐만 아니라 GSG 및 SGS 펩타이드 링커, V5 에피토프 태그(GKPUPNPLLGLDST), 또는 2A 바로 앞에 있는 3xFlag 에피토프 태그를 삽입함으로써 개선될 수 있다(예를 들어, Chng 등 (2015) mAbs 7(2):403-412 참조).

[0746] 단일 프로모터 및 ORF를 갖는 면역조절 단백질과 같은 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 본원의 면역자극성 박테리아는 캡 독립적인 바이러스 내부 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용을 통해 또는 2A 펩타이드의 번역 판독 및 동일하게 발현된 공동 단백질로의 후속 자가 절단을 통해 2개 이상의 단백질을 발현할 수 있다. 플라스미드는 하기 및 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이 다른 조절 요소를 함유할 수 있다. 예를 들어, 예시적인 작제물(실시예 14 참조)은 CMV-muIL-2 CO_T2A_muIFN-α2-WPRE이며, 여기서 코돈 최적화된 뮤린 IL-2는 CMV 프로모터 및 T2A 펩타이드를 사용하여 뮤린 IFN-α2와 공동 발현된다. 또한 WHP(우드척 간염 바이러스) 전사후 조절 요소(WPRE)가 포함되어 발현을 향상시킨다. 예를 들어, 제3 치료제가 플라스미드에 의해 발현되는 경우, 2A 서열은 제1 프로모터, 예를 들어, CMV의 제어 하에 발현되는 처음 2개의 단백질에 의해 플랭킹되고, 제3 단백질은 제2 프로모터, 예를 들어 EF-1α의 제어 하에 인코딩된다. 이러한 작제물의 예는 CMV-muIL-15Rα/IL-15sc_T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE이며, 여기서 뮤린 15Rα/IL-15sc 및 대체 R283G 또는 N153S/R283G(인간 STING에서 R284G 또는 N154S/R284G에 각각 상응함)를 갖는 뮤린 STING은 T2A를 사용하는 CMV 프로모터의 제어 하에 공동발현되고 뮤린 IL-18은 EF-1α 프로모터의 제어 하에 별도로 발현된다. 이 예시적인 작제물은 또한 향상된 발현을 위해 WPRE를 포함한다.

[0747] 본원에 기재된 바와 같이, 면역자극성 박테리아는, 인코딩된 항원(들)이 박테리아에서 전사를 위해 박테리아 프

로모터의 제어 하에 발현되지만 박테리아에서의 번역을 방지하는 조절 서열, 예컨대 IRES를 포함하나, 진핵 숙주, 예컨대 인간에서의 번역을 용이하게 하거나 허용하는 백신으로서 사용될 수 있다. 이러한 항원을 인코딩하는 핵산 작제물은 선택적으로 추가의 면역계/반응 증강 단백질, 예컨대 STING 단백질, 및/또는 사이토카인, 및/또는 다른 조합을 인코딩할 수 있으며, 이는 효과면에서 아쥬반트로서 작용한다.

[0748] **b.이중/다중 프로모터 작제물**

[0749] 대안적으로, 유전자 페이로드/치료 생성물은 이중 또는 다중 프로모터 구성을 사용하여 발현될 수 있으며, 여기서 각각의 단백질은 별도의 프로모터의 제어 하에 발현된다. 따라서, 조합으로 발현되는 면역조절 단백질과 같은 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드는 다중 프로모터를 함유할 수 있으며, 각각은 적절한 정지 코돈 처리(즉, 이중/다중 프로모터 구성)로 개별 온전한 ORF를 제어하며; 또는 다중 단백질은 2A 펩타이드(즉, 단일 프로모터 작제물)의 사용을 통해 단일 ORF에서 발현될 수 있으며; 또는 플라스미드는 상기 기재된 바와 같이 3개 이상의 단백질을 발현하기 위해 단일 및 이중/다중 프로모터 작제물의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0750] **3.조절 요소**

[0751] **a.전사-후 조절 요소**

[0752] 단일 플라스미드로부터 단일 및 다중 치료제/면역조절 단백질의 발현을 향상시키기 위해, 관심 단백질(들)의 전사 및 번역을 향상시키는 조절 요소가 사용될 수 있다. 예를 들어, 우드척 간염 바이러스(WPRE)의 전사후 조절 요소(PRE)는 ORF의 3' 비번역 영역에 삽입될 때 발현 수준을 몇 배 향상시킬 수 있다(예를 들어, Zufferey *et al.* (1999) *J. Virol.* 73(4):2886-2892). 유사하게는, B형 간염 바이러스 PRE(HPRE)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 요소도 발현을 향상시킬 수 있다. 이의 조합은 단일 플라스미드에서 다중 단백질의 발현을 개선하기 위해 다중 ORF의 3' 말단에 사용될 수 있다.

[0753] PRE WPRE 및 HPRE는 핵으로부터 mRNA 내보내기를 촉진하여 세포질 mRNA의 축적을 증가시킬 수 있고, 전사후 가공 및 안정성을 향상시킬 수 있는 헤파드나바이러스 *cis*-작용 RNA 요소이다.

[0754] **b.폴리아데닐화 신호 서열 및 종결인자**

[0755] 단백질 발현을 향상시킬 수 있는 플라스미드의 다른 요소에는 폴리아데닐화 신호 서열 및 종결인자가 포함된다. 폴리아데닐화는 번역을 위해 성숙한 mRNA를 생성하는 과정의 일부인 mRNA 전사체의 3' 단부에 폴리(A) 테일을 전사후 첨가하는 것이다. 폴리아데닐화 신호 서열은 핵 외수송, mRNA 안정성 및 효율적인 번역에 중요하다. 종결인자는 전사체의 단부를 한정하여 자유 3' 단부를 만들고 전사 머시너리로부터 새로 합성된 mRNA의 방출을 개시하는 서열이다. 그러면 폴리(A) 테일을 첨가하기 위해 자유 3' 단부를 사용할 수 있다. 종결인자는 전사되는 유전자의 다운스트림에서 발견되며 일반적으로 폴리아데닐화 또는 폴리(A) 신호와 같은 3' 조절 요소 바로 뒤에 발생한다. 발현 플라스미드에서 일반적으로 사용되는 포유동물 종결인자는 시미안 바이러스 40(SV40), 인간 성장 호르몬(hGH), 소 성장 호르몬(BGH 또는 bGH) 및 토끼 베타-글로빈(rbGlob) polyA 서열을 포함하며, 이는 서열 모티프 AAUAAA(SEQ ID NO: 398)를 포함하고, 폴리아데닐화와 종결을 둘 다 촉진한다.

[0756] ORF의 3' 단부에 위치할 때, 시미안 바이러스 40 폴리 A(SV40pA) 또는 소 성장 호르몬 폴리 A(bGHpA) 신호와 같은 서열은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 발현을 몇-배 증가시킨다(예를 들어, Powell *et al.* (2015) *Discov. Med.* 19(102):49-57). 이러한 요소 및 다른 이러한 요소는 단일 플라스미드에서 발현되는 면역조절 단백질을 비롯한 여러 치료제의 발현 및 번역을 추가로 향상시킬 수 있다.

[0757] **c.인핸서**

[0758] 프로모터와 인핸서는 플라스미드에서 다중 복제 부위(MCS)의 업스트림에서 발견되며 전사 속도를 결정하기 위해 협력한다. 인핸서는 DNA를 루프하고 특정 프로모터를 개시 복합체에 가져오기 위해 활성화제 단백질에 결합하여 전사 속도를 증가시키는 서열이다. 이는 영향을 미치는 프로모터에 인접하거나 멀리 있을 수 있으며 CMV, EF-1α, SV40 및 합성 인핸서, 또는 MND 프로모터를 포함하며, 이는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서와 함께 변형된 MoMuLV(몰로니 뮤린 백혈병 바이러스) LTR의 U3 영역을 포함하는 합성 프로모터이다. 본원의 면역자극성 박테리아는 플라스미드 상에 인코딩된 치료 생성물/단백질의 발현을 증진시키기 위한 인핸서(들)를 포함할 수 있는 플라스미드를 함유한다.

[0759] **d.분비 신호**

[0760] 신호 서열 또는 펩타이드, 리더 서열 또는 펩타이드, 또는 국소화 신호 또는 서열로도 알려진 분비 신호는 분비

될 새로 합성된 단백질의 N-말단에 있는 짧은 펩타이드이다. 신호 펩타이드는 일반적으로 세포막으로 단백질을 전위하도록 세포를 촉진한다. 단백질 분비의 효율성은 신호 펩타이드에 의해 강하게 결정된다. 따라서, 본원의 면역자극성 박테리아는 인코딩된 치료제(들)의 발현 또는 분비를 촉진 및/또는 증가시키기 위해 신호 펩타이드/분비 신호 펩타이드를 포함할 수 있는 플라스미드를 함유한다.

[0761] **e.박테리아 적합도의 향상**

[0762] 치료 생성물을 인코딩하는 면역자극성 박테리아의 플라스미드에는 박테리아 유전자의 발현과 복잡한 다시스트론성 진핵생물 페이로드의 발현을 위해 제공되는 유전자 및 조절 요소가 포함된다. 이러한 진화적으로 분기된 유기체 사이의 전환은 원핵생물과 진핵생물에서 적절한 기능에 대한 문제를 야기한다. 박테리아는 시험관 내에서 배양된 다음, 페이로드가 발현, 처리 및 트래피킹되는 암 대상체의 세포, 특히 종양-체류 골수성 세포에 플라스미드가 전달되는 진핵 대상체에게 투여된다. 박테리아에서 CMV 프로모터와 같은 진핵 프로모터로부터의 전사 누출은 큰 진핵생물 유전자 및 조절 서열과 결합되어 낮은 주입 스톡 생존율로 나타나는 감소된 박테리아 적합성, 및 및 배양물 배양에서 감소된 성장률을 초래할 수 있다.

[0763] **4.복제 원점 및 플라스미드 복제수**

[0764] 플라스미드는 복제 원점을 통해 박테리아 내에서 유지되는 자율 복제, 염색체외, 원형 이중 가닥 DNA 분자이다. 복제수는 플라스미드 안정성에 영향을 미친다. 고-복제수는 일반적으로 세포 분열에서 무작위 분할이 발생할 때 플라스미드의 더 큰 안정성을 초래한다. 플라스미드의 고-복제수는 일반적으로 성장 속도를 감소시키며, 따라서 플라스미드가 거의 없는 박테리아 세포가 더 빨리 성장하기 때문에 배양을 지배할 수 있다. 이는 고-복제수로 존재할 때 박테리아에 유독할 수 있는 플라스미드 상의 특정 유전자의 발현을 제한하는 유전자 약독화 및 유전자 투여 전략을 사용하여 개선될 수 있다. 복제의 기원은 또한 플라스미드의 호환성, 즉 동일한 박테리아 세포 내에서 다른 플라스미드와 함께 복제하는 능력을 결정한다. 동일한 복제 시스템을 사용하는 플라스미드는 동일한 박테리아 세포에 공존할 수 없으며; 동일한 호환성 군에 속한다고 한다. 동일한 호환성 군의 제2 플라스미드 형태로 새로운 기원의 도입은 상주 플라스미드 복제 결과를 모방한다. 따라서 두 플라스미드가 올바른 복제전 복제수를 생성하기 위해 다른 세포로 분리될 때까지 추가 복제가 방지된다.

[0765] 다수의 박테리아 복제 원점이 당업자에게 알려져 있다. 원점을 선택하여 원하는 복제수를 얻을 수 있다. 복제 원점은 DNA-의존성 DNA 중합효소를 통한 플라스미드 복제의 개시 부위로 인식되는 서열을 포함한다(예를 들어, del Solar 등 (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2):434-464 참조) . 상이한 복제 원점은 각각의 세포 내에서 다양한 플라스미드 복제 수준을 제공하며 세포당 1개에서 수백 개의 복제 범위일 수 있다. 일반적으로 사용되는 박테리아 플라스미드 복제 원점에는, pUC와 같은 매우 높은 복사 유도체와 pBR322와 같은 낮은 복사 유도체, ColE1, p15A 및 pSC101을 갖는 pMB1 유래 원점, 및 낮은 복제수를 가진 다른 원점이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 이러한 원점은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, pUC19 기원은 세포당 500-700개 사본의 복제수를 생성한다. pBR322 기원은 세포당 15-20개 사본의 알려진 복제수를 갖고 있다. 이러한 기원은 단일 염기쌍에 의해서만 다르다. ColE1 원점 복제수는 15-20이고, pBluescript와 같은 유도체는 300-500 범위의 복제수를 갖고 있다. 예를 들어, 플라스미드 pACYC184에 있는 p15A 원점은 약 10개의 복제수를 생성한다. pSC101 원점은 약 5의 복제수를 부여한다. 복제 원점을 얻을 수 있는 다른 낮은 복제수 벡터는 예를 들어, pWSK29, pWKS30, pWSK129 및 pWKS130을 포함한다(예를 들어, Wang *et al.* (1991) 유전자 100:195-199 참조). 중 내지 저 복제수는 150 미만, 또는 100 미만이다. 저 복제수는 20, 25, 30 미만이다. 일반적으로 중 미만의 복제수는 150 미만의 복제수이며, 저 미만의 복제수는 약 25 미만 또는 25 미만의 복제수이고, 일반적으로 복제수는 조제물에서 박테리아당 플라스미드의 평균 복제수를 나타낸다. 당업자는 저, 중, 또는 고 복제수를 갖는 플라스미드를 식별할 수 있다. 예를 들어, 복제수가 높은지 낮은지 실험적으로 결정하는 한 가지 방법은 미니프렙을 수행하는 것이다. 고 복제수 플라스미드는 1 ml LB 배양당 3-5 μg DNA를 산출해야 하며; 저 복제수 플라스미드는 LB 배양 1 ml당 0.2-1 μg의 DNA를 산출할 것이다. 복제 원점의 식별 및 서열을 포함하는 박테리아 플라스미드의 서열은 잘 알려져 있다(예를 들어, snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/ 참조). 예시적인 복제 원점 및 이의 플라스미드 복제수는 하기 표에 요약되어 있다.

복제 원점	복제수	SEQ ID NO.
pMB1	다양함	254
p15A	10-12	255
pSC101	~5	256
pBR322	15-20	243
ColE1	15-20	257
pPS10	15-20	258
RK2	~5	259
R6K (알파 원점)	15-20	260
R6K (베타 원점)	15-20	261
R6K (감마 원점)	15-20	262
P1 (oriR)	낮음	263
R1	낮음	264
pWSK	낮음	265
ColE2	10-15	266
pUC (pMB1)	500-700	267
F1	300-500	268

[0766]

[0767] 높은 복제수 플라스미드는 시험관내 단백질의 이종성 발현을 위해 선택되는데, 그 이유는 유전자 투여량이 염색체 유전자와 비교하여 증가하고, 단백질의 더 높은 비수율(specific yield)이 있고, 치료 박테리아의 경우 인코딩된 치료제의 더 높은 치료 투여량이 있기 때문이다. 그러나, 본원에서는 *에스. 티피무리움*과 같은 치료 생성물(예를 들어, 면역조절 단백질)을 인코딩하는 플라스미드의 전달을 위해 일부 구현예에서 높은 복제수 플라스미드가 유리할 수 있음을 보여준다.

[0768] 박테리아가 높은 복제 플라스미드를 유지해야 하는 요구 사항은 발현된 분자가 유기체에 독성인 경우 문제가 될 수 있다. 이러한 플라스미드를 유지하기 위한 대사 요구 사항은 생체 내에서 복제 적합성을 희생해야 할 수 있다. 치료 생성물의 전달을 위한 최적의 플라스미드 복제수는 플라스미드를 전달하도록 조작된 균주의 약독화 기전에 따라 달라질 수 있다. 필요한 경우, 당업자는 본원의 개시내용을 고려하여 특정 면역자극 종 및 박테리아 균주에 대한 적절한 복제수를 선택할 수 있다.

[0769] 인코딩된 생성물이 박테리아에서 발현되는 백신으로서 사용하기 위해 그리고/또는 RNA(예컨대 mRNA)를 전달하기 위해, 플라스미드는 더 높은 복제수 또는 높은 복제수(150 초과)로 존재하여, 생산되는 RNA 또는 mRNA의 양을 증가시킬 수 있다.

[0770] **5.CpG 모티프 및 CpG 섬**

[0771] 비메틸화된 시티딘-포스페이트-구아노신(CpG) 모티프는 박테리아에서 널리 퍼져 있지만 척추동물의 게놈 DNA에서는 그렇지 않다. 병원성 DNA 및 CpG 모티프를 포함하는 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)는 숙주 방어 기전을 활성화하여 내재성 및 후천적 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 비메틸화된 CpG 모티프는 중앙에 비메틸화된 CG 디뉴클레오타이드와 플랭킹 영역을 포함한다. 인간의 경우 구조의 차이와 이것이 유도하는 면역 반응의 특성에 따라 4가지 유형의 CpG ODN이 식별되었다. K형 ODN(B형이라고도 함)은 일반적으로 포스포로티오에이트 백본에 1개 내지 5개의 CpG 모티프를 포함한다. D형 ODN(A형이라고도 함)은 포스포디에스테르/포스포로티오에이트 백본이 혼합되어 있고 단일 CpG 모티프가 있으며, 스템 루프 구조의 형성을 허용하는 회문 서열과 3'과 5' 단부에서 polyG 모티프에 의해 플랭킹된다. C형 ODN은 포스포로티오에이트 백본을 가지고 있으며 스템 루프 구조 또는 이량체를 형성할 수 있는 다중 회문 CpG 모티프를 포함한다. P-부류 CpG ODN은 포스포로티오에이트 백본을 가지고 있으며, GC가 풍부한 3' 단부에서 헤어핀을 형성할 수 있는 이중 회문을 가진 다중 CpG 모티프를 포함한다(예를 들어, Scheiermann 등 (2014) 백신 32(48):6377-6389). 본원의 목적을 위해, CpG는 플라스미드 DNA에 인코딩되고; 이는 모티프로서 또는 유전자에 도입될 수 있다.

[0772] 톨-유사 수용체(TLR)는 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)을 감지하고 병원체에 대한 내재성 면역을 활성화하기 위한 핵심 수용체이다(예를 들어, Akira *et al.* (2001) *Nat. Immunol.* 2(8):675-680). TLR9는 포유동물 DNA에서 자연적으로 발생하지 않는 원핵생물의 DNA에서 저메틸화된 CpG 모티프를 인식한다(예를 들어, McKelvey 등 (2011) J. Autoimmun. 36:76-86 참조). CpG 모티프의 인식은 면역 세포 하위집합의 엔도솜으로 병원체의 식균 작용 시 내재성 및 적응성 면역을 활성화한다.

[0773] CpG 섬 또는 모티프를 함유하는 플라스미드를 보유하는 *에스. 티피무리움* 균주와 같은 *살모넬라* 종과 같은 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 이 박테리아는 TLR9를 활성화할 수 있다. 본원에 예시된 바와 같이, 저메틸화된 CpG 섬을 함유하는 박테리아 플라스미드는 내재성 및 적응성 항종양 면역 반응을 둘 다 유도할 수 있으며, 이는 플라스미드 상에서 인코딩되는 치료 생성물, 예컨대 면역자극성 단백질 및 STING의 항시적 활성 변이체, IRF3 및 다른 세포질 DNA/RNA 센서와 조합되어, 상승작용적 또는 증강된 항종양 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, asd 유전자(예를 들어 SEQ ID NO: 48 참조)는 저메틸화된 CpG 섬의 높은 빈도를 인코딩한다. CpG 모티프는 면역자극성 박테리아에 본원의 설명으로부터 기재되거나 명백한 임의의 치료 생성물과 조합하여 포함될 수 있으며, 이로써 치료 대상체에서 항종양 면역 반응을 향상시키거나 개선할 수 있다.

[0774] 면역자극성 CpG는 유전자 생성물을 인코딩하는, 전형적으로 박테리아 유전자로부터의 핵산을 포함하고, 또한 CpG 모티프를 인코딩하는 핵산을 첨가함으로써 플라스미드에 포함될 수 있다. 본원의 플라스미드는 CpG 모티프를 포함할 수 있다. 예시적인 CpG 모티프가 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 8,232,259, 8,426,375 및 8,241,844 참조). 여기에는 일반식: $(CpG)_n$과 함께 예를 들어 10 내지 100개, 10 내지 20개, 10 내지 30개, 10 내지 40개, 10 내지 50개, 또는 10 내지 75개 염기쌍 길이인 합성 면역자극 올리고뉴클레오타이드가 포함되며, 여기서 n은 반복부의 수이다. 일반적으로 적어도 하나 또는 두 개의 반복부가 사용되며; 비-CG 염기가 산재될 수 있다. 당업자는 TLR, 특히 TLR9를 조절함으로써 면역 반응을 유도하기 위한 CpG 모티프의 일반적인 용도에 매우 익숙하다.

[0775] **6.플라스미드 유지/선택 구성요소**

[0776] 실험실 환경에서 플라스미드의 유지는 일반적으로 플라스미드에 항생제 내성 유전자를 포함하고 성장 배지에 항생제를 사용함으로써 보장된다. 상술한 바와 같이, 플라스미드 상의 기능성 asd 유전자로 보완된 asd 결실 돌연변이체의 사용은 항생제를 사용하지 않고 시험관내 플라스미드 선택을 가능하게 하고, 생체내 플라스미드 유지를 가능하게 한다. asd 유전자 보체 시스템은 이러한 선택/유지를 제공한다(예를 들어, Galan 등 (1990) Gene 94(1):29-35 참조). 종양 미세환경에서 플라스미드를 유지하기 위한 asd 유전자 보체 시스템의 사용은 면역자극성 단백질, 항시적으로 활성인 세포질 DNA/RNA 센서, 항체, 항체 단편, 또는 본원에서 논의된 바와 같은 다른 이러한 생성물와 같은 치료 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 전달하도록 설계된 *에스. 티피무리움* 및 다른 면역자극성 박테리아 균주의 약효를 증가시킨다.

[0777] **7.DNA 핵 표적화 서열**

[0778] SV40 DTS와 같은 DNA 핵 표적화 서열(DTS)은 핵공 복합체를 통한 DNA 서열의 전위를 매개한다. 이 수송의 기전은 핵 국소화 서열을 포함하는 DNA 결합 단백질의 결합에 의존하는 것으로 보고된다. 핵 수송 및 발현을 증가시키기 위해 플라스미드에 DTS를 포함시키는 것이 입증되었으며(예를 들어, Dean, D.A. 등 (1999) Exp. Cell Res. 253(2):713-722 참조), *에스. 티피무리움*에 의해 전달된 플라스미드로부터 유전자 발현을 증가시키기 위해 사용되었다(예를 들어, Kong 등 (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109(47):19414-19419 참조).

[0779] 이. 콜라이의 *rrnB* 유전자의 T1 종결인자와 같은 Rho-독립적 또는 부류 I 전사 종결인자는 전사 신장 복합체의 해리를 유발하는 2차 구조를 형성하는 DNA 서열을 포함한다. 전사 종결인자는 *에스. 티피무리움* 전사 머시너리에 의한 이종성 단백질의 발현을 방지하기 위해 플라스미드에 포함된다. 이는 치료 생성물의 발현이 숙주 세포 전사 머시너리에 국한되도록 한다.

[0780] *에스. 티피무리움*과 같은 살모넬라의 형질전환에 사용되는 플라스미드는 본원에 기재된 암 치료제로서 다음 속성의 전부 또는 일부를 포함한다: 1) 단백질의 이종성 발현을 위한 하나 이상의 항시적 프로모터; 2) 하나 이상의 인간 면역조절 발현 카세트; 3) 박테리아 복제 원점 및 최적화된 플라스미드 복제수; 4) 면역자극성 CpG 섬; 5) 플라스미드 유지 및 선택을 위한 asd 유전자 선택가능 마커; 6) DNA 핵 표적화 서열; 및 7) 전사 종결인자.

[0781] **G.백신 및 치료제로서 사용하기 위한 예시적인 박테리아 균주 및 작용 기전**

[0782] 전반에 걸쳐 기재된 바와 같이, 항암 치료제로서, 병원체에 대한 백신으로서, 그리고 RNA에 대한 전달 비히클로서 사용하기 위한 특성을 향상시키는 게놈 변형을 함유하는 면역자극성 박테리아가 제공되며, 이는 치료 생성물로서 사용될 수 있거나 다양한 용도를 위한 면역자극성 생성물, 항원, 및 이의 조합을 제공하도록 변역될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 항암 치료제로서 사용하기 위한, 백신 및 RNA 전달 플랫폼을 위해 특성을 향상시키고 또한 박테리아의 염증 특성을 감소시키고, 이러한 적용을 위해 박테리아의 특성으로 증강을 시키거나 작용하는 페이로드 생성물의 조합을 포함하는 페이로드를 포함하는 전반적으로 논의된 게놈 변형을 포함한다. 페이로드 및 게놈 변형은 본원의 개시내용 전반에 걸쳐 논의되고 기재되며, 아래 작업예에서 예시된다. 하기는 특히

백신으로서의 사용에 유리한 예시적인 박테리아, 게놈 변형과 페이로드의 조합의 논의이다. 전반에 걸친 개시내용은 암 및 다른 질환과 병태를 치료하는 데 사용하기 위한 적절한 면역 자극 또는 조절에 일반적으로 유용한 치료제로서 그리고 암 치료제로서 사용하기 위한 특성, 페이로드, 및 변형을 기재한다.

[0783] 당업자는 유사한 효과 및 결과를 달성하기 위해 다른 박테리아 종 및 균주, 예컨대 이. 콜라이, 및 리스테리아에서 유사한 게놈 변형을 수행할 수 있는 것으로 이해된다. 추가로, 상기 논의된 바와 같이 비(非)살모넬라 종은 *rck* 유전자, 예컨대 살모넬라로부터의 *rck* 유전자를 인코딩하도록 변형되어, 보체에 대한 내성을 증가시킬 수 있다.

[0784] 백신화를 위해, 본원에 제공된 박테리아에 대한 용도 및 일반적인 작용 기전은 항원 또는 생성물에 대한 현장에서 면역 반응을 생성하기 위해 예컨대 근육내 주사, 흡입, 피부내 투여, 질 투여, 및 다른 이러한 경로에 의한 투여, 특히 직접적인 조직 투여를 포함하며, 이는 병원체 또는 암에 대한 예방(면역보호 반응을 발달시키기 위한 면역화) 또는 치료를 위한 것일 수 있다. 박테리아는 지속적인 적응 항바이러스 면역을 유도한다. 박테리아는 선택된 경로를 위해 적합하게 제형화된다. 이는 적절하다면 예를 들어 에어로졸, 정제, 에멀젼, 분말로서의 제형을 포함할 수 있다. 이렇게 해서 제형화된 투여된 박테리아는 포식작용에 의해 조직-체류 식세포 내로 흡수된다. 이러한 목적을 위해, 박테리아는 이것이 생체내에서 복제되지 않지만 이의 페이로드를 세포, 예컨대 조직-체류 포식성 항원-제시 세포(APC) 내로 전달하도록 변형된다. 인코딩된 생성물은 예를 들어 유형 I IFN을 유도하기 위해 제시를 위한 항원, STING을 포함한다. 인코딩된 생성물은 림프절 내로 들어가서 CD4+ 및 CD8+ 프라이밍을 통해 항체를 초래할 수 있고, APC는 IFN-감마를 자극시키는 항원-특이적 CD8+ 세포의 프라이밍 및 활성화를 위해 제시되고, 또한 바이러스에 의해 감염된 세포의 직접적인 사멸화에 참여한다; 대식세포는 세포자멸사 감염 세포를 식세포작용하여, 에피토프를 확산시키고, 이는 추가의 T-세포 활성화를 초래한다.

[0785] **1.예시적인 면역자극성 박테리아 – 현장에서 암 백신화 작용 기전(MOA)**

[0786] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 중에는 종양-체류 골수성 세포, 예컨대 대식세포에 축적되도록 설계된 면역자극성 박테리아가 있다. 이러한 박테리아는 항바이러스/항종양 면역 반응을 유도하는 면역자극성 단백질 및 이의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다. 게놈 변형은 편모의 무효화, LPS의 변경, 및 컬리 핌브리애의 무효화를 포함한다. 유사한 효과를 갖는 박테리아 균주에서 이러한 또는 변형은 TLR2/4/5 반응/신호전달을 감소시키고, 종양 미세환경 및 골수성 세포에서 축적을 초래한다. 다른 변형은 영양 요구체, 예컨대 박테리아가 생체내에서 성장할 수 없게 만드는 *asd*$^-$ 또는 *ThyA*$^-$; 및 다른 영양 요구체, 예컨대 면역억제성인 상승된 아데노신을 가질 수 있는, 박테리아를 아데노신에 대해 영양 요구성으로 만들고 종양 미세환경에서 이의 축적을 증가시키는 *purI*$^-$; 및 T 세포를 저해할 수 있는 아스파라기나제를 무효화시키거나 비활성화시키는 게놈 변형을 포함한다. 이러한 박테리아 변형 중 일부 또는 모두의 조합은 종양 미세환경 및 종양 내의 대식세포에 축적되는 박테리아를 초래한다. 이러한 면역자극성 박테리아의 예는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI* 균주로 표기된 균주이다. 균주는 예를 들어, 현장에서 암 항원 백신화를 위해 사용될 수 있으며, 여기서 균주는 진핵 프로모터, 예컨대 CMV 프로모터의 제어 하에 발현되는 페이로드의 조합을 생산하는 STING, eSTING(조작된 STING, 예컨대 본원에 제공된 것, 특히 유형 I 인터페론을 항시적 유도하는 것을 지칭함), IL-15(또는 IL-15 수용체 복합체) + eSTING, 및 다른 유형 I IFN을 발현하는 플라스미드를 함유한다. 플라스미드는 추가로 전장 종양 항원 또는 펩타이드 항원 단편의 개방 리딩 프레임을 인코딩하는 서열을 함유한다. 투여 경로는 IV이며, 이로써 균주는 종양으로 트래픽(traffic)되고 종양-체류 대식세포에 의해 흡수되어, 핵으로의 플라스미드 이동 및 페이로드의 발현을 초래한다. 유형 I IFN의 부재 하에, 대식세포는 종양 내에서 $CD8^+$ T-세포 프라이밍, 뿐만 아니라 림프절로의 트래피킹(trafficking)을 위한 암 항원을 처리하고 제시하여, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포를 프라이밍한다. 프라이밍되고 활성화된 $CD8^+$ T-세포는 프라이밍된 항원을 보유하는 종양 세포를 무효화시키며, 장기 수명의 조직-체류 기억 CD8+ T-세포, 뿐만 아니라 종양이 제거된 후 순환형 기억 T-세포를 유도하여, 종양 재발을 예방한다.

[0787] **2. 말초 암 백신화를 위한 예시적인 면역자극성 박테리아 및 작용 기전**

[0788] 추가의 티미딘 영양 요구체를 함유하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*/△*thyA* 균주는 말초 암 항원 백신화에 사용된다. 균주는 티미딘 보충의 부재 하에 증식할 수 없고, 사지 내로의 근육내 주사에 의해 투여 시 이는 예컨대 팔에서 IM 주사 후 조직-체류 대식세포에 의해 포식된다. 균주는 박테리아 프로모터 및 IRES 서열 또는 진핵 프로모터로부터 STING, eSTING, IL-15 + eSTING, 또는 다른 유형 I IFN 생산 조합, 뿐만 아니라 전장 종양 항원 또는 펩타이드의 서열을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다. 균주를 함유하는 박테리아

프로모터의 경우, 박테리아는 이러한 인코딩된 페이로드의 RNA를 전사하고 조직-체류 대식세포에 의한 포식작용 및 파괴 시 이러한 전달할 것이다. 진핵 프로모터 함유 균주의 경우, 식세포는 RNA를 전사한다. 생성된 mRNA는 단백질로 번역되고, 인코딩된 항원은 $CD8^+$ T-세포 프라이밍을 위해 유형 I IFN의 존재 하에 대식세포에 의해 제시된다. 암 항원-프라이밍된 $CD8^+$ T-세포는 암 세포, 예컨대 수술적 종양 절제 후 남아 있는 것을 순환시키고 무효화시킨다. 이와 같은 균주는 특정 암을 발증시킬 위험을 감소시키기 위해, 예컨대 종양 형성을 유발할 수 있을 가족력 유전자 돌연변이에 대한 백신화를 위해 예방적 백신으로서 사용된다.

[0789] **3.병원체 백신화를 위한 예시적인 면역자극성 박테리아 및 작용 기전(MOA)**

[0790] 또한, 추가의 영양 요구체, 예컨대 $thyA^-$ 균주를 포함하는 박테리아 균주가 제공된다. 이의 예는 YS1646△asd/△FLG/△pagP/△ansB/△csgD/F-△purI/△thyA 균주를 포함하며, 이는 추가의 티미딘 영양 요구체를 갖는다. 이러한 균주는 티미딘 보충의 부재 하에 증식할 수 없다. 이러한 균주는 병원체에 대한 백신화에 사용될 수 있다. 이는 특정 병원체에 의한 감염이 자연적으로 발생하는 경로에 의해 투여된다. 예컨대, 감염이 자연적으로 발생하는 부위 또는 부위들에 따라 근육내, 비내, 흡입 또는 경구 전달 또는 이의 조합에 의한 투여 후, 이는 조직-체류 대식세포로부터 제거되어, 플라스미드를 남긴다. 이러한 균주는 박테리아 프로모터의 전사적 제어 하에 면역자극성 단백질 또는 이의 조합, 예컨대 STING, 조작된 STING (eSTING), IL-15 + eSTING, 또는 다른 유형 I IFN 생성 단백질 또는 단백질의 조합, 및 또한 항원 및/또는 펩타이드의 병원체 서열을 인코딩하지만 진핵 리보솜에 의한 번역을 위해 진핵 서열, 예컨대 IRES를 포함하는 플라스미드를 함유한다. 박테리아는 이러한 페이로드를 인코딩하는 RNA를 생산하고, 투여 후, 포식작용 및 조직-체류 대식세포에 의한 파괴 시, 인코딩된 mRNA를 전달한다. mRNA는 진핵 숙주 세포에 의해 단백질로 번역되고, 항원은 $CD8^+$ T-세포 프라이밍을 위해 유형 I IFN의 존재 하에 대식세포에 의해 제시된다. 유형 I IFN은 인코딩된 면역자극성 단백질, 예컨대 STING 또는 변형된 STING에 의해 자극될 수 있다. 추가로, 박테리아는 박테리아 프로모터 및 박테리아 전사와 번역을 위한 서열과 함께 플라스미드를 사용하여 유형 I IFN 및 병원체 항원을 단백질로서 제공할 수 있다. 그 후에, 대식세포는 조직에서 $CD8^+$ T-세포를 프라이밍할 뿐만 아니라 림프절로 트래픽하여 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포를 프라이밍한다. 그 후에, 프라이밍되고 활성화된 $CD8^+$ T-세포는 패트롤링(patrolling) 기억 T-세포로서 순환할 뿐만 아니라 기원 조직으로 다시 트래픽하여 조직-체류 기억 $CD8^+$ T-세포로서 남게 된다. 프라이밍된 $CD4^+$ T-세포는 B-세포 활성화를 유도하여 높은 역가의 지속적인 중화 항체를 생산한다. 이러한 백신화 전략은 질환이 자연적으로 발생할 조직에 투여되는 고도로 성공적인 천연두, 소아마비, 홍역, 수두, 및 다른 생(live)-약독화된 백신을 모방한다.

[0791] **H. 약학적 생성, 조성물, 및 제형**

[0792] 본원에서는 본원에 제공된 임의의 면역자극성 박테리아 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 첨가제를 함유하는 제조 방법, 약학적 조성물 및 제형을 제공한다. 약학적 조성물은 종양 또는 암과 같은 과증식성 질환 또는 병태와 같은 질환의 치료에 사용될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 단일 제제 요법으로 투여될 수 있거나, 추가 제제(들) 또는 치료(들)와의 병용 요법으로 투여될 수 있다. 병용 요법은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 및/또는 다른 전달 비히클, 면역요법, 예컨대 CAR-T 요법 및 체크포인트 저해제, 방사선, 수술, 화학요법제, 예컨대 뉴클레오사이드 유사체 및 백금 화합물, 및 세포 요법을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 다른 항암 요법 또는 치료와의 병용 요법을 포함한다. 조성물은 단일 투여량 투여, 또는 다중 투여량 투여를 위해 제형화될 수 있다. 제제는 직접 투여용으로 제형화될 수 있다. 조성물은 액체 또는 건조 제형으로 제공될 수 있다.

[0793] **1.제조**

[0794] **a.세포 은행 제조**

[0795] 본원에 기재된 면역치료제의 활성 성분은 조작된 자가-복제 박테리아로 구성되기 때문에, 선택된 조성물은 장기간 보관을 위해 유지될 일련의 세포 은행으로 확장될 것이며 약물 성분 제조를 위한 출발 물질로 사용될 것이다. 세포 은행은 연방 규정(CFR) 21 파트 211 또는 다른 관련 규제 기관에 따라 적절한 제조 시설에서 현행 우수 제조 관행(cGMP)에 따라 생산된다. 면역치료제의 활성제는 살아있는 박테리아이기 때문에 여기에 기재된 생성물은 정의상 비멸균이며 최종적으로 멸균될 수 없다. 오염을 방지하기 위해 제조 공정 전반에 걸쳐 무균 절차가 사용되도록 주의를 기울여야 한다. 따라서 모든 원료 및 용액은 제조 공정에 사용하기 전에 멸균해야 한다.

[0796] 마스터 세포 은행(MCB)은 출발 물질에 오염 물질이 존재하지 않도록 선택된 박테리아 균주의 순차적인 단일 콜

로니 분리에 의해 생성된다. 멸균 배지(복합 배지, 예를 들어 LB 또는 MSB 또는 정의된 배지, 예를 들어 적절한 영양소가 보충된 M9일 수 있음)를 포함하는 멸균 배양 용기에 잘 단리된 단일 박테리아 콜로니를 접종하고 37℃에서 진탕하면서 인큐베이션하여 박테리아를 복제할 수 있다. 그 다음, 박테리아는 동결보호제(들)를 함유하는 용액에 현탁함으로써 동결보존을 위해 준비된다.

[0797] 동결 보호제의 예는 인간 또는 소 혈청 알부민, 젤라틴 및 면역글로불린과 같은 단백질; 단당류(예를 들어, 갈락토스, D-만노스, 소르보스 등) 및 이의 비환원성 유도체(예를 들어, 메틸글루코사이드), 이당류(트레할로스, 수크로스 등), 사이클로덱스트린 및 다당류(예를 들어, 라피노스, 말토덱스트린, 덱스트란 등)를 포함한 탄수화물; 아미노산(예를 들어, 글루타메이트, 글리신, 알라닌, 아르기닌 또는 히스티딘, 트립토판, 티로신, 류신, 페닐알라닌 등); 베타인과 같은 메틸아민; 3가 이상의 당 알코올, 예를 들어 글리세린, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨과 같은 폴리올; 프로파일렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; 계면활성제, 예를 들어 Pluronic®; 또는 디메틸 설폭사이드(DMSO)와 같은 유기-황 화합물, 및 이의 조합을 포함한다. 동결보존 용액은 염(예를 들어, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산마그네슘) 및/또는 완충제, 예를 들어 인산나트륨, 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(TRIS), 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산(HEPES), 및 당업자에게 알려진 다른 완충제를 또한 함유하는 하나 이상의 동결보존제를 포함할 수 있다.

[0798] 동결보존 용액에서 박테리아의 현탁액은 농축된 동결보호제 또는 동결보호제들을 배양 물질에 첨가하여 동결 및 해동 과정 동안 박테리아의 생존력을 보존하는 최종 농도를 달성함으로써(예를 들어, 최종 0.5% 내지 20% 글리세롤 농도), 또는 박테리아를 수합하고(예를 들어, 원심분리에 의해) 적절한 최종 농도의 동결 보호제(들)를 함유하는 동결 보존 용액에 현탁함으로써 달성될 수 있다. 그 후에, 동결보존 용액에 있는 박테리아 현탁액을 동결 조건(예를 들어, 부틸 마개 및 크림프 씰)에서 밀폐 무결성을 유지할 수 있는 용기 밀폐 시스템이 있는 적절한 멸균 바이알(플라스틱 또는 유리)에 충전한다. 그 후에, 마스터 세포 은행의 바이알을 냉동한다(속도 조절 냉동기를 사용하여 천천히 또는 냉동기에 직접 넣어 빠르게). 그 후에, MCB는 장기 생존 가능성을 보존하는 온도(예를 들어, -60℃ 이하)에서 냉동 보관된다. 해동된 마스터 세포 은행 물질은 해당 당국의 규정에 따라 식별성, 순도 및 활성을 보장하기 위해 철저히 특성화된다.

[0799] 작업 세포 은행(WCB)은 마스터 세포 은행과 거의 동일한 방식으로 생산되지만 출발 물질은 MCB에서 유래된다. MCB 물질은 멸균 배지가 들어 있는 발효 용기로 직접 옮기고 위와 같이 확장할 수 있다. 그 후에, 박테리아를 동결보존 용액에 현탁시키고 용기에 채우고 밀봉한 다음 -20℃ 이하에서 동결한다. MCB 재료로 여러 WCB를 생산할 수 있으며 WCB 재료를 사용하여 추가 세포 은행(예를 들어, 제조업체의 작업 세포 은행(MWCB))을 만들 수 있다. WCB는 냉동 보관되며 식별성, 순도 및 활성을 보장하는 특성이 있다. WCB 물질은 일반적으로 조작된 박테리아와 같은 생물학적 제제의 약물 성분 생산에 사용되는 출발 물질이다.

[0800] **b.약물 성분 제조**

[0801] 약물 성분은 상기 기재된 대로 cGMP에 따라 무균 공정을 사용하여 제조된다. 작업 세포 은행 물질은 일반적으로 cGMP에 따라 약물 성분 제조를 위한 출발 물질로 사용되지만 다른 세포 은행도 사용할 수 있다(예를 들어, MCB 또는 MWCB). 무균 처리는 박테리아 세포-기초 요법을 포함한 모든 세포 요법의 생산에 사용된다. 세포 은행의 박테리아는 발효에 의해 확장되며; 이는 예비-배양물(예를 들어, 진탕 플라스크)을 생성하거나 발효기의 직접 접종을 통해 달성할 수 있다. 발효는 일회용 또는 재사용이 가능한 멸균 생물반응기 또는 플라스크에서 수행된다. 박테리아는 농축에 의해 수합된다(예를 들어, 원심분리, 연속 원심분리 또는 접선 흐름 여과). 농축된 박테리아는 완충제로 배지를 교환하여(예를 들어, 정용여과에 의해) 배지 구성요소 및 박테리아 대사산물로부터 정제된다. 벌크 약물 성분은 중간체(예를 들어, 냉동 또는 건조)로 제형화 및 보존되거나 약물 생성물로 직접 가공된다. 약물 성분은 식별성, 강도, 순도, 약효 및 품질에 대해 시험된다.

[0802] **c.약물 생성물 제조**

[0803] 약물 생성물은 최종 용기에 들어 있는 활성 성분의 최종 제형으로 정의된다. 약물 생성물은 cGMP에 따라 무균 공정을 사용하여 제조된다. 약물 생성물은 약물 성분에서 생산된다. 약물 성분을 해동하거나 필요한 경우 재구성한 다음 적절한 목표 농도로 제형화한다. 약물 생성물의 활성 성분은 살아있는 조작된 박테리아이기 때문에, 강도는 현탁액에 포함된 콜로니 형성 단위(CFU)의 수에 의해 결정된다. 벌크 생성물은 아래에 설명된 대로 보관 및 사용에 적합한 최종 제형으로 희석된다. 용기는 용기 마개 시스템으로 채워지고 밀봉되며 약물 성분에 라벨이 붙여진다. 약물 생성물은 안정성을 유지하기 위해 적절한 온도에서 보관되고, 식별성, 강도, 순도, 역가 및 품질에 대해 시험되고 표기된 허용 기준을 충족하는 경우 인체 사용을 위해 출시된다.

[0804] **2.조성물**

[0805] 약학적으로 허용 가능한 조성물은 규제 기관 또는 다른 기관에 대한 승인을 고려하여 제조되고/되거나 동물 및 인간에서 사용하기 위해 일반적으로 인정되는 약전에 따라 제조된다. 조성물은 용액, 현탁액, 분말 또는 지속 방출 제형으로 제조될 수 있다. 전형적으로, 화합물은 당업계에 널리 알려진 기술 및 절차를 사용하여 약학적 조성물로 제형화된다(예를 들어, Ansel, *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, Fourth Edition, 1985, page 126 참조). 제형은 투여 방식에 적합해야 한다.

[0806] 조성물은 근육내, 정맥내, 피부내, 병변내, 복강내, 피하, 종양내, 경막외, 비강, 경구, 질, 직장, 국소(topical), 국재(local), 귀, 흡입, 협측(예를 들어, 설하) 및 경피 투여를 비롯한 당업자에게 알려진 임의의 경로에 의한, 또는 임의의 적합한 경로에 의한 투여를 위해 제형화될 수 있다. 다른 투여 모드도 고려된다. 투여는 치료 부위에 따라 국소적, 국소적 또는 전신적일 수 있다. 치료가 필요한 부위로의 국소 투여는 예를 들어 수술 중 국소 주입, 국소 적용, 예를 들어 수술 후 상처 드레싱과 함께, 주사, 카테터에 의한 주사, 좌제를 사용하거나 임플란트를 사용한다. 조성물은 또한 순차적으로, 간헐적으로 또는 동일한 조성물로 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 또한 펌프에 의한 것과 같은 제어 방출 제형 및 장치 제어 방출을 포함하는 제어 방출 시스템을 포함할 수 있다.

[0807] 주어진 경우에 가장 적합한 경로는 질환의 특성, 질환의 진행, 질환의 중증도 및 사용되는 특정 구성과 같은 다양한 요인에 따라 다르다. 약학적 조성물은 각각의 투여 경로에 적합한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 조성물은 전신, 국소, 복강내, 경구 또는 직접 투여를 위한 임의의 적합한 약학적 조제물로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 피하, 근육내, 종양내, 정맥내 또는 피부내 투여를 위해 제형화될 수 있다. 투여 방법은 항원 및 면역원성 반응을 통한 면역학적 개입과 같은 분해 과정에 대한 활성제의 노출을 줄이기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법의 예로는 치료 부위의 국소 투여 또는 연속 주입이 있다.

[0808] 면역자극성 박테리아는 경피 패치 제제 및 건조 분말 흡입기뿐만 아니라 경구 투여를 위한 용액, 현탁액, 정제, 분산성 정제, 환제, 캡슐, 분말, 지속 방출 제형 또는 엘릭서와 같은 적합한 약학적 조제물로 제형화될 수 있다. 전형적으로, 화합물은 당업계에 널리 알려진 기술 및 절차를 사용하여 약학적 조성물로 제형화된다(예를 들어, Ansel, *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, Fourth Edition, 1985, page 126 참조). 일반적으로 제형 방식은 투여 경로의 함수이다. 조성물은 건조(동결건조 또는 다른 형태의 유리화) 또는 액체 형태로 제형화될 수 있다. 조성물이 건조된 형태로 제공되는 경우, 적절한 완충액, 예를 들어 멸균 식염수를 첨가하여 사용 직전에 재구성할 수 있다.

[0809] **3.제형**

[0810] **a.액체, 주사제, 에멀젼**

[0811] 제형은 일반적으로 투여 경로에 맞게 만들어진다. 일반적으로 피하, 근육내, 종양내, 정맥내 또는 피부내 주사 또는 주입을 특징으로 하는 비경구 투여가 본원에서 고려된다. 비경구 투여용 박테리아 제제에는 주사용 현탁액(직접 투여), 사용 전에 해동된 냉동 현탁액, 사용 직전에 재현탁 용액과 조합할 준비가 된 동결 건조 분말과 같은 건조 가용성 생성물 및 에멀젼이 포함된다. 동결건조 제형과 같은 건조된 열안정성 제형은 나중에 사용하기 위해 단위 용량을 저장하는 데 사용할 수 있다.

[0812] 약학적 조제물은 동결된 액체 형태, 예를 들어 현탁액일 수 있다. 냉동 액체 형태로 제공되는 경우 약물 생성물은 농축 조제물로 제공되어 사용 전에 해동되고 치료적 유효 농도로 희석될 수 있다.

[0813] 약학적 조제물은 또한 사용을 위해 해동 또는 희석을 필요로 하지 않는 투여 형태로 제공될 수 있다. 이러한 액체 조제물은 현탁제(예를 들어, 소르비톨, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방)와 같은 적절한 경우 약학적으로 허용 가능한 첨가제; 유화제(예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예를 들어, 아몬드 오일, 유성 에스테르 또는 분별 식물성 오일); 및 미생물 치료제와 함께 사용하기에 적합한 방부제와 함께 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 약학적 조제물은 사용 전에 물 또는 다른 멸균 적합한 비히클로 재구성하기 위해 동결건조 또는 분무 건조와 같은 건조 형태로 제공될 수 있다.

[0814] 적합한 부형제는 예를 들어 물, 식염수, 덱스트로스 또는 글리세롤이다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다. 정맥내 투여되는 경우, 적절한 담체에는 생리식염수 또는 인산완충 식염수(PBS) 및 정맥내 수화에 사용되는 다른 완충 용액이 포함된다. 종양내 투여의 경우, 글루코스, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로파일렌 글리콜, 오일 에멀젼 및 이의 혼합물과 같은 증점제를 함유하는 용액이 주사제의 국소화를 유지하는 데 적절할 수 있다.

[0815] 약학적 조성물은 담체 또는 다른 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 약학적 조성물은 희석제(들), 보조제(들), 부착방지제(들), 결합제(들), 코팅(들), 충전제(들), 풍미제(들), 착색제(들), 윤활제(들), 활택제(들), 보존제(들), 세제(들) 또는 흡착제(들), 및 이의 조합, 또는 변형된 치료 박테리아가 투여되는 비히클 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 예를 들어, 비경구 조제물에 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 수성 비히클, 비수성 비히클, 등장화제, 완충제, 항산화제, 국소 마취제, 현탁제 및 분산제, 유화제, 격리 또는 킬레이트제, 및 다른 약학적으로 허용 가능한 물질을 포함한다. 액체 조제물을 비롯한 제형은 약학적으로 허용 가능한 첨가제 또는 부형제를 사용하여 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다.

[0816] 약학적 조성물은 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클과 같은 담체를 포함할 수 있다. 적합한 약학적 담체의 예는 E. W. Martin의"Remington's Pharmaceutical Sciences"에 설명되어 있다. 이러한 조성물은 환자에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해 적절한 양의 담체와 함께 일반적으로 정제된 형태 또는 부분적으로 정제된 형태의 치료적 유효량의 화합물 또는 작용제를 함유할 것이다. 이러한 약학적 담체는 물과 같은 멸균 액체 및 석유, 동물성, 식물성 오일을 포함하는 오일, 또는 땅콩 오일, 대두 오일, 광유 및 참기름과 같은 합성 기원일 수 있다. 물은 전형적인 운반체이다. 식염수, 덱스트로스 및 글리세롤 수용액도 특히 주사용액의 경우 액체 담체로 사용할 수 있다. 조성물은 활성 성분과 함께, 락토스, 수크로스, 디칼슘 포스페이트 또는 카르복시메틸셀룰로스와 같은 희석제; 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 탈크 등의 윤활제; 및 전분, 아카시아 검과 같은 천연 검, 젤라틴, 글루코스, 당밀, 폴리비닐피롤리딘, 셀룰로스 및 이의 유도체, 포비돈, 크로스포비돈, 및 당업자에게 알려진 다른 이러한 결합제과 같은 결합제를 포함한다. 적합한 약학적 부형제는 전분, 포도당, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 소듐 클로라이드, 탈지분유 건조, 글리세롤, 프로파일렌, 글리콜, 물 및 에탄올을 포함한다. 예를 들어, 적합한 부형제는 예를 들어 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 원하는 경우, 조성물은 또한 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정제, 용해도 향상제, 및 예를 들어 소듐 아세테이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 및 사이클로덱스트린과 같은 다른 제제와 같은 다른 소량의 무독성 보조 물질을 함유할 수 있다.

[0817] 비경구 제제에 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체에는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장제, 완충제, 항산화제, 국소 마취제, 현탁제 및 분산제, 유화제, 격리 또는 킬레이트제, 및 다른 약학적으로 허용 가능한 물질이 포함된다. 수성 비히클의 예로는 소듐 클로라이드 주사액, 링거 주사액, 등장성 덱스트로스 주사액, 멸균 물 주사액, 및 덱스트로스 및 젖산 링거 주사액이 있다. 비수성 비경구 비히클에는 식물성 고정유, 면실유, 옥수수유, 참기름 및 땅콩유가 포함된다. 등장제는 소듐 클로라이드 및 덱스트로스를 포함한다. 완충제에는 포스페이트 및 시트레이트가 포함된다. 항산화제에는 소듐 비설페이트가 포함된다. 국소 마취제에는 프로카인 하이드로클로라이드가 포함된다. 현탁제 및 분산제는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로파일 메틸셀룰로스 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 예를 들어 폴리소르베이트, 예를 들어 폴리소르베이트 80(TWEEN 80)을 포함한다. EDTA와 같은 금속 이온의 격리 또는 킬레이트제가 포함될 수 있다. 약학적 담체에는 또한 수혼화성 비히클용 폴리에틸렌 글리콜 및 프로파일렌 글리콜, pH 조정용 소듐 하이드록사이드, 염산, 시트르산 또는 젖산이 포함된다. 비항균성 방부제가 포함될 수 있다.

[0818] 약학적 조성물은 또한 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정제, 용해도 향상제와 같은 다른 소량의 무독성 보조 물질, 및 예를 들어 소듐 아세테이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 및 사이클로덱스트린과 같은 다른 제제를 함유할 수 있다. 일정한 수준의 투여량이 유지되도록 서방성 또는 서방성 시스템의 이식(예를 들어, 미국 특허 번호 3,710,795 참조)이 또한 본원에서 고려된다. 이러한 비경구 조성물에 함유된 활성 화합물의 백분율은 화합물의 활성 및 대상체의 요구뿐만 아니라 이의 특정 성질에 크게 의존한다.

[0819] **b.건조된 열안정성 제형**

[0820] 박테리아는 건조될 수 있다. 동결건조 또는 분무 건조 분말 및 유리화 유리와 같은 건조된 열안정성 제제는 용액, 에멀젼 및 다른 혼합물로 투여하기 위해 재구성될 수 있다. 건조된 열안정성 제형은 상기 기재된 현탁액과 같은 임의의 액체 제형으로부터 제조될 수 있다. 약학적 조제물은 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 재구성하기 위해 동결건조 또는 유리화된 형태로 제공될 수 있다.

[0821] 열안정성 제형은 건조된 화합물을 멸균 용액으로 재구성함으로써 투여용으로 제조된다. 용액은 분말로부터 제조된 활성 물질 또는 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 특성을 개선하는 부형제를 함유할 수 있다. 열안정성 제형은 덱스트로스, 소르비톨, 과당, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 포도당, 수크로스 또는 다른 적합한 제제와 같은 부형제를 시트레이트, 나트륨 또는 포타슘 포스페이트와 같은 적합한 완충제 당업자에게 알려

진 다른 이러한 완충제에 용해함으로써 제조된다. 그 후에, 생성된 혼합물에 약물 성분을 첨가하고 혼합될 때까지 교반한다. 생성된 혼합물을 건조용 바이알에 분배한다. 각각의 바이알에는 바이알당 $1x10^{5}$ 내지 $1x10^{11}$ CFU가 포함된 단일 용량이 들어 있다. 건조 후 생성물 바이알은 습기나 오염 물질이 밀봉된 바이알에 들어가는 것을 방지하는 용기 마개 시스템으로 밀봉된다. 건조된 생성물은 -20℃, 4℃ 또는 실온과 같은 적절한 조건에서 보관할 수 있다. 이 건조 제형을 물 또는 완충 용액으로 재구성하면 비경구 투여용 제형이 제공된다. 정확한 양은 치료되고 선택된 화합물에 따라 다르다. 이러한 양은 경험적으로 결정할 수 있다.

[0822] **4.다른 투여 경로를 위한 조성물**

[0823] 치료되는 상태에 따라, 국소 적용, 경피 패치, 및 경구 및 직장 투여와 같은 비경구 이외에 다른 투여 경로가 또한 본원에서 고려된다. 상기 기재된 현탁액 및 분말은 경구 투여될 수 있거나, 경구 투여를 위해 재구성될 수 있다. 직장 투여용 약학적 제형은 직장 좌제, 캡슐제, 전신 효과를 위한 정제 및 젤 캡슐제이다. 직장 좌제는 체온에서 녹거나 부드러워져 하나 이상의 약리학적 또는 치료학적 활성 성분을 방출하는 직장으로 삽입하기 위한 고형체를 포함한다. 직장 좌제에서 약학적으로 허용 가능한 물질은 염기 또는 비히클 및 융점 상승제이다. 염기의 예로는 코코아 버터(테오브로마 오일), 글리세린-젤라틴, CARBOWAX®(폴리옥시에틸렌 글리콜) 및 지방산의 모노-, 디- 및 트리글리세리드의 적절한 혼합물이 있다. 다양한 염기의 조합이 사용될 수 있다. 좌제의 융점을 높이는 약제에는 경랍 및 왁스가 있다. 직장 좌제은 압축 방법 또는 성형으로 제조될 수 있다. 직장 좌제의 일반적인 중량은 약 2 내지 3 그램이다. 직장 투여용 정제 및 캡슐제는 경구 투여용 제형과 동일한 약학적으로 허용 가능한 물질 및 동일한 방법으로 제조된다. 직장 투여에 적합한 제형은 단위 용량 좌제로 제공될 수 있다. 이는 약물 물질을 하나 이상의 통상적인 고체 담체, 예를 들어 코코아 버터와 혼합한 다음 생성된 혼합물을 성형함으로써 제조될 수 있다.

[0824] 경구 투여를 위해, 약학적 조성물은 예를 들어 결합제(예를 들어, 전호화 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로파일 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들어, 락토스, 미세결정질 셀룰로스 또는 칼슘 하이드로겐 포스페이트); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 활석 또는 실리카); 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트)와 같은 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 통상적인 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 코팅될 수 있다.

[0825] 협측(설하) 투여에 적합한 제형에는 예를 들어, 풍미 베이스, 일반적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트래거캔스에 활성 화합물을 함유하는 로젠지; 및 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아와 같은 불활성 염기에 화합물을 함유하는 알약이 포함된다.

[0826] 국소 혼합물은 국소 및 전신 투여에 대해 설명된 대로 제조된다. 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀젼 등일 수 있고 크림, 겔, 연고, 에멀젼, 용액, 엘릭셔, 로션, 현탁액, 팅크제, 페이스트, 폼, 에어로졸, 관개, 스프레이, 좌제, 붕대, 피부 패치, 또는 국소 투여에 적합한 임의의 다른 제형으로 제형화된다.

[0827] 조성물은 흡입과 같은 국소 적용을 위한 에어로졸로서 제형화될 수 있다(예를 들어, 폐 질환의 치료에 유용한 스테로이드의 전달을 위한 에어로졸을 기재하는 미국 특허 제4,044,126호, 제4,414,209호 및 제4,364,923호 참조). 호흡기에 투여하기 위한 이러한 제형은 분무기용 에어로졸 또는 용액의 형태, 또는 흡입용 미세 분말로서 단독으로 또는 락토스와 같은 불활성 담체와 조합될 수 있다. 이러한 경우에, 제형의 입자는 전형적으로 50 미크론 미만, 또는 10 미크론 미만의 직경을 가질 것이다.

[0828] 화합물은 국재 또는 국소, 예컨대 피부 및 점막, 예컨대 눈에의 국소 적용을 위해 겔, 크림, 및 로션의 형태로, 그리고 눈에의 적용을 위해, 또는 수조내 또는 척수내 적용을 위해 제형화될 수 있다. 경피 전달을 위해, 또한 눈 또는 점막에 투여하기 위해, 또는 흡입 요법을 위해 국소 투여가 고려된다. 활성 화합물의 비강 용액은 단독으로, 또는 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제와 조합하여 또한 투여될 수 있다.

[0829] 경피 투여에 적합한 제형이 제공된다. 장기간 동안 수용자의 표피와 밀접하게 접촉된 상태를 유지하도록 구성된 개별 패치와 같은 임의의 적합한 형식으로 제공될 수 있다. 이러한 패치는 활성 화합물에 대해 예를 들어 0.1 내지 0.2 M 농도의 임의로 완충된 수용액에 활성 화합물을 함유한다. 경피 투여에 적합한 제형은 또한 이온삼투에 의해 전달될 수 있고(예를 들어, Tyle, P. (1986) *Pharmaceutical Research* 3(6):318-326 참조), 전형적으로 활성 화합물의 임의로 완충된 수용액의 형태를 취할 수 있다.

[0830] 약학적 조성물은 또한 제어 방출 제형 및/또는 전달 장치에 의해 투여될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543;

5,120,548; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533; 및 5,733,566 참조).

[0831] **5.투여량 및 투여**

[0832] 조성물은 단일 투여 또는 다중 투여 투여를 위한 약학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 면역자극성 박테리아는 치료받는 환자에 대한 바람직하지 않은 부작용이 없는 상태에서 치료적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 양으로 포함될 수 있다. 예를 들어, 약학적 활성 화합물의 농도는 주사가 원하는 약리학적 효과를 생성하기 위한 유효량을 제공하도록 조정된다. 치료 유효 농도는 알려진 시험관내 및 생체내 시스템에서 면역자극성 박테리아를 시험함으로써, 예를 들어 본원에 기재되거나 당업계에 알려진 검정을 사용함으로써 경험적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 표준 임상 기술을 사용할 수 있다. 시험관내 분석 및 동물 모델을 사용하여 최적의 투여량 범위를 식별할 수 있다. 경험적으로 결정할 수 있는 정확한 용량은 환자 또는 동물의 연령, 체중, 체표면적 및 상태, 투여되는 특정 면역자극성 박테리아, 투여 경로, 치료할 질환의 유형 및 질환의 중증도에 의존할 수 있다.

[0833] 따라서, 정확한 투여량 및 치료 기간은 치료되는 질환의 함수이며, 알려진 시험 프로토콜을 사용하거나 생체내 또는 시험관내 시험 데이터로부터 외삽함으로써 경험적으로 결정할 수 있는 것으로 이해된다. 농도 및 투여량 값은 완화될 상태의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 임의의 특정 대상에 대해, 특정 투여 요법은 개별적 필요 및 조성물의 투여를 투여하거나 감독하는 사람의 전문적 판단에 따라 시간이 지남에 따라 조정되어야 하며, 농도 범위는 예시일 뿐이며 이를 포함하는 조성물 및 조합의 범위 또는 사용을 제한하려는 것은 아닌 것으로 본원에 설명된 것으로 추가로 이해되어야 한다. 조성물은 매시간, 매일, 매주, 매월, 매년 또는 1회 투여될 수 있다. 일반적으로 투여 요법은 독성을 제한하기 위해 선택된다. 주치의는 독성, 또는 골수, 간, 신장 또는 다른 조직 기능 장애로 인해 투여량을 낮추기 위해 요법을 종료, 중단 또는 조정하는 방법과 시기를 알고 있음을 유의해야 한다. 반대로, 주치의는 임상 반응이 적절하지 않은 경우(독성 부작용 제외) 치료를 더 높은 수준으로 조정하는 방법과 시기를 알고 있다.

[0834] 면역자극성 박테리아는 치료학적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 양으로 조성물에 포함된다. 예를 들어, 이러한 양은 암과 같은 과증식성 질환 또는 상태의 치료에서 치료 효과를 달성하는 양, 또는 백신으로서 효과적이거나 mRNA를 전달하는 데 효과적인 양이다. 예시적인 용량은 약 1 x 10^9 CFU/m^2일 수 있지만, 투여 경로에 의존한다. 아래 표와 위에서 언급한 바와 같이 더 높은 용량을 투여할 수 있다. 마우스 모델에서의 실험에서 얻은 아래 데이터는 본원에 기재된 바와 같은 게놈 변형을 갖는 균주가 균주 VNP20009와 비교하여 약 15배 이상 현저하게 개선된 내약성을 가지며, 따라서 더 많은 양으로 투여될 수 있음을 보여준다.

균주 명칭	균주 유전자형	BALB/c 마우스에서의 LD_{50}	약독화된 배수	향상된 배수 vs, VNP2009	인간 당량 용량 (CFU/m^2)
VNP20009	Δ*purI* + Δ*msbB*	4.4E6	~44,000	-	6.33E+08
ΔFLG	Δ*purI* + Δ*msbB* + Δ*asdA* + Δ*FLG*	2.0E7	200,000	4.5	2.88E+09
Δ*pagP*	Δ*purI* + Δ*msbB* + Δ*asdA* + Δ*pagP*	1.4E7	139,000	3.2	2.00E+09
ΔFLG/Δ*pagP*	Δ*purI* + Δ*msbB* + Δ*asdA* + Δ*FLG* + Δ*pagP*	>6.2E7	>620,000	>14	>8.91E+09

[0835]

[0836] 본원에 기재되고 제공된 면역자극성 박테리아는 예컨대 비강/비내 투여에 의한 그리고 폐 내로의 흡입에 의한 정맥내(IV), 및 점막을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 이는 특히 박테리아가 예를 들어, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)를 포함한 병원체, 예컨대 박테리아 및 바이러스 병원체에 대한 백신으로서 사용되는 유리한 구현예이다. 박테리아는 정제, 분말, 액체 또는 다른 적합한 제형으로서 제공될 수 있다; 이는 제형에 따라 냉동 또는 냉장 보관되거나 실온에서 보관될 수 있

다. 그러므로, mRNA를 제공하는 박테리아는 여러 가지 경로를 통해 투여될 수 있고, 편리하게 보관되고 제형화될 수 있다.

[0837] 약학적으로 및 치료적으로 활성인 화합물 및 이의 유도체는 일반적으로 단위 투여 형태 또는 다중 투여 형태로 제제화 및 투여된다. 각각의 단위 용량은 필요한 약학적 담체, 비히클 또는 희석제와 함께 원하는 치료 효과를 생성하기에 충분한 치료 활성 화합물의 미리 결정된 양을 포함한다. 단위 투여 형태는 적합한 양의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 유도체를 함유하는 정제, 캡슐, 환제, 분말, 과립, 비경구 현탁액, 경구 용액 또는 현탁액, 및 수중유 에멀젼을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 단위 용량 형태는 바이알, 앰플 및 주사기 또는 개별 포장된 정제 또는 캡슐에 포함될 수 있다. 단위 투여 형태는 분획 또는 이의 배수로 투여될 수 있다. 다중 투여 형태는 분리된 단위 투여 형태로 투여될 단일 용기에 포장된 복수의 동일한 단위 투여 형태이다. 다중 투여 형태의 예에는 바이알, 정제 또는 캡슐 병, 또는 파인트 또는 갤런 병이 포함된다. 따라서 다중 용량 형태는 포장에서 분리되지 않은 단위 용량의 배수이다. 일반적으로, 0.005% 내지 100% 범위의 활성 성분을 함유하는 제형 또는 조성물이 제조될 수 있으며 나머지는 무독성 담체로 구성된다. 약학적 조성물은 각각의 투여 경로에 적합한 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0838] 단위 용량 비경구 조제물은 앰플, 바이알 또는 바늘이 달린 주사기에 포장된다. 약학적 활성 화합물을 함유하는 액체 용액 또는 재구성된 분말 조제물의 부피는 치료될 질환 및 포장을 위해 선택된 특정 제조 물품의 함수이다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 당업계에 알려져 있고 실행되는 바와 같이 멸균되어야 한다.

[0839] 표시된 바와 같이, 본원에 제공된 조성물은 피하, 근육내, 정맥내, 피부내, 병변내, 복강내, 경막외, 질, 직장, 국소, 귀, 또는 경피 투여, 또는 임의의 투여 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업자에게 알려진 임의의 경로에 의해 제형화될 수 있다. 이러한 경로에 적합한 제형은 당업자에게 알려져 있다. 조성물은 또한 순차적으로, 간헐적으로 또는 동일한 조성물로 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다.

[0840] 약학적 조성물은 제어 방출 제형 및/또는 전달 장치에 의해 투여될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,660; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,556; 5,591,767 5,639,476, 5,674,533, 5,733,566 참조). 다양한 전달 시스템이 알려져 있고 선택된 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있고, 본원에서 사용하기 위해 고려되며, 이러한 입자는 쉽게 제조될 수 있다.

[0841] **6.포장 및 제조 물품**

[0842] 또한, 포장재, 본원에 제공된 임의의 약학적 조성물, 및 조성물이 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 병태의 치료에 사용됨을 나타내는 라벨을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 예를 들어, 라벨은 치료가 종양 또는 암에 대한 것임을 나타낼 수 있다.

[0843] 본원에 기재된 면역자극성 박테리아 및 또 다른 치료제의 조합은 또한 제조 물품에 포장될 수 있다. 한 예에서, 제조 물품은 면역자극성 박테리아 조성물을 함유하고 추가 제제 또는 치료를 함유하지 않는 약학적 조성물을 함유한다. 다른 예에서, 제조 물품은 다른 항암제와 같은 또 다른 추가 치료제를 함유한다. 이 예에서, 제제는 제조 물품으로 포장하기 위해 함께 또는 별도로 제공될 수 있다.

[0844] 본원에 제공된 제조 물품에는 포장재가 포함되어 있다. 약물 성분 포장에 사용하기 위한 포장 재료는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,323,907호, 제5,052,558호 및 제5,033,252호를 참조하며, 이러한 각각은 그 전체가 여기에 포함된다. 제약 포장 재료의 예에는 블리스터 팩, 병, 튜브, 흡입기, 펌프, 백, 바이알, 용기, 주사기, 병 및 선택된 제형 및 의도된 투여 및 치료 모드에 적합한 임의의 포장 재료가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 제조 물품의 예는 단일 챔버 및 이중 챔버 용기를 포함하는 용기이다. 용기에는 튜브, 병 및 주사기가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 용기는 정맥내 투여용 바늘을 추가로 포함할 수 있다.

[0845] 포장재의 선택은 제제, 그리고 이러한 조성물이 함께 포장될 것인지 또는 별도로 포장될 것인지의 여부에 의존한다. 일반적으로 포장은 그 안에 포함된 조성물과 반응하지 않는다. 다른 예에서, 구성요소 중 일부는 혼합물로서 포장될 수 있다. 다른 예에서 모든 구성요소는 별도로 포장된다. 따라서, 예를 들어, 구성요소는 투여 직전 혼합 시 함께 직접 투여될 수 있는 별도의 조성물로 포장될 수 있다. 대안적으로, 구성요소는 별개의 투여를 위한 별도의 조성물로서 포장될 수 있다.

[0846] 이의 제조 물품을 포함하는 선택된 조성물은 또한 키트로서 제공될 수 있다. 키트는 본원에 기재된 약학적 조성물, 및 제조 물품으로서 제공되는 투여용 항목을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 투여용 항목에 포함될 수도 있고, 추후 추가될 수 있도록 별도로 제공될 수도 있다. 키트는 선택적으로 투여량, 투여 요법 및 투여 방식에 대

한 지침을 포함하는 적용 지침을 포함할 수 있다. 키트는 또한 본원에 기재된 약학적 조성물 및 진단용 아이템을 포함할 수 있다.

[0847] **I.치료 방법 및 용도**

[0848] 본원에 제공된 방법은 암과 같은 박테리아의 투여에 의해 증상이 개선되거나 완화될 수 있는 질환 또는 병태를 갖는 대상체를 치료하기 위해 면역자극성 박테리아를 투여하거나 사용하는 방법을 포함한다. 특정 예에서, 질환 또는 병태는 종양 또는 암이다. 본원에 제공된 박테리아는 또한 상기 섹션에서 논의된 백신 및 다른 이러한 적용에 사용될 수 있다. 일부 경우, 박테리아는 이 섹션에서 기재된 바와 같이 그리고 항암제로서 사용하기 위한 참조문헌으로 기재된 바와 같이 투여될 수 있을 뿐만 아니라 다양한 병원체의 자연적인 진입 경로를 모방하는 다른 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어 상기 섹션에서 논의된 바와 같이, 예컨대 바이러스, 예컨대 호흡기 바이러스에 대한 백신화를 위해, 이는 코 또는 폐 내로 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 박테리아는 이것이 투여되는 조직, 예컨대 코, 식도 및 폐에서 T 세포 반응 및 면역 반응을 이끌어내어 현장에서 면역 반응을 촉진하여, 항원-특이적인 기억 T 세포, 뿐만 아니라 B 세포를 초래하여 장기간 반응을 제공할 것이다.

[0849] 추가로, 항암제 또는 항-히알루로난제와 같은 치료를 위한 하나 이상의 추가 제제와의 조합 요법의 방법이 또한 제공된다. 박테리아는 비경구, 전신, 국소 및 국소, 예컨대 종양내, 정맥내, 직장, 경구, 근육내, 점막 및 다른 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 본원에 기재된 박테리아의 변형으로 인해 전신 투여와 관련된 문제가 해결된다. 각각의 투여 경로에 적합한 제형이 제공된다. 당업자는 적절한 요법 및 용량을 설정할 수 있고 투여 경로를 선택할 수 있다.

[0850] **1.치료를 위한 환자 선택 및 치료 모니터링을 위한 진단**

[0851] **a.환자 선택**

[0852] 바이오마커는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아를 사용한 요법에 반응할 가능성이 있는 환자를 식별하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 아데노신 시그니처 및 골수 시그니처는 NanoString 유전자 발현 패널에 의해 평가될 수 있으며, 종양의 T-세포 침윤은 Immunoscore® 시험에 의해 평가될 수 있으며, 이는 종양 부위에서 숙주 면역 반응을 측정하여 초기 결장암 환자에서 재발 위험을 예측하는 데 사용되는 시험관내 진단 시험이다. 종양 또는 체액이 면역 반응성 또는 면역 반응을 나타내는 환자는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아를 사용한 치료에 반응할 가능성이 더 높다.

[0853] 다른 바이오마커에는 종양 침윤 림프구(TIL), CD73, CD39, TNAP(조직 비특이적 알칼리 인산분해효소), CD38, CD68, PD-L1 및 FoxP3가 포함된다. 예를 들어, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아로 치료될 수 있는 종양은 T-세포가 배제되고, 높은 수준의 퓨린/아데노신을 나타내고, PD-1/PD-L1 표적화 요법에 반응하지 않는다.

[0854] 다양한 NanoString 유전자 발현 패널을 사용하여 결정할 수 있는 유전자 발현 프로파일(GEP)은 예를 들어 종양의 "아데노신 시그너처"를 확인하기 위해 분석될 수 있다. 높은 농도의 아데노신은 결장직장암(CRC), 비소세포 폐암(NSCLC) 및 췌장암을 비롯한 특정 종양에서 발견된다. 고농도의 퓨린/아데노신을 나타내는 종양을 가진 환자는 본원의 면역자극성 박테리아가 퓨린/아데노신이 풍부한 종양 미세환경에서 축적되고 복제되기 때문에 요법에 반응할 가능성이 있다. 따라서 "아데노신 특징"을 발현하는 종양의 식별은 치료에 대한 환자의 반응을 예측하는 데 사용될 수 있다. 추가로, 본원의 면역자극성 박테리아는 종양-체류 골수성 세포에 우선적으로 축적되고 이를 감염시킨다. 따라서 "골수 시그너처"는 면역자극성 박테리아 치료에 대한 환자의 반응을 예측하는 데에도 사용할 수 있다. 예를 들어, "아데노신 시그너처"는 신장 세포 암종(RCC) 환자에서 아테졸리주맙(항 PD-L1) 단독 요법에 대한 불량한 반응과 관련된 "골수 시그너처"와 거의 동일한 것으로 나타나고, 이는 항-PD-L1 요법으로부터의 종양 탈출에서 아데노신의 역할에 대해 설명한다(예를 들어, McDermott 등 (2018) Nature Medicine 24:749-757 참조). 종양 골수성 및 종양 아데노신 NanoString 시그너처 패널을 사용할 수 있으며 환자 선택에 사용할 수 있다.

[0855] 대식세포는 예를 들어 삼중 음성 유방암에서 T-세포가 고형 종양으로 침투하는 것을 제한하고 그 기능을 억제한다(예를 들어, Keren 등 (2018) Cell 174:1373-1387 참조). CRC와 같은 특정 암에서 대식세포는 종양내 면역 집단을 지배하고 T-세포 배제를 촉진하며, 결과적으로 종양-연관 대식세포는 CRC에서 불량한 예후와 연관된다(예를 들어, Bindea *et al.* (2013) 면역 39:782-795). 암에 침투하여 암을 둘러싸고 있는 면역 세포를 기초로 암 환자의 예후를 추정하는 방법인 Immunoscore®는 T-세포 배제 또는 T-세포 침윤을 측정하는 데 사용할 수 있다. Immunoscore®는 숙주 면역 반응의 효과를 암 분류에 통합하고 예후 정확도를 향상시킨다. 종양의 중심과 주변에 있는 2개의 T 림프구 집단(CD3/CD8, CD3/CD45RO 또는 CD8/CD45RO)의 밀도를 측정하고 둘 다의 밀도가

낮을 때 0(I0) 범위의 점수를 제공하고, 세포 유형은 두 영역에서 모두 고밀도가 발견되는 경우 Immunoscore 4(I4)까지 발견된다. T 림프구의 낮은 침투는 높은 위험과 상관관계가 있는 낮은 Immunoscore®를 초래하는 반면, T 림프구의 높은 침투는 낮은 위험과 상관관계가 있는 높은 Immunoscore®를 초래한다. 따라서 Immunoscore®는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아를 사용한 치료에 반응할 환자를 식별하기 위한 전향적 바이오마커로 평가될 수 있다. 예를 들어, T-세포 불량/염증이 없는 종양은 치료될 수 있는데, 이는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아가 저온 종양에서 T-세포 침윤을 유도하기 때문이다. 이러한 종양은 체크포인트 억제에 불응성인 높은 충족되지 않은 수요 집단을 나타낸다.

[0856] 세포외 아데노신은 종양 기질 세포에서 발현되는 막 관련 외효소인 CD39(엑토-뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제 1 또는 NTPDase1)와 CD73(엑토-5'-뉴클레오티다제)의 순차적 활성에 의해 생성되며, 함께, 죽거나 죽어가는 세포에서 생성되는 ATP 또는 ADP의 인산가수분해에 의해 아데노신을 생성한다. CD39는 세포외 ATP(또는 ADP)를 5'-AMP로 전환하고, 이는 CD73에 의해 아데노신으로 전환된다. 종양 미세환경의 저산소 상태에서 내피 세포에서 CD39 및 CD73의 발현이 증가하여 아데노신 수준이 증가한다. 따라서, CD39 및 CD73은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아로 표적화될 수 있는 아데노신이 풍부한 종양을 나타내는 바이오마커로서 사용될 수 있다.

[0857] 순환 ADP 리보스 가수분해효소로도 알려진 CD38은 CD4+ T-세포, CD8+ T-세포, B 림프구 및 자연 살해 세포를 비롯한 많은 면역 세포의 표면에서 발견되는 당단백질이다. 세포 활성화의 마커인 CD38의 손실은 손상된 면역 반응과 관련이 있으며 백혈병, 골수종 및 고형 종양과 관련이 있다. 또한, CD38의 증가된 발현은 만성 림프구성 백혈병에서 바람직하지 않은 진단 마커이며 증가된 질환 진행과 관련이 있다. CD38은 또한 다발성 골수종 치료제로 승인된 다라투무맙(Darzalex®)의 표적으로 사용된다. CD68은 단핵구, 순환하는 대식세포 및 조직 대식세포(예를 들어, 쿠퍼 세포, 미세아교세포)에 의해 고도로 발현된다. FoxP3는 면역계 반응에 관여하고 면역억제성인 조절 T-세포(또는 Treg)의 발달 및 기능에서 조절자 역할을 한다. 암에서 과도한 조절 T-세포 활성은 면역계가 암세포를 방해하는 것을 방지할 수 있다. 따라서, CD38, CD68 및 FoxP3는 또한 본원의 면역자극성 박테리아를 사용한 요법에 반응할 가능성이 있는 환자의 선택을 위한 바이오마커로서 사용될 수 있다.

[0858] **b.면역자극성 박테리아의 활성을 평가하거나 검출하기 위한 진단은 치료의 효과성을 나타낸다**

[0859] 바이오마커는 치료 후 면역자극성 박테리아를 모니터링하는 데 사용할 수 있다. 바이오마커는 종양 시료 및/또는 혈액, 혈장, 소변, 타액 및 다른 체액과 같은 체액 시료에서 발생한다. 검증된 말초 혈액 바이오마커는 치료 전과 치료 중 환자의 면역 상태를 평가하고 치료 효과와 상관관계가 있는 면역 상태의 변화를 결정하는 데 사용된다. 항종양 면역 반응 상태의 변화 또는 증가는 면역자극성 박테리아 치료가 효과가 있음을 나타낸다. 예를 들어, 용량 증량 및 확장 연구에서 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 면역조절 활성이 평가될 수 있다. 바이오마커를 조사하면 질환(예를 들어, 종양) 상태 및 치료와 관련된 예후 및 예측 요인이 밝혀져 치료 모니터링에 도움이 될 수 있다. 예를 들어, 종양 미세환경을 평가하면 면역 요법에 대한 종양 반응의 기전에 대한 통찰력을 얻을 수 있다. 면역자극성 박테리아의 면역조절 활성을 검출하기 위한 혈청 바이오마커는 CXCL10(IP-10), CXCL9, 인터페론-β, 인터페론-γ, 전염증성 혈청 사이토카인(예를 들어, IL-6, TNF-α, MCP-1/CCL1), 및 IL-18 결합 단백질을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0860] CXCL10 및 CXCL9는 예를 들어 면역 요법에 대한 반응으로 CD8+ T-세포 활성화 및 종양으로의 이동에 필요한 케모카인이다. 항-PD-1 면역체크포인트저해제 니볼루맙(nivolumab)의 전이성 신세포암(mRCC) 환자 치료를 위한 3상 시험에서 용량에 관계없이 대다수 환자가 공유하는 면역 약력학적 효과 투여가 확인되었다. IFN-γ 조절 혈청 케모카인 CXCL9 및 CXCL10의 평가는 Luminex 기술(Myriad® Rules-Based Medicine(RBM))에 기반한 다중 패널을 사용하여 수행되었으며, 그 결과 CXCL9 및 CXCL10 혈청 수준이 증가할 뿐만 아니라 종양에서의 전사는 임상 반응과 상관관계가 있는 것으로 실증되었다. 기준선에서 니볼루맙으로 치료한 후 케모카인 수준의 중앙값 증가는 말초혈액에서 CXCL9의 경우 101%, CXCL10의 경우 37%였다(예를 들어, Choueiri 등 (2016) Clin. Cancer Res. 22(22):5461-5471). 또한, 진행성 고형 종양 또는 림프종 환자를 MK-1454 STING 작용제(Merck)로 치료하면 종양 내 투여 후 혈청 CXCL10이 용량 의존적으로 증가하였다(예를 들어, Harrington *et al.* ESMO Annual Meeting (2018)).

[0861] ADU-S100 STING 작용제(Aduro)의 종양내 투여 후 IFN-β의 혈청 수준의 용량 의존적 증가가 관찰되었다(예를 들어, Meric-Bernstam 등 ASCO Annual Meeting(2019) 참조). 또한, VNP20009의 정맥내 투여는 전염증성 사이토카인 IL-6, TNF-α, IL-1β 및 IL-12의 혈청 수준에서 용량 의존적 증가를 유도하였다(예를 들어, Toso *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(1):142-152).

[0862] IL-18은 세포내 박테리아, 진균 및 바이러스에 대한 보호 면역 반응에 참여하고 폐암, 유방암, 육종 및 흑색종의 전임상 모델에서 항종양 활성을 입증하였다. IL-18의 생물학적 활성은 IFN-γ를 통해 유도된 IL-18 결합 단백질(IL-18BP)에 의해 음성 피드백 루프에서 조절된다. 따라서, IL-18BP의 혈청 수준은 임상 IFN-γ 활성을 예측한다. 진행성 암 환자에게 재조합 인간 IL-18(rhIL-18)을 정맥내 투여하면 용량 의존적으로 IL-18 결합 단백질뿐만 아니라 IFN-γ, GM-CSF, 및 가용성 Fas 리간드의 혈청 농도가 증가하였다(예를 들어, Robertson 등 (2006) Clin. Cancer Res. 12(14):4265-4273 참조). 또한, 소변과 혈청의 IL-18BP 수준은 전립선암 환자의 종양 상태와 상관관계가 있는 것으로 관찰되었으며; 전립선암이 있는 경우와 없는 경우 간에 요 중 IL-18BP 수준의 상당한 차이가 발견되었으며, 증가된 혈청 IL-18BP 수준은 전립선암 글리슨 점수(Gleason score) 증가와 상관관계가 있어 전립선암 세포에서 IL-18BP 분비가 증가하면 암에 의해 면역 감시를 피하기 위한 시도를 나타낼 수 있음을 보여준다(예를 들어, Fujita 등 (2011) Int. J. Cancer 129(2):424-432 참조). 따라서 IL-18BP는 종양 면역 반응에 대한 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0863] **2.종양**

[0864] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아, 조합, 용도 및 방법은 예를 들어 폐암, 방광암, 비-소세포 폐암, 위암, 두경부암, 난소암, 간암, 췌장암, 신장암, 유방암, 대장암 및 전립선암을 포함한 암을 포함한 모든 유형의 종양, 특히 고형 종양을 치료하는 데 적용 가능하다. 방법은 또한 혈액암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0865] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아, 조성물, 조합, 용도 및 방법에 의해 치료되는 종양 및 암에는 면역계, 골격계, 근육 및 심장, 유방, 췌장, 위장관, 중추 및 말초 신경계, 신장계, 생식계, 호흡기계, 피부, 관절을 포함한 결합 조직계, 지방 조직, 및 혈관벽을 포함한 순환계에서 기원하는 종양 및 암이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아로 치료될 수 있는 종양의 예는 암종, 신경교종, 육종(지방육종 포함), 선암종, 선육종 및 선종을 포함한다. 이러한 종양은 예를 들어 유방, 심장, 폐, 소장, 결장, 비장, 신장, 방광, 두경부, 난소, 전립선, 뇌, 췌장, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 흉선, 자궁, 고환, 자궁경부 또는 간을 비롯한 신체의 거의 모든 부분에서 발생할 수 있다.

[0866] 골격계의 종양은 예를 들어 육종 및 골육종, 연골육종 및 연골모세포종과 같은 모세포종을 포함한다. 근육 및 심장 종양은 골격 및 평활근 둘 다의 종양, 예를 들어 평활근종(평활근의 양성 종양), 평활근육종, 횡문근종(골격근의 양성 종양), 횡문근육종 및 심장 육종을 포함한다. 위장관의 종양에는 예를 들어 입, 식도, 위, 소장 및 결장의 종양 및 결장직장 종양뿐만 아니라 침샘, 간, 췌장 및 담관과 같은 위장 분비 기관의 종양이 포함된다. 중추 신경계(CNS)의 종양은 뇌, 망막 및 척수의 종양을 포함하며 관련 결합 조직, 뼈, 혈관 또는 신경 조직에서 기원할 수도 있다. 말초 신경계 종양의 치료도 고려된다. 말초 신경계의 종양에는 악성 말초 신경초 종양이 포함된다. 신장계의 종양에는 신장의 종양, 예를 들어 신세포 암종, 뿐만 아니라 요관 및 방광의 종양이 포함된다. 생식 기관의 종양에는 자궁경부, 자궁, 난소, 전립선, 고환 및 관련 분비선의 종양이 포함된다. 면역계의 종양은 림프종, 예를 들어 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종을 포함하는 혈액-기초 및 고형 종양을 모두 포함한다. 호흡계 종양에는 비강, 기관지 및 폐의 종양이 포함된다. 유방의 종양은 예를 들어 소엽 및 도관 암종 둘 다를 포함한다.

[0867] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 및 방법에 의해 치료될 수 있는 종양의 다른 예는 카포시 육종, CNS 신생물, 신경모세포종, 모세혈관모세포종, 수막종 및 뇌 전이, 흑색종, 위장관 및 신장 암종 및 육종, 횡문근육종, 교모세포종(다형성 교모세포종) 및 평활근육종을 포함한다. 본원에 제공된 바와 같이 치료될 수 있는 다른 암의 예는 림프종, 모세포종, 신경내분비 종양, 중피종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프성 악성종양을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 이러한 암의 예로는 혈액 악성종양, 예를 들어 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(버킷 림프종, 소림프구성 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 균상식육종, 외투세포 림프종, 여포성 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 변연부 림프종, 모세포 백혈병 및 림프형질구성 백혈병), B-세포 급성 림프모구 백혈병/림프종 및 T-세포 급성 림프모구 백혈병/림프종을 포함하는 림프구 전구체 세포의 종양, 흉선종, 말초 T-세포 백혈병, 성인 T-세포 백혈병/T-세포 림프종 및 거대 과립 림프구성 백혈병을 포함하는 성숙한 T 및 NK 세포의 종양, 랑게르한스 세포 조직구증, 급성 골수성 백혈병과 같은 골수 신생물, 성숙을 동반한 급성 골수성 백혈병(AML), 분화 없는 AML, 급성 전골수구성 백혈병 골수단구성 백혈병, 급성 단핵구 백혈병, 골수이형성 증후군 및 만성 골수성 백혈병을 포함하는 만성 골수증식성 장애; 신경교종, 교모세포종, 신경모세포종, 성상세포종, 수모세포종, 뇌실막종 및 망막모세포종과 같은 중추신경계 종양; 두경부 고형 종양(예를 들어, 비인두암, 타액선 암종 및 식도암), 폐(예를 들어, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐 선암종 및 폐암 편평상피암), 소화기계통(예를 들어, 위암 또는 위암, 위장관암, 담관암 또는 담도암, 결장암, 직장암, 결장직장암 및 항문암 포함), 생식계(예를 들어, 고환, 음경, 전립선, 자궁, 질, 외음부, 자궁경부암, 난소암 및 자궁내막암), 피부(예

를 들어, 흑색종, 기저세포암, 편평세포암, 광선각화증 및 피부 흑색종), 간(예를 들어, 간암, 간암, 간세포암, 및 간암), 뼈(예를 들어, 파골세포종 및 골용해성 뼈암), 추가 조직 및 기관의 고형 종양(예를 들어, 췌장암, 방광암, 신장 또는 신장암, 갑상선암, 유방암, 복막암, 및 카포시 육종), 혈관계의 종양(예를 들어, 혈관육종 및 혈관주위세포종), 윌름 종양, 망막모세포종, 골육종 및 에윙 육종을 포함한다.

[0868] **3.투여**

[0869] 본원의 용도 및 방법을 실행함에 있어서, 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 종양을 갖거나 신생물 세포를 갖는 대상체를 포함하는 대상체, 또는 면역화될 대상체에게 투여될 수 있다. 하나 이상의 단계는 면역자극성 박테리아를 투여하기에 적절한 상태로 대상체를 진단하고, 대상체의 면역적격을 결정하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 대상체에 면역자극성 박테리아를 투여하기 전, 동시에 또는 이후에 수행될 수 있다. 대상체를 면역화하거나, 화학요법제로 대상체를 치료하거나, 방사선으로 대상체를 치료하거나, 대상체를 외과적으로 치료하는 것을 포함한다.

[0870] 치료 목적을 위해 종양-보유 대상체에게 면역자극성 박테리아를 투여하는 것을 포함하는 구현예의 경우, 대상체는 전형적으로 이전에 신생물 상태로 진단된 적이 있다. 진단 방법은 또한 신생물 상태의 유형을 결정하고, 신생물 상태의 단계를 결정하고, 대상체에서 하나 이상의 종양의 크기를 결정하고, 대상체의 림프절에서 전이성 또는 신생물성 세포의 존재 또는 부재를 결정하고, 또는 대상체에서 전이의 존재를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0871] 대상체에 면역자극성 박테리아를 투여하기 위한 치료 방법의 일부 구현예는 원발성 종양의 크기 또는 신생물성 질환의 병기를 결정하는 단계를 포함할 수 있고, 원발성 종양의 크기가 임계 부피 이상인 경우 또는 신생물 질환의 단계가 역치 단계 이상인 경우, 면역자극성 박테리아가 대상체에게 투여된다. 유사한 구현예에서, 원발성 종양의 크기가 역치 부피 미만인 경우 또는 신생물 질환의 단계가 역치 단계 이하인 경우, 면역자극성 박테리아는 대상체에게 아직 투여되지 않고; 이러한 방법은 종양 크기 또는 신생물성 질환 단계가 역치 양에 도달할 때까지 대상체를 모니터링한 다음, 대상체에게 면역자극성 박테리아를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 역치 크기는 종양의 성장 속도, 종양을 감염시키는 면역자극성 박테리아의 능력 및 대상체의 면역적격성을 비롯한 여러 요인에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 역치 크기는 면역자극성 박테리아가 숙주의 면역계에 의해 완전히 제거되지 않고 종양 내부 또는 근처에서 축적 및 복제하기에 충분한 크기일 것이며 일반적으로 일정 기간 동안 박테리아 감염을 지속하기에 충분한 크기일 것이며, 숙주가 종양 세포에 대한 면역 반응을 일으킬 만큼 충분히 길며, 일반적으로 약 1주 이상, 약 10일 이상, 또는 약 2주 이상이다. 예시적인 역치 병기는 가장 낮은 병기를 넘어선 임의의 병기(예를 들어, 병기 I 또는 등가물), 또는 원발성 종양이 역치 크기보다 큰 임의의 병기, 또는 전이성 세포가 검출되는 임의의 병기이다.

[0872] 면역자극성 박테리아가 종양 또는 전이에 들어갈 수 있도록 하는 투여 방식이 제공된다면, 대상체에 대한 미생물의 임의의 투여 방식이 사용될 수 있다. 투여 방식은 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 국소, 종양내, 다천자, 흡입, 비강내, 경구, 공동내(예를 들어, 카테터를 통해 방광에 투여하거나 좌제 또는 관장), 귀, 직장 및 안구 투여를 포함할 수 있지만 이로 제한되지 않는다.

[0873] 당업자는 대상체 및 박테리아와 양립할 수 있는 임의의 투여 방식을 선택할 수 있으며, 이는 또한 박테리아가 종양 및/또는 전이에 도달하게 할 가능성이 있다. 투여 경로는 질환의 성질, 종양의 종류, 및 약학적 조성물에 함유된 특정 박테리아를 포함하는 다양한 인자 중 임의의 것에 따라 당업자에 의해 선택될 수 있다. 표적 부위에 대한 투여는 예를 들어 탄도 전달에 의해, 또는 콜로이드성 분산 시스템으로서 수행될 수 있거나, 전신 투여는 동맥에 주사함으로써 수행될 수 있다.

[0874] 투여 요법은 임의의 다양한 방법 및 양일 수 있고, 알려진 임상 인자에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 단일 용량은 면역 자극이 치료에 영향을 미치는 질환 또는 장애를 치료하는 데 치료적으로 효과적일 수 있다. 이러한 자극의 예는 특이적 면역 반응 및 비특이적 면역 반응 중 하나 또는 둘 다, 특이적 및 비특이적 반응, 내재성 반응, 1차 면역 반응, 적응 면역력 , 2차 면역 반응, 기억 면역 반응, 면역 세포 활성화, 면역 세포 증식, 면역 세포 분화 및 사이토카인 발현을 포함하지만 이로 제한되지 않는 면역 반응이다.

[0875] 의학 분야에 알려진 바와 같이, 대상체에 대한 투여량은 대상체의 종, 크기, 체표면적, 연령, 성별, 면역적격성 및 일반적인 건강, 투여할 특정 박테리아, 투여의 기간 및 경로, 질환의 종류 및 병기, 예를 들어 종양의 크기, 및 동시에 투여되는 약물과 같은 다른 화합물을 비롯한 많은 요인에 따라 의존할 수 있다. 상기 인자에 더하여, 이러한 수준은 당업자에 의해 결정될 수 있는 바와 같이 박테리아의 감염성 및 박테리아의 성질에 의해 영향을

받을 수 있다. 본 방법에서, 박테리아의 적절한 최소 투여량 수준은 박테리아가 종양 또는 전이에서 생존, 성장 및 복제하기에 충분한 수준일 수 있다. 65 kg 인간에게 박테리아를 투여하기 위한 예시적인 최소 수준은 적어도 약 5×10^6 콜로니 형성 단위(CFU), 적어도 약 1×10^7 CFU, 적어도 약 5×10^7 CFU, 적어도 약 1×10^8 CFU 또는 적어도 약 1×10^9 CFU를 포함할 수 있다. 본 방법에서, 박테리아의 적절한 최대 투여량 수준은 숙주에 독성이 없는 수준, 3배 이상의 비장비대를 일으키지 않는 수준, 또는 약 1일 후, 또는 약 3일 후, 또는 약 7일 후 정상 조직 또는 기관에서 콜로니 또는 플라크를 생성하지 않는 수준일 수 있다. 65 kg 인간에게 박테리아를 투여하기 위한 예시적인 최대 수준은 약 5×10^{11} CFU 이하, 약 1×10^{11} CFU 이하, 약 5×10^{10} CFU 이하, 약 1×10^{10} CFU 이하, 또는 약 1×10^9 CFU 이하를 포함한다.

[0876] 본원에 제공된 방법 및 용도는 대상체에 대한 면역자극성 박테리아의 단일 투여, 또는 대상체에 대한 면역자극성 박테리아의 다중 투여, 또는 다른 항종양 치료제 및/또는 치료와의 조합 요법을 비롯한 다양한 요법의 다른 것을 포함할 수 있다. 여기에는 예를 들어 변형된 면역 세포의 투여와 같은 세포 요법; CAR-T 요법; CRISPR 요법; 항체(예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 및 항-CTLA-4 항체, 및 다른 이러한 면역요법)와 같은 체크포인트 저해제; 뉴클레오사이드 유사체와 같은 화학요법 화합물; 수술; 및 방사선 요법이 포함된다. 다른 암 요법은 또한 항-VEGF, 항-VEGFR, 항-VEGFR2, 항-TGF-β 또는 항-IL-6 항체, 또는 이의 단편, 암 백신, 및 종양용해성 바이러스를 포함한다.

[0877] 일부 구현예에서, 단일 투여는 박테리아가 콜로니화할 수 있고 대상체에서 항종양 반응을 유발하거나 향상시킬 수 있는 종양에서 면역자극성 박테리아를 확립하기에 충분하다. 다른 구현예에서, 본원의 방법에 사용하기 위해 제공된 면역자극성 박테리아는 상이한 경우에 투여될 수 있고, 일반적으로 적어도 1일까지 시간적으로 분리될 수 있다. 별개의 투여는 박테리아를 종양 또는 전이로 전달할 가능성을 증가시킬 수 있으며, 이전 투여는 박테리아를 종양 또는 전이로 전달하는 데 효과적이지 않았을 수 있다. 구현예에서, 별개의 투여는 박테리아 콜로니화/증식이 발생할 수 있는 종양 또는 전이 상의 위치를 증가시킬 수 있거나, 그렇지 않으면 종양에 축적된 박테리아의 역가를 증가시킬 수 있으며, 이는 숙주의 항종양 면역 반응을 이끌어내거나 향상시킬 수 있다.

[0878] 별개의 투여가 수행되는 경우, 각각의 투여는 다른 투여 투여량과 비교하여 동일하거나 상이한 투여량일 수 있다. 한 구현예에서, 모든 투여 투여량은 동일하다. 다른 구현예에서, 제1 투여량은 하나 이상의 후속 투여량보다 더 큰 투여량, 예를 들어 후속 투여량보다 적어도 10배, 적어도 100배, 또는 적어도 1000배 더 클 수 있다. 제1 투여량이 하나 이상의 후속 투여량보다 많은 별개의 투여 방법의 한 예에서, 모든 후속 투여량은 제1 투여와 비교하여 동일하고 더 적은 양일 수 있다.

[0879] 별개의 투여는 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 투여를 포함하는 임의의 수의 2개 이상의 투여를 포함할 수 있다. 당업자는 치료 방법을 모니터링하기 위한 당업계에 알려진 방법 및 본원에 제공된 다른 모니터링 방법에 따라 수행할 투여 횟수 또는 하나 이상의 추가 투여를 수행하는 것이 바람직함을 쉽게 결정할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 방법은 대상체에게 면역자극성 박테리아의 1회 이상의 투여를 제공하는 방법을 포함하며, 여기서 투여 횟수는 대상체를 모니터링함으로써 결정될 수 있고, 모니터링 결과에 기초하여 하나 이상의 추가 투여를 제공할지의 여부를 결정한다. 하나 이상의 추가 투여를 제공할지의 여부를 결정하는 것은 종양 성장의 표시 또는 종양 성장의 억제, 새로운 전이의 출현 또는 전이의 억제, 대상체의 항박테리아 항체 역가, 대상체의 항종양 항체 역가, 대상체의 전반적인 건강 및 대상체의 체중을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 모니터링 결과에 기반할 수 있다.

[0880] 투여 사이의 기간은 다양한 기간 중 임의의 것일 수 있다. 투여 사이의 기간은 투여 횟수와 관련하여 설명된 모니터링 단계, 대상체가 면역 반응을 일으키는 시간, 대상체가 정상 조직에서 박테리아를 제거하거나 종양 또는 전이에서 박테리아 콜로니화/증식 기간을 포함한 여러 가지 인자 중 임의의 인자의 함수일 수 있다. 한 예에서, 기간은 대상체가 면역 반응을 일으키는 기간의 함수일 수 있고; 예를 들어, 기간은 약 1주 초과, 약 10일 초과, 약 2주 초과, 또는 약 1개월 초과와 같이 대상체가 면역 반응을 일으키는 기간보다 길 수 있다. 다른 예에서, 기간은 약 1주 미만, 약 10일 미만, 약 2주 미만, 또는 약 1개월 미만과 같이 대상체가 면역 반응을 일으키는 기간보다 짧을 수 있다. 다른 예에서, 기간은 종양 또는 전이에서 박테리아 콜로니화/증식을 위한 기간의 함수일 수 있고; 예를 들어, 기간은 약 3일, 약 5일, 약 1주일, 약 10일, 약 2주, 또는 약 1개월과 같이 검출 가능한 마커를 발현하는 미생물의 투여 후 종양 또는 전이에서 검출 가능한 신호가 발생하는 시간보다 길 수 있다.

[0881] 본원에 사용된 방법은 또한 본원에 제공된 면역자극성 박테리아를 함유하는 현탁액 및 다른 제제와 같은 조성물을 투여함으로써 수행될 수 있다. 이러한 조성물은 본원에 제공되거나 당업자에게 알려진 바와 같은 박테리아

및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 비히클을 함유한다.

[0882] 상기 논의된 바와 같이, 본원에 제공된 용도 및 방법은 또한 대상체에게 면역자극성 박테리아를 투여하는 것 이외에 항종양 화합물 또는 다른 암 치료제와 같은 하나 이상의 치료 화합물을 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 치료 화합물은 종양 치료 효과를 위해 독립적으로 또는 면역자극성 박테리아와 함께 작용할 수 있다. 독립적으로 작용할 수 있는 치료 화합물은 종양 성장을 억제하거나, 전이 성장 및/또는 형성을 억제하거나, 종양 또는 전이의 크기를 감소시키거나, 종양 또는 전이를 제거할 수 있는, 면역자극성 박테리아는 종양에 축적되고, 종양에서 복제되며, 대상체에서 항종양 면역 반응을 유발하거나 향상시킨다. 이러한 화학요법제의 예에는 티오테파 및 사이클로포스파미드와 같은 알킬화제; 부술판, 임프로술판, 피포술판 등의 알킬 설포네이트; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄 및 테스토락톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토탄 및 트리로스탄과 같은 항아드레날; 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린과 같은 항안드로겐; 항생제, 예를 들어 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 칼리케아미신, 카루비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노루비시노류신, 도에피노루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 퀘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴 및 조루비신; 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston®); 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항대사물질; 데놉테린, 메토트렉세이트, 프테롭테린 및 트리메트렉세이트와 같은 엽산 유사체; 벤조데파, 카르보쿠온, 메투레데파 및 우레데파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸올 멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸멜라민; 엽산과 같은 엽산 보충제; 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 염산염, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드 및 우라실 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴과 같은 니트로소우레아; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 아르기닌 데이미나제 및 아스파라기나제와 같은 단백질; 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린 및 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 및 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 탁산, 및 이의 알부민화 형태(즉, nab-파클리탁셀 및 nab-도세탁셀); RFS-2000과 같은 토포이소머라제 저해제; Tomudex®와 같은 티미딜레이트 합성효소 저해제; 및 아세글라톤을 포함한 추가 화학요법제; 알도포스파미드 배당체; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포스파미드; 데메콜신; 디아지쿠온; 디플루오로메틸오르니틴(DFMO); 에플로르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 질산염; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카바진; PSK®; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 클로람부실; 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 배꼽빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다®; 이반드로네이트; CPT-11; 레티노산; 에스페라마이신; 카페시타빈; 및 이리노테칸과 같은 토포이소머라제 저해제가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 약학적으로 허용 가능한 염, 산, 또는 상기 임의의 유도체가 또한 사용될 수 있다.

[0883] 면역자극성 박테리아와 함께 작용하는 치료 화합물은, 예를 들어 인코딩된 치료 생성물, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 공동자극성 분자, 유형 I IFN을 항시적으로 유도하는 단백질, 체크포인트 유전자(들)의 발현을 저해, 억제 또는 방해하는 RNAi 분자, 다른 표적에 대한 체크포인트 저해제 항체 및 항체들 또는 이의 단편, 또는 박테리아 콜로니화/증식을 추가로 증가시킬 수 있는 화합물의 발현을 증가시킴으로써 박테리아의 면역 반응 유도 특성을 증가시키는 화합물을 포함한다. 예를 들어, 유전자 발현 변경 화합물은 플라스미드에 인코딩된 외인성 유전자와 같은 박테리아에서 유전자의 전사를 유도하거나 증가시켜 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. IPTG 및 RU486을 포함하여 유전자 발현을 변경할 수 있는 임의의 매우 다양한 화합물이 당업계에 알려져 있다. 발현이 상향조절될 수 있는 예시적인 유전자는 독소, 전구약물을 항종양 약물로 전환시킬 수 있는 효소, 사이토카인, 전사 조절 단백질, shRNA, siRNA 및 리보자임을 포함하는 RNA 분자 및 단백질을 인코딩하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 면역자극성 박테리아와 함께 작용하여 박테리아의 콜로니화/증식 또는 면역 반응 유도 특성을 증가시킬 수 있는 치료 화합물은 박테리아로 인코딩된 유전자 생성물과 상호작용할 수 있는 화합물이고, 이러한

상호작용은 대상체에서 종양 세포의 증가된 사멸, 또는 증가된 항종양 면역 반응을 초래할 수 있다. 박테리아로 인코딩된 유전자 생성물과 상호작용할 수 있는 치료 화합물에는 예를 들어 이의 대상체에게 투여된 형태에서 독성, 또는 다른 생물학저 활성이 거의 없거나 전혀 없으나, 박테리아-인코딩된 유전자 생성물과 상호작용 후, 화합물이 세포독성, 세포자멸사 유도 능력 또는 면역 반응을 유발하는 능력을 포함하지만 이로 제한되지 않는 종양 세포 사멸을 초래하는 특성을 발달시킬 수 있는 전구약물 또는 다른 화합물이 포함될 수 있다. 간사이클로비르, 5-플루오로우라실, 6-메틸퓨린 데옥시리보시드, 세팔로스포린-독소루비신, 4-[(2-클로로에틸)(2-메술옥시에틸)아미노]벤조일-L-글루탐산, 아세트아미노펜, 인돌-3-아세트산, CB1954, 7-에틸-10-[4-(1-피페리디노)-1-피페리디노]카르보닐옥시캄프토테신, 비스-(2-클로로에틸)아미노-4-하이드록시페닐아미노메탄온 28, 1-클로로메틸-5-하이드록시-1,2-디히로-3H-벤즈[e]인돌, 에피루비신-글루쿠로나이드, 5'-데옥시5-플루오로우리딘, 시토신 아라비노시드 및 리나마린을 비롯한 다양한 전구약물 유사 물질이 당업계에 알려져 있다.

[0884] **4.모니터링**

[0885] 본원에 제공된 방법은 대상체 모니터링, 종양 모니터링, 및/또는 대상체에 투여된 면역자극성 박테리아 모니터링의 하나 이상의 단계를 추가로 포함할 수 있다. 종양 크기 모니터링, 전이의 존재 및/또는 크기 모니터링, 대상체의 림프절 모니터링, 대상체의 체중, 또는 혈액 또는 소변 마커를 포함하는 다른 건강 지표의 모니터링, 항박테리아 항체 역가 모니터링, 검출 가능한 유전자 생성물의 박테리아 발현 모니터링, 및 대상체의 종양, 조직 또는 기관에서 박테리아 역가 직접 모니터링을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 다양한 모니터링 단계가 본원에 제공된 방법에 포함될 수 있다.

[0886] 모니터링의 목적은 단순히 대상체의 건강 상태 또는 대상체의 치료 진행 상황을 평가하기 위한 것일 수도 있고, 동일하거나 다른 면역자극성 박테리아의 추가 투여가 필요한지 여부를 결정하거나, 화합물이 치료 방법의 효능을 증가시키는 작용을 할 수 있거나, 화합물이 대상체에게 투여된 박테리아의 병원성을 감소시키는 작용을 할 수 있는 경우 대상체에게 화합물을 투여할지 여부를 결정하기 위한 것일 수도 있다.

[0887] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 하나 이상의 박테리아 발현 유전자를 모니터링하는 것을 포함할 수 있다. 본원에 제공되거나 당업계에 알려진 것과 같은 박테리아는 검출 가능한 단백질을 포함하지만 이로 제한되지 않는 하나 이상의 검출 가능한 유전자 생성물을 발현할 수 있다.

[0888] 본원에 제공된 바와 같이, 박테리아에서 발현되는 검출 가능한 유전자 생성물의 측정은 대상체에 존재하는 박테리아 수준의 정확한 측정을 제공할 수 있다. 본원에 추가로 제공되는 바와 같이, 예를 들어 단층촬영 방법을 비롯한 영상화 방법에 의한 검출 가능한 유전자 생성물의 위치 측정은 대상체에서 박테리아의 위치를 결정할 수 있다. 따라서, 검출 가능한 박테리아 유전자 생성물을 모니터링하는 것을 포함하는 본원에 제공된 방법은 대상체의 하나 이상의 기관 또는 조직에서 박테리아의 존재 또는 부재, 및/또는 또는 대상체의 종양 또는 전이에서 박테리아의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 추가로, 검출 가능한 박테리아 유전자 생성물을 모니터링하는 것을 포함하는 본원에 제공된 방법을 사용하여 하나 이상의 기관, 조직, 종양 또는 전이에 존재하는 박테리아의 역가를 결정할 수 있다. 정상 조직 및 기관의 박테리아 감염, 특히 감염 수준이 박테리아의 병원성을 나타낼 수 있기 때문에 대상체에서 박테리아의 위치 및/또는 역가를 모니터링하는 것을 포함하는 방법은 박테리아의 병원성을 결정하는 데 사용할 수 있다. 대상체에서 면역자극성 박테리아의 국소화 및/또는 역가를 모니터링하는 것을 포함하는 방법은 여러 시점에서 수행될 수 있으며, 따라서 대상체의 하나 이상의 장기 또는 조직에서 박테리아 복제 속도를 포함하여 대상체에서 박테리아 복제 속도를 결정할 수 있으며; 따라서, 박테리아 유전자 생성물을 모니터링하는 것을 포함하는 방법은 박테리아의 복제 능력을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법은 또한 다양한 기관 또는 조직, 및 종양 또는 전이에 존재하는 면역자극성 박테리아의 양을 정량화하는 데 사용될 수 있으며, 이로써 대상체에서 박테리아의 우선적 축적 정도를 나타낼 수 있고; 따라서, 박테리아 유전자 생성물 모니터링은 정상 조직 또는 기관보다 우선적으로 종양 또는 전이에 축적되는 박테리아의 능력을 결정하는 방법에 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법에 사용된 면역자극성 박테리아는 전체 종양에 축적될 수 있거나 종양의 여러 부위에 축적될 수 있고 전이에도 축적될 수 있기 때문에, 박테리아 유전자 생성물을 모니터링하기 위해 본원에 제공된 방법을 사용하여 종양의 크기, 또는 대상체에 존재하는 전이의 수를 결정할 수 있다. 일정 기간 동안 종양 또는 전이에서 박테리아 유전자 생성물의 존재를 모니터링하는 것은 종양의 성장 또는 축소, 또는 새로운 전이의 발달 또는 전이의 소실을 포함하는 종양 또는 전이의 변화를 평가하는 데 사용될 수 있으며, 또한 종양의 성장 또는 축소 속도, 또는 새로운 전이의 진행 속도 또는 전이의 소멸 속도, 또는 종양의 성장 또는 축소 속도의 변화, 또는 새로운 전이의 진행 속도 또는 전이의 소멸 속도의 변화를 결정하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 박테리아 유전자 생성물의 모니터링은 종양의 성장 또는 축소 속도, 또는 새로운 전이의 진행 또는 전이의 소멸, 또는 종양의 성장 또는 축소 속도의 변화, 또는 새로운 전이의 진

행 또는 전이의 소멸 속도의 변화를 결정함으로써 대상체에서 신생물 질환을 모니터링하거나 신생물 질환의 치료 효능을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0889] 임의의 다양한 검출 가능한 단백질은 모니터링에 의해 검출될 수 있으며, 그 예시는 임의의 다양한 형광 단백질(예를 들어, 녹색 형광 단백질), 임의의 다양한 루시페라제, 트랜스페린 또는 다른 철-결합 단백질; 또는 수용체, 결합 단백질 및 항체(여기서, 수용체, 결합 단백질 또는 항체에 특이적으로 결합하는 화합물은 검출 가능한 제제일 수 있거나 검출 가능한 물질(예를 들어, 방사성핵종 또는 영상화 제제)로 표지될 수 있다.

[0890] 종양 및/또는 전이 크기는 외부 평가 방법, 또는 단층 촬영 또는 자기 영상화 방법을 포함하는 당업계에 알려진 임의의 다양한 방법에 의해 모니터링될 수 있다. 당업계에 알려진 방법에 첨가하여, 본원에 제공된 방법, 예를 들어 박테리아 유전자 발현을 모니터링하는 방법을 사용하여 종양 및/또는 전이 크기를 모니터링할 수 있다.

[0891] 여러 시점에 걸쳐 크기를 모니터링하는 것은 종양 또는 전이의 크기의 증가 또는 감소에 관한 정보를 제공할 수 있고, 또한 대상체에서 추가 종양 및/또는 전이의 존재에 관한 정보를 제공할 수 있다. 여러 시점에 걸쳐 종양 크기를 모니터링하는 것은 대상체에서 신생물성 질환의 치료 효능을 포함하여 대상체에서 신생물성 질환의 발달에 관한 정보를 제공할 수 있다.

[0892] 본원에 제공된 방법은 또한 대상체에 대한 면역자극성 박테리아의 투여에 반응하여 생성된 항체를 포함하여 대상체에서 항체 역가를 모니터링하는 것을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 방법에서 투여된 박테리아는 내인성 박테리아 항원에 대한 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 본원에 제공된 방법에서 투여된 박테리아는 또한 박테리아에 의해 발현되는 외인성 유전자에 대한 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 본원에 제공된 방법에서 투여된 박테리아는 또한 종양 항원에 대한 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 박테리아 항원, 박테리아로 발현된 외인성 유전자 생성물 또는 종양 항원에 대한 항체 역가 모니터링은 박테리아의 독성을 모니터링하거나, 치료 방법의 효능을 모니터링하거나, 생산 및/또는 수합용 유전자 생성물(들) 또는 항체의 수준을 모니터링하는 데 사용할 수 있다.

[0893] 항체 역가 모니터링은 박테리아의 독성을 모니터링하는 데 사용할 수 있다. 박테리아에 대한 항체 역가는 대상체에 박테리아를 투여한 후 기간에 따라 변할 수 있으며, 여기서 일부 특정 시점에서 낮은 항-(박테리아 항원) 항체 역가는 더 낮은 독성을 나타낼 수 있는 반면, 다른 시점에서는 높은 항(박테리아 항원) 항체 역가는 더 높은 독성을 나타낼 수 있다. 본원에 제공된 방법에 사용된 박테리아는 면역원성일 수 있으며, 따라서 대상체에게 박테리아를 투여한 직후에 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 일반적으로 대상체의 면역계가 강한 면역반응을 일으킬 수 있는 면역자극성 박테리아는 대상체의 면역계가 모든 정상 장기나 조직에서 박테리아를 제거할 수 있을 때 독성이 낮은 박테리아일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 대상체에게 박테리아를 투여한 직후에 박테리아 항원에 대한 높은 항체 역가는 박테리아의 낮은 독성을 나타낼 수 있다.

[0894] 다른 구현예에서, 항체 역가를 모니터링하여 치료 방법의 효능을 모니터링할 수 있다. 본원에 제공된 방법에서, 항-(종양 항원) 항체 역가와 같은 항체 역가는 종양 질환을 치료하기 위한 치료 방법과 같은 치료 방법의 효능을 나타낼 수 있다. 본원에 제공된 치료 방법은 종양 및/또는 전이에 대한 면역 반응을 유발하거나 향상시키는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 항(종양 항원) 항체 역가를 모니터링함으로써, 종양 및/또는 전이에 대한 면역 반응을 유발하거나 향상시키는 치료 방법의 효능을 모니터링하는 것이 가능하다.

[0895] 다른 구현예에서, 항체 역가 모니터링은 생산 및/또는 수합을 위한 유전자 생성물(들) 또는 항체의 수준을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 제공된 바와 같이, 방법은 종양, 종양 미세환경 및/또는 종양-체류 면역 세포에 축적된 미생물에서 외인성 유전자를 발현함으로써 단백질, RNA 분자 또는 다른 화합물을 생산하는 데 사용될 수 있다. 단백질, RNA 분자 또는 다른 화합물에 대한 항체 역가를 모니터링하면 종양 축적 미생물에 의한 단백질, RNA 분자 또는 다른 화합물의 생산 수준을 나타낼 수 있으며, 또한 이러한 단백질, RNA 분자 또는 다른 화합물에 특이적인 항체의 수준을 직접 나타낼 수 있다.

[0896] 본원에 제공된 방법은 또한 대상의 건강을 모니터링하는 방법을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 일부는 신생물성 질환 치료 방법을 비롯한 치료 방법이다. 대상체의 건강을 모니터링하는 것은 당업계에 알려진 바와 같이 치료 방법의 효능을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법은 또한 본원에 제공된 바와 같은 면역자극성 박테리아를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 대상체의 건강을 모니터링하는 것은 대상체에 투여된 면역자극성 박테리아의 병원성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 신생물 질환, 감염성 질환, 또는 면역 관련 질환과 같은 질환을 모니터링하기 위한 다양한 건강 진단 방법 중 임의의 것이 당업계에 알려진 바와 같이 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 체중, 혈압, 맥박, 호흡, 색, 온도 또는 대상체의 다른 관찰 가능한 상태

는 대상체의 건강을 나타낼 수 있다. 또한, 대상체의 시료에서 하나 이상의 성분의 존재 또는 부재 또는 수준은 대상체의 건강을 나타낼 수 있다. 전형적인 시료은 혈액 및 소변 시료을 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 구성요소의 존재 또는 부재 또는 수준은 예를 들어 혈액 패널 또는 소변 패널 진단 시험을 수행하여 결정할 수 있다. 대상체의 건강을 나타내는 예시적인 구성요소에는 백혈구 수, 헤마토크릿 및 c-반응성 단백질 농도가 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[0897] 본원에 제공된 방법은 요법을 모니터링하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 치료적 결정은 모니터링의 결과에 기초할 수 있다. 본원에 제공된 치료 방법은 대상체에게 면역자극성 박테리아를 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 박테리아는 종양, 종양 미세환경, 또는 종양-체류 면역 세포 및/또는 전이에 우선적으로 축적될 수 있고, 박테리아는 항종양 면역 반응을 유발하거나 향상시킬 수 있다. 이러한 치료 방법은 특정 면역자극성 박테리아의 다중 투여, 제2 면역자극성 박테리아의 투여, 또는 치료 화합물의 투여를 포함하는 다양한 단계를 포함할 수 있다. 대상체에게 투여할 면역자극성 박테리아 또는 화합물의 양, 시기 또는 유형의 결정은 대상체 모니터링으로부터의 하나 이상의 결과에 기반할 수 있다. 예를 들어, 대상체에서 항체 역가는 면역자극성 박테리아 및 선택적으로 화합물을 투여하는 것이 바람직한지의 여부, 투여할 박테리아 및/또는 화합물의 양, 및 투여할 박테리아의 유형 및/또는 화합물의 유형을 결정하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 예를 들어 낮은 항체 역가는 추가 면역자극성 박테리아, 상이한 면역자극성 박테리아 및/또는 치료 화합물, 예를 들어 박테리아 유전자 발현을 유도하는 화합물, 또는 면역자극성 박테리아와 독립적으로 효과적인 치료 화합물을 투여하는 것이 바람직함을 나타낼 수 있다.

[0898] 또 다른 예에서, 대상체의 전반적인 건강 상태는 면역자극성 박테리아 및 선택적으로 화합물, 투여할 박테리아 및/또는 화합물의 양, 및 투여할 박테리아 및/또는 화합물의 유형을 투여하는 것이 바람직한지의 여부를 결정하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 예를 들어 대상체가 건강한 것으로 결정하는 것은 추가의 박테리아, 상이한 박테리아, 또는 박테리아 유전자/유전자 페이로드/치료 생성물 발현을 유도하는 화합물과 같은 치료 화합물을 투여하는 것이 바람직함을 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 검출 가능한 박테리아-발현 유전자 생성물의 모니터링은 면역자극성 박테리아 및 임의로 화합물, 투여할 박테리아 및/또는 화합물의 양, 및 박테리아의 유형 및/또는 투여할 화합물, 예를 들어 대상이 건강한 것으로 결정하는 것은 추가의 박테리아, 상이한 박테리아, 또는 박테리아 유전자/유전자 페이로드/치료 생성물 발현을 유도하는 화합물과 같은 치료 화합물을 투여하는 것이 바람직함을 나타낼 수 있다. 이러한 모니터링 방법은 치료 방법이 효과적인지 여부, 치료 방법이 대상체에 병원성인지 여부, 박테리아가 종양 또는 전이에 축적되었는지 여부, 박테리아가 정상 조직이나 기관에서 축적되었는지 여부를 결정하는 데 사용할 수 있다. 이러한 결정을 기초로 추가 치료 방법의 바람직함 및 형태를 도출할 수 있다.

[0899] 또 다른 예에서, 모니터링은 면역자극성 박테리아가 종양 또는 대상체의 전이에 축적되었는지 여부를 결정할 수 있다. 이러한 결정에 따라, 추가 박테리아, 상이한 면역자극성 박테리아, 및 선택적으로 화합물을 대상체에게 추가로 투여하기로 결정할 수 있다.

[0900] **J.실시예**

[0901] 하기 실시예는 예시적인 목적을 위해 포함될 뿐이고 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0902] **실시예 1**

[0903] ***에스. 티피무리움*의 영양요구성 균주**

[0904] ***살모넬라* 균주 YS1646은 아데노신에 대해 영양요구성이다**

[0905] 본원에 제공된 균주는 아데노신에 대해 영양요구성이 되도록 조작된다. 그 결과, 정상 조직의 낮은 아데노신 농도에서는 복제할 수 없기 때문에 생체 내에서 약독화되고, 콜로니화는 주로 아데노신 수준이 높은 고형 종양 미세환경(TME)에서 발생한다. 살모넬라 균주 YS1646은 야생형 균주 ATCC 14028의 유도체이며 purI 유전자(purM과 동의어)의 방해로 인해 퓨린에 대한 영양요구성이 되도록 조작되었다(예를 들어, Low *et al.* (2004) *Methods Mol. Med.* 90:47-60). YS1646의 전체 게놈에 대한 후속 분석은 purI 유전자가 실제로 결실된 것이 아니라 염색체 역전(in버전)에 의해 방해되었음을 보여주고(예를 들어, Broadway 등 (2014) J. Biotechnol. 192:177-178 참조), 전체 유전자는 삽입 서열에 의해 플랭킹되는 YS1646 염색체의 두 부분 내에 여전히 포함되어 있으며, 그 중 하나는 활성 트랜스포사제를 갖고 있다. 염색체 재결합에 의해 방해된 purI 유전자의 완전한 유전 서열의 존재는 야생형 유전자로의 복귀 가능성을 열어 둔다. 이전에 YS1646의 퓨린 영양요구성이 시험관 내에서 >140회 연속 계대 후에 안정한 것으로 입증되었지만, 복귀율이 무엇인지는 분명하지 않았다(예를 들어, Clairmont *et*

al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002).

[0906] 아데노신이 제공될 때 균주 YS1646은 최소 배지에서 복제할 수 있는 반면, 야생형 모 균주 ATCC 14028은 아데노신이 보충되지 않은 최소 배지에서 성장할 수 있음이 본원에서 제시된다. 균주 YS1646을 리소젠 브로스(LB) 배지에서 밤새 성장시키고, M9 최소 배지로 세척하고, 아데노신을 함유하지 않거나 증가하는 농도의 아데노신을 함유하는 M9 최소 배지로 희석시켰다. 37℃에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)를 사용하여 OD_{600}을 15분마다 판독하여 성장을 측정하였다.

[0907] 그 결과 모든 농도의 아데노신에서 성장할 수 있었던 야생형 균주(ATCC 14028)와 달리 YS1646 균주는 아데노신이 11 내지 300 마이크로몰 범위의 농도로 제공되었을 때만 복제할 수 있었고 완전히 M9 단독 또는 130 나노몰 아데노신이 보충된 M9에서는 복제할 수 없었다. 이러한 데이터는 purI 돌연변이가 종양 미세환경에서 발견되는 아데노신 농도에서 복제할 수 있지만 정상 조직에서 발견되는 농도에서는 복제할 수 없음을 실증한다. 본원에 예시된 조작된 아데노신 영양요구성 균주는 야생형으로의 복귀를 방지하기 위해 purI 개방 리딩 프레임의 전부 또는 일부가 염색체로부터 결실된 균주를 포함한다. 이러한 유전자 결실은 하기 기재된 바와 같이 람다 레드 시스템을 포함하는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0908] ***살모넬라* 균주 YS1646은 ATP에 대해 영양요구성이다**

[0909] 퓨린과 아데노신 영양요구성 외에 purI-결실된 균주도 ATP를 소거할 수 있는지 여부가 결정되었다. ATP는 죽어가는 종양 세포의 누출로 인해 종양 미세환경에서 높은 수준으로 축적된다. ATP가 제공될 때 균주 YS1646은 최소 배지에서 복제할 수 있지만 ATP가 보충되지 않으면 성장할 수 없다는 것이 여기서 제시된다. 이를 입증하기 위해 균주 YS1646을 LB 배지에서 밤새 성장시키고 M9 최소 배지로 세척하고 ATP를 함유하지 않거나 ATP 농도를 증가시키는 M9 최소 배지로 희석시켰다(Fisher). 37℃에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)를 사용하여 OD_{600}을 15분마다 판독하여 성장을 측정하였다. 결과는 ATP가 0.012 mM의 농도로 제공될 때 균주 YS1646이 복제할 수 있지만 M9 단독에서는 복제할 수 없음을 입증하였다.

[0910] **실시예 2**

[0911] **세포내 복제에서의 결함은 *msbB* 돌연변이에 기인한다**

[0912] YS1646 균주는 고농도의 퓨린, 아데노신 또는 ATP를 포함하는 부위로 복제를 제한하는 purI의 돌연변이와 TLR4-매개 전염증 신호전달을 줄이기 위해 지질다당류(LPS) 표면 코트를 변경하는 msbB의 돌연변이를 포함한다. 또한 야생형 살모넬라와 달리 YS1646 균주는 대식세포에서 복제할 수 없다는 것이 확인되었다. 이러한 유전적 돌연변이 중 어느 것이 야생형 균주 ATCC 14028 내에서 그 표현형을 부여하는 데 책임이 있는지 결정하기 위해 실험이 수행되었다.

[0913] 이 분석에서, 마우스 RAW 대식세포(InvivoGen, San Diego, CA)는 purI, msbB 또는 둘 다에 결실을 포함하는 야생형 살모넬라 균주로 감염되었으며, 세포당 약 5개 박테리아의 감염 다중도(MOI)에서 30분 후, PBS로 세포를 세척하고, 겐타마이신이 함유된 배지를 첨가하여 세포외 박테리아를 사멸시켰다. 세포내 박테리아는 세포막을 통과할 수 없기 때문에 겐타마이신에 의해 죽지 않는다. 감염 후 다양한 시점에서 세포 단층을 물로 삼투압 충격에 의해 용해시키고, 세포 용해물을 희석시키고 LB 한천에 평판배양하여 생존 콜로니 형성 단위(CFU)를 계산하였다.

[0914] 아래 표에 나타난 바와 같이, purI-돌연변이만을 포함하는 야생형 살모넬라 균주는 여전히 복제할 수 있었다. 이는 종양 미세환경에 대한 높은 수준의 특이성을 달성하면서 purI 결실 단독으로 관찰된 내약성의 개선이 미미한 이유를 설명한다. *msbB*$^-$ 돌연변이만 포함하는 균주와 *purI*$^-$ 및 *msbB*$^-$ 돌연변이를 포함하는 균주는 복제할 수 없었고 48시간 이내에 세포에서 빠르게 제거되었다.

[0915]

시간	CFU/웰					
	ATCC 14028 Δ*purI*		ATCC 14028 Δ*purI*/Δ*msbB*		ATCC 14028 Δ*msbB*	
1	104000	108000	68000	68000	88000	40000
2.5	5600	6000	760	960	3200	3200
5	5600	4000	1120	880	800	680
27	11200	5600	4	4	20	4

[0916] **실시예 3**

[0917] ***살모넬라 asd* 유전자 넉아웃 균주 조작 및 특징화**

[0918] 균주 YS1646△asd를 준비하였다. 이는 asd 유전자가 결실되도록 조작된 YS1646 균주(ATCC에서 구입할 수 있음, 카탈로그 번호 202165)에서 유래된 약독화된 *살모넬라 티피무리움* 균주이다. 이 예에서 *살모넬라 티피무리움* 균주 YS1646△asd는 아래에 설명된 대로 Datsenko와 Wanner(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6640-6645 (2000)) 방법의 변형을 사용하여 조작되었다.

[0919] **람다 레드 헬퍼 플라스미드를 균주 YS1646에 도입**

[0920] YS1646 균주는 LB에서 배양물을 성장시키고 100배로 농축한 다음, 얼음처럼 차가운 10% 글리세롤로 3회 세척함으로써 이전에 기재된 바와 같이(Sambrook J. (1998) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory) 전기적격(electrocompetent)이 되도록 준비하였다. 전기적격 균주를 2.5 kV, 186 ohm 및 50 μF 설정에서 0.2 cm 갭 큐벳을 사용하여 람다 레드 헬퍼 플라스미드 pKD46(SEQ ID NO: 218)으로 전기천공하였다. pKD46을 운반하는 형질전환체를 30℃에서 앰피실린 및 1 mM L-아라비노스를 함유한 5 mL SOC 배지에서 성장시키고, 앰피실린을 함유하는 LB 한천 플레이트에서 선택하였다. 그 후에, 람다 레드 헬퍼 플라스미드 pKD46을 함유하는 YS1646 클론을 균주 YS1646에 대해 상기 기재된 바와 같이 전기적격으로 만들었다.

[0921] ***asd* 유전자 넉아웃 카세트의 작제**

[0922] 균주 YS1646의 게놈으로부터의 asd 유전자(Broadway 등 (2014) J. Biotechnology 192:177-178)는 asd 유전자 넉아웃 카세트를 설계하는데 사용되었다. asd 유전자의 좌측 및 우측 영역에 각각 상동성의 204 및 203 염기쌍(bp)을 포함하는 플라스미드를 DH5-알파 적격 세포(Thermo Fisher Scientific)로 형질전환시켰다. loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 이 플라스미드에 클로닝하였다. 그 다음 asd 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 asd-1 및 asd-2를 사용하여 PCR 증폭하고(표 1 참조), 겔 정제하였다.

[0923] ***asd* 유전자 제거**

[0924] 플라스미드 pKD46을 보유하는 YS1646 균주를 겔-정제된 선형 asd 유전자 넉아웃 카세트로 전기천공하였다. 전기천공된 세포를 SOC 배지에서 회수하고 카나마이신(20 μg/mL) 및 디아미노피멜산(DAP, 50 μg/mL)이 보충된 LB 한천 플레이트에 평판배양하였다. 이 단계 동안, 람다 레드 재조합효소는 kan 카세트와 염색체 asd 유전자의 상동 재조합을 유도하고(염색체 asd 유전자의 업스트림 및 다운스트림에 상동 플랭킹 서열의 존재로 인해), asd 유전자의 염색체 사본의 넉아웃이 발생한다. 선택된 카나마이신 내성 클론에서 방해된 asd 유전자의 존재는 방해 부위(프라이머 asd-3)를 플랭킹하는 YS1646 게놈의 프라이머와 다중 클로닝 부위(프라이머 scFv-3)를 사용하여 PCR 증폭에 의해 확인되었다(표 1 참조). 콜로니는 또한 DAP 영양요구성을 입증하기 위해 보충 DAP가 있거나 없는 LB 플레이트에 복제 평판배양되었다. asd 유전자가 결실된 모든 클론은 보충 DAP가 없는 상태에서 성장할 수 없었고, 이는 DAP 영양요구성을 실증한다.

표 1. 프라이머 정보

프라이머 명칭	프라이머 서열	SEQ ID NO.
asd-1	ccttcctaacgcaaattccctg	219
asd-2	ccaatgctctgcttaactcctg	220
asd-3	gcctcgccatgtttcagtacg	221
asd-4	ggtctggtgcattccgagtac	222
scFv-3	cataatctgggtccttggtctgc	223
APR-001	aaaaaagcttgcagctctggcccgtg	226
APR-002	aaaaaagcttttagaaaaactcatcgagcatcaaatga	227
APR-003	acactagaaggacagtatttggtatctg	228
APR-004	agccgtagttaggccacc	229
flic-1	cgttatcggcaatctggaggc	232
flic-2	ccagcccttacaacagtggtc	233
flic-3	gtctgtcaacaactggtctaacgg	234
flic-4	agacggtcctcatccagataagg	235
fljb-1	ttccagacgacaagagtatcgc	236
fljb-2	cctttaggtttatccgaagccagaatc	237
fljb-3	caccaggtttttcacgctgc	238
fljb-4	acacgcatttacgcctgtcg	239
pagp-1	gcgtgacggttctgagtgct	315
pagp-2	cgtctttgctgccatcttccg	316
pagp-3	acaataacgacgactccgataagg	317
pagp-4	ctgctgaatgtgctgattaacctg	318
ansb-1	accttagaagatagccgcaaagc	319
ansb-2	cagagacatgacacccacgattatc	320
ansb-3	gcaaaccgctatccagaacga	321
ansb-4	agtttaagtatgccgtggtactgc	322
csgd-1	cacttgctttaagatttgtaatggctag	323
csgd-2	ggtgtattcgctttcccatttgtc	324
csgd-3	tgtgctgtccaggttaatgcc	325
csgd-4	gacgacggttttctcgaagtctc	326

[0925]

[0926] **카나마이신 유전자 카세트 제거**

[0927] kan 선택 마커는 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 시스템을 사용하여 제거되었다. YS1646△asd 유전자 Kan^R 돌연변이체를 Cre 재조합효소를 발현하는 온도 민감성 플라스미드인 pJW168(SEQ ID NO: 224)로 형질전환시켰다. Amp^R 콜로니는 30℃에서 선택되었고; pJW168은 이후 42℃에서 성장에 의해 제거되었다. 선택된 클론은 카나마이신이 있거나 없는 LB 한천 플레이트에 복제 평판배양하여 kan 손실에 대해 시험하고 방해 부위를 플랭킹하는 YS1646 게놈의 프라이머를 사용하여 PCR 검증으로 확인하였다(프라이머 asd-3 및 asd-4; 프라이머 서열의 경우, 표 1 참조).

[0928] **기능적 asd 결실 돌연변이체 균주 YS1646Δasd의 확인(AST-101로도 표기됨)**

[0929] Δasd 돌연변이는 37℃에서 LB 한천 플레이트에서 성장할 수 없었지만 50 μg/mL 디아미노피멜산(DAP)을 포함하는 LB 플레이트에서는 성장할 수 있었다. Δasd 돌연변이 성장 속도는 LB 액체 배지에서 평가되었으며; 이는 액체 LB에서 성장할 수 없었지만 600 nM에서 흡광도를 측정하여 결정된 바와 같이 50 μg/mL DAP가 보충된 LB에서 성장할 수 있었다.

[0930] **asd 유전자 결실 후 균주 YS1646Δasd에서 asd 좌위 서열의 서열 확인**

[0931] asd 유전자 결실 균주는 프라이머 asd-3 및 asd-4를 사용하여 DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다(표 1 참조). asd 좌위를 플랭킹하는 영역의 시퀀싱을 수행하였고, 그 서열은 asd 유전자가 YS1646 염색체에서 결실된 것을 확인하였다.

[0932] **플라스미드로부터 asd 발현에 의한 asd 결실의 보완**

[0933] 플라스미드 pATIU6(SEQ ID NO: 225)을 화학적으로 합성하고 조립하였다. 플라스미드는 하기와 같은 특징을 포함하였다: 고 복제수(pUC19) 복제 원점, 짧은 헤어핀의 발현을 유도하기 위한 U6 프로모터, 후속 제거를 위한 HindIII 제한 부위에 의해 플랭킹된 앰피실린 내성 유전자, 개시 코돈의 업스트림에서 85개의 염기쌍의 서열을 포함하는 asd 유전자(SEQ ID NO: 246). 이 벡터에 뮤린 TREX1을 표적화하는 shRNA는 SpeI 및 XhoI를 사용한 제한 소화 및 *이. 콜라이* DH5-알파 세포로의 리게이션 및 클로닝에 의해 도입되었다. 생성된 플라스미드를 pATI-shTREX1로 지정하였다.

[0934] **면역자극성 박테리아 균주로 플라스미드의 전기천공**

[0935] 면역자극성 단백질 및 기능성 asd 유전자를 인코딩하는 발현 카세트를 함유하는 선택된 플라스미드를 0.2 cm 갭 큐벳(BTX, San Diego, CA)을 사용하고 하기 설정에서 BTX® ECM600 전기천공기로 asd 유전자가 결여된 *에스. 티피무리움* 균주에 전기천공하였다: 2.5 kV, 186 ohm 및 50 μF. 전기천공된 세포를 50 μM 디아미노피멜산(DAP)이 보충된 1 mL SOC에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양한 다음 DAP가 포함되지 않은 한천 플레이트에 펼쳐 기능적 asd 유전자가 있는 플라스미드를 받은 균주를 선택하였다. 단일 콜로니 분리 후, 멸균 리소제니 브로스(LB) 플라스크에 *에스. 티피무리움*의 단일 웰 분리 콜로니를 접종하고 250 RPM에서 교반하면서 37℃에서 배양하여 세포 은행을 생성하였다. 배양물을 정지기으로 성장시킨 후, 박테리아를 10% 글리세롤을 함유하는 PBS로 세척하고, -60℃ 미만에서 동결된 분취액에 저장하였다.

[0936] 플라스미드 pATI-shTREX1을 이. 콜라이에서 증폭하고 LB Amp 플레이트에서 전기천공 및 클론 선택에 의해 YS1646△asd 균주로의 형질전환을 위해 정제하여 균주 YS1646△asd-shTREX1을 생성하였다. pATIU6 유래 플라스미드로 보완된 YS1646△asd 돌연변이체는 DAP가 없는 LB 한천 및 액체 배지에서 성장할 수 있었다.

[0937] 후속 반복에서 pATI-shTREX1의 앰피실린 내성 유전자(Amp^R)는 카나마이신 내성 유전자로 대체되었다. 이는 HindIII로 pATI-shTREX1 플라스미드를 분해한 다음 Amp^R 유전자를 제거하기 위한 겔 정제에 의해 달성되었다. 카나마이신 내성(Kan^R) 유전자를 프라이머 APR-001 및 APR-002(각각 SEQ ID NO: 226 및 SEQ ID NO: 227)를 사용한 PCR에 의해 증폭한 후, HindIII로 분해하고, 정제된 겔로의 리게이션하고, pATIU6 플라스미드로 분해하였다.

[0938] 후속 반복에서 Q5® 부위-특정 돌연변이형성 키트(New England Biolabs) 및 프라이머 APR-003(SEQ ID NO: 228) 및 APR-004(SEQ ID NO: 229)를 사용하여 pUC19 복제 원점에서 pATIKan 플라스미드에 단일 점 돌연변이를 도입하여, 위치 148의 뉴클레오타이드 T를 C로 변화시켰다. 이러한 돌연변이는 pBR322 복제 원점과 상동성인 복제 원점을 만들고, 이는 저 복제수 복제 원점이며, 이로써, 플라스미드 복제수를 감소시킨다.

[0939] **asd 보체 시스템을 사용하여 생체 내에서 입증된 플라스미드 유지 관리**

[0940] 이 실시예에서, CT26 종양 보유 마우스는 TREX1을 표적화하는 shRNA(YS1646-shTREX1)를 발현하는 플라스미드를 포함하는 균주 YS1646, 또는 기능성 asd 유전자 및 TREX1을 표적화하는 shRNA(YS1646△asd-shTREX1)를 갖는 플라스미드를 함유하는 YS1646의 asd-결실 균주로 치료하였다.

[0941] CT26(대장 종양 #26)은 BALB/c 마우스를 N-니트로-N-메틸우레탄(NMU)에 노출시켜 발생하는 종양 모델로, 공격적이고 미분화된 체크포인트 불응성 인간 결장직장 암종을 재현하는 고도의 전이성 암종을 유발한다(예를 들어, Castle 등 (2014) BMC Genomics 15(1):190 참조). 결장에 동소적으로 이식하는 것과 대조적으로 옆구리에 피하 이식할 때 종양 면역표현형은 훨씬 더 면역억제적이고 체크포인트 불응성이다. T-세포 침윤이 크게 부족하지만 종양은 대식세포 및 골수 유래 억제 세포(MDSC)와 같은 골수성 세포가 풍부하다(예를 들어, Zhao 등 (2017) Oncotarget 8(33):54775-54787 참조). 이 모델은 인간 미세위성 안정(MSS) 결장직장암과 더 유사하기 때문에 본원에 제공된 치료 접근법을 평가하는 이상적인 모델이다.

[0942] 이 실험을 위해 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(군당 3마리)에 CT26(ATCC에서 구입) 종양 세포(100 μL PBS에 $2x10^5$ 세포)를 우측 옆구리에 피하(SC) 접종하였다. 8일된 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 8, 15 및 23일에 YS1646△asd-shTREX1 균주 또는 모(부모) YS1646-shTREX1 균주의 5 x 10^6 CFU를 3회 정맥내(IV) 주사하였다. 플라스미드는 예시적인 치료제로서 shTREX1을 인코딩하고; 임의의 다른 원하는 치료 생성물 또는 생성물들로 치환될 수 있다.

[0943] 체중 및 종양을 매주 2회 측정하였다. 전자 캘리퍼스(Fowler, Newton, MA)를 사용하여 종양 측정을 수행하였다. 종양 부피는 변형된 타원체 공식, 1/2(길이 × 너비^2)을 사용하여 계산되었다. IACUC 규정에 따라 종양 크기가 체중의 >20%에 도달하거나 괴사가 되면 마우스를 안락사시켰다.

[0944] 최종 살모넬라 주사 후 12일에 종양을 균질화하고 균질액을 연속 희석하여 LB 한천 플레이트에 평판배양하여, 존재하는 콜로니 형성 단위(CFU)의 총 수를 열거하거나 카나마이신을 포함하는 LB 플레이트에서 카나마이신 내성 콜로니의 수를 열거하였다.

[0945] 결과는 *에스. 티피무리움* 균주 YS1646-shTREX1이 shRNA 플라스미드를 유지하기 위한 선택적 압력을 갖지 않았으며 카나마이신 내성(Kan^R) 콜로니의 백분율이 10% 미만이었기 때문에 상당한 플라스미드 손실을 입증했음을 입증하였다. 플라스미드 유지를 위해 asd 유전자 보체 시스템을 사용한 균주인 YS1646△asd-shTREX1은 거의 동일한 수의 카나마이신 내성 및 카나마이신 민감성 CFU를 가졌다. 이러한 데이터는 asd 유전자 보체 시스템이 마우스의 종양 미세환경과 관련하여 플라스미드를 유지하기에 충분하다는 것을 보여준다.

[0946] ***asd* 보체 시스템을 사용한 증강된 항종양 효능**

[0947] asd 보체 시스템은 플라스미드 손실을 방지하고 생체내 *에스. 티피무리움* 균주에 의한 치료 생성물 전달의 항종양 효능을 강화하도록 설계된다. 이를 시험하기 위해 shTREX1 플라스미드(YS1646△asd-shTREX1)를 포함하는 YS1646△asd 균주 또는 기능성 asd 유전자 카세트를 포함하는 스크램블 대조군(YS1646△asd-shSCR)을 뮤린 결장암종 모델에서 asd 유전자 카세트가 결여되어 플라스미드 유지 기전이 없는 플라스미드인 플라스미드 pEQU6-shTREX1(YS1646-shTREX1)을 포함하는 균주 YS1646과 항종양 효능에 대해 비교하였다. shTREX1은 예시적인 치료제이다.

[0948] 이 실험을 위해, 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(군당 8마리 마우스)에 CT26 세포(100 μL PBS에서 2x10^5 세포)로 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 8일째와 18일째에 5x10^6 CFU의 YS1646△asd-shTREX1 또는 YS1646-shTREX1을 두 번 IV 주사하고, PBS 대조군과 비교하였다.

[0949] YS1646-shTREX1 균주는 시간 경과에 따른 플라스미드 손실이 입증되었음에도 불구하고 PBS(70% 종양 성장 저해(TGI), 28일째)와 비교하여 향상된 종양 제어를 입증하였다. asd 유전자 보체 시스템과 shTREX1(YS1646△asd-shTREX1)이 있는 플라스미드를 포함하는 Δasd 균주는 PBS(82% TGI, p = 0.002, 25일째)와 비교하여 우수한 종양 성장 저해를 보여주었다. 이러한 데이터는 asd 유전자 보체 시스템이 없는 플라스미드를 포함하는 YS1646과 비교하여 asd 보체 시스템을 사용하여 플라스미드 손실을 방지하고 shTREX1을 전달함으로써 개선된 효능이 달성된다는 것을 보여준다. 따라서, asd 보체 시스템을 가진 균주는 우수한 항암 치료제이다.

[0950] **실시예 4**

[0951] ***fliC* 및 *fljB* 유전자의 결실에 의한 *에스. 티피무리움* 플라젤린 넉아웃**

[0952] **균주 조작 및 특징화**

[0953] 본원의 실시예에서, asd 유전자 결실을 함유하는 약독화된 생 *에스. 티피무리움* YS1646 균주는 두 플라젤린 하위단위를 제거하기 위해 fliC 및 fljB 유전자를 결실시키도록 추가로 조작되었다. 이는 전염증 신호를 줄이고 항종양 적응 면역력을 개선하기 위해 전염증 TLR5 활성화를 제거한다.

[0954] ***fliC* 유전자의 결실**

[0955] 이 예에서, *fliC*는 이전 예에서 자세히 설명된 바와 같이 Datsenko 및 Wanner(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6640-6645 (2000)) 방법의 변형을 사용하여 YS1646Δasd 균주의 염색체에서 결실되었다. 간단히 말해서, fliC 유전자를 플랭킹하는 상동 서열의 224개 및 245개 염기를 함유하는 합성 fliC 유전자 상동성 아암 서열을 pSL0147(SEQ ID NO: 230)이라고 하는 플라스미드에 클로닝하였다. 그 후에, cre/loxP 부위가 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 플라스미드 pSL0147에 클로닝하고, fliC 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 flic-1(SEQ ID NO: 232) 및 flic-2(SEQ ID NO: 233)로 PCR 증폭한 다음, 겔 정제한 다음, 전기천공법에 의해 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 운반하는 YS1646Δasd 균주에 도입하였다. 전기천공된 세포를 SOC + DAP 배지에서 회수하고, 카나마이신(20 μg/mL) 및 디아미노피멜산(DAP, 50 μg/mL)이 보충된 LB 한천 플레이트에 평판배양하였다. 콜로니를 선택하고 프라이머 flic-3(SEQ ID NO: 234) 및 flic-4(SEQ ID NO: 235)를 사용한 PCR에 의해 넉아웃 단편의 삽입에 대해 스크리닝하였다. 그 후에, pKD46은 선택된 카나마이신 내성 균주를 42℃에

서 배양하고 앰피실린 내성 손실을 스크리닝하여 경화되었다. 그 후에, 카나마이신 내성 마커는 Cre 재조합효소(pJW168)를 발현하는 온도 민감성 플라스미드의 전기천공에 의해 경화되었고, Amp^R 콜로니는 30℃에서 선택되었으며; pJW168은 이후에 42℃에서 배양물을 성장시킴으로써 제거되었다. 선택된 fliC 넉아웃 클론은 방해 부위(flic-3 및 flic-4)를 플랭킹하는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 카나마이신 마커의 손실에 대해 시험하고 아가로스 겔에서 전기영동 이동성을 평가하였다.

[0956] ***fljB* 유전자의 결실**

[0957] fljB 유전자는 상기 기재된 방법의 변형을 사용하여 YS1646ΔasdΔfliC 균주에서 결실되었다. fljB 유전자를 플랭킹하는 각각 249개 및 213개 염기의 좌측 및 우측 서열을 함유하는 합성 fljB 유전자 상동성 아암 서열을 합성하고 pSL0148(SEQ ID NO: 231)이라고 하는 플라스미드에 클로닝하였다. 그 후에, cre/loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 pSL0148에 클로닝하고 fljB 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 fljb-1(SEQ ID NO: 236) 및 fljb-2(SEQ ID NO: 237)로 PCR 증폭하였다(표 1 참조). 겔 정제되고 전기천공에 의해 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 보유하는 균주 YS1646ΔasdΔfliC에 도입되었다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자는 상기 기재된 대로 Cre-매개 재조합에 의해 경화되었고 온도 민감성 플라스미드는 비허용 온도에서 성장에 의해 경화되었다. fliC 및 fljB 유전자 넉아웃 서열은 각각 프라이머 flic-3 및 flic-4, 또는 fljb-3(SEQ ID NO: 238) 및 fljb-4(SEQ ID NO: 239)를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었고; DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. 균주 YS1646의 이러한 돌연변이 유도체는 YS1646ΔasdΔfliCΔfljB, 또는 줄여서 YS1646ΔasdΔFLG로 지정되었다.

[0958] **조작된 *에스. 티피무리움* 플라젤린 넉아웃 균주의 시험관내 특성화**

[0959] fliC 및 fljB 모두의 결실을 보유하는 YS1646 유래 asd^- 돌연변이체 균주(본원에서 YS1646ΔasdΔFLG로 지칭됨)는 수영 플레이트(0.3% 한천 및 50 mg/mL DAP를 함유하는 LB)에 10 마이크로리터의 밤새 배양물을 스포팅함으로써 수영 운동성에 대해 평가되었다. 운동성은 YS1646Δasd 균주에서 관찰되었지만 YS1646ΔasdΔFLG 균주에서는 운동성이 분명하지 않았다. 그 후에, YS1646ΔasdΔFLG 균주를 asd 유전자를 함유하는 플라스미드로 전기천공하고, DAP 부재하에서의 성장률을 평가하였다. asd 보완 플라스미드가 있는 YS1646ΔasdΔFLG 균주는 보충 DAP 없이 LB에서 복제할 수 있었고 asd 보완 플라스미드를 포함하는 YS1646Δasd 균주에 필적하는 속도로 성장하였다. 이 데이터는 플라젤린의 제거가 시험관 내 *에스. 티피무리움*의 적합성을 감소시키지 않는다는 것을 보여준다.

[0960] **편모를 제거하면 쥐 대식세포에서 파이로토시스가 감소한다**

[0961] $5x10^5$ 마우스 RAW 대식세포(InvivoGen, San Diego, CA)를 겐타마이신 보호 분석에서 약 100의 MOI에서 YS1646ΔasdΔFLG 균주 또는 모 YS1646Δasd 균주로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 배양 상층액을 수집하고 Pierce™ LDH 세포독성 분석 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 대식세포 세포 사멸의 마커로서 젖산 탈수소효소 방출에 대해 평가하였다. YS1646Δasd 균주는 최대 75%의 LDH 방출을 유도한 반면, YS1646ΔasdΔFLG 균주는 최대 54%의 LDH 방출을 유도하여 플라젤린 유전자의 결실이 감염된 대식세포의 *에스. 티피무리움*에 의해 유발된 파이롭토시스를 감소시킨다는 것을 입증하였다.

[0962] **편모-결실된 돌연변이체는 감염된 인간 단핵구에서 파이롭토시스 감소로 이어진다**

[0963] YS1646ΔasdΔFLG 균주가 대식세포에서 세포사를 일으키는 능력이 감소되었음을 입증하기 위해 THP-1 인간 대식세포(ATCC 카탈로그 번호 202165)를 *에스. 티피무리움* 균주 YS1646 및 YS1646ΔasdΔFLG로 감염시켰으며, Δasd 균주는 플라스미드 유지를 보장하기 위해 기능성 asd 유전자를 인코딩하는 플라스미드를 포함한다. $5x10^4$ 세포를 DMEM 및 10% FBS가 있는 96웰 접시에 넣었다. 세척된 *에스. 티피무리움*의 대수기로 세포당 100 CFU의 MOI로 세포를 1시간 동안 감염시킨 후, PBS로 세포를 세척하고, 배지를, 세포외 박테리아를 사멸시키기 위해 50 μg/mL 겐타마이신 및 단핵구를 대식세포 표현형으로 전환시키기 위한 50 ng/mL의 IFNγ가 포함된 배지로 대체하였다. 24시간 후, THP-1 세포를 CellTiter-Glo® 시약(Promega)으로 염색하고, SpectraMax® M3 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 발광 세포 생존력 분석을 사용하여 생존 세포의 백분율을 결정하여 발광성을 정량화하였다. YS1646 균주에 감염된 세포는 생존율이 38%에 불과한 반면, YS1646ΔasdΔFLG 균주에 감염된 세포는 51%의 생존율을 나타내, 플라젤린 유전자의 결실이 매우 높고 초생리학적 MOI임에도 불구하고 인간 대식세포의 세포 사멸을 덜 유도함을 나타낸다.

[0964] **전신 투여 후 종양 콜로니화에는 편모가 필요하지 않다**

[0965] 결장 암종의 뮤린 모델에서 투여된 플라젤린 넉아웃 균주의 영향을 평가하기 위해 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(군당 5마리)에 CT26 세포(100 μL PBS 중 $2x10^5$ 세포)로 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 10일 동안 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 단일 용량의 3×10^5 CFU의 YS1646ΔasdΔFLG-shTREX1 균주 또는 모 YS1646Δasd-shTREX1 균주를 IV 주사하였다. 종양 이식 후 35일째에, 마우스를 안락사시키고, 종양을 균질화하고 LB 플레이트에 평판배양하여 종양 조직 그램당 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 계산하였다. YS1646Δasd-shTREX1 균주는 종양 조직 그램당 평균 $5.9 x10^7$ CFU로 종양을 콜로니화한 반면, 편모-결실된 YS1646ΔasdΔFLG-shTREX1 균주는 평균 1.1×10^8 CFU/g 종양 조직의 거의 2배 증가로 종양을 콜로니화하였다. YS1646Δasd-shTREX1 균주의 비장 콜로니화는 비장 조직의 1.5×10^3 CFU/g의 평균으로 계산된 반면 편모가 결실된 YS1646ΔasdΔFLG-shTREX1 균주의 비장 콜로니화는 평균 1.2×10^3 CFU/g 비장 조직으로 약간 더 낮았다.

[0966] 이러한 데이터는 편모의 부재가 IV 투여 후 종양 콜로니화에 부정적인 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 편모-온전한 균주와 비교하여 종양 콜로니화를 향상시킨다는 것을 실증한다. 중요하게도, 편모의 결실은 비장 콜로니화를 약간 감소시켜 100,000배의 종양 대 비장 비율을 제공한다. 이러한 데이터는 당업계의 예상과 달리 편모가 종양 콜로니화에 필요하지 않을 뿐만 아니라 그들의 제거가 비장 콜로니화를 감소시키면서 종양 콜로니화를 향상시킨다는 것을 실증한다.

[0967] **편모-결실된 균주는 마우스에서 향상된 항종양 활성을 보여준다**

[0968] 결장암의 뮤린 모델에서 투여된 플라젤린 넉아웃 균주의 영향을 평가하기 위해 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(군당 5마리)에 CT26 세포($2x10^5$ 세포 100 μL PBS)를 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 단일 용량 $3 x10^5$ CFU의 YS1646ΔasdΔFLG-shTREX1 균주 또는 YS1646Δasd-shTREX1 균주를 IV 주사하고 PBS 대조군과 비교하였다. 종양 성장에 대한 캘리퍼스 측정에 의해 마우스를 모니터링하였다.

[0969] 결과는 편모를 만들 수 없는 YS1646ΔasdΔFLG-shTREX1 균주가 모 YS1646Δasd-shTREX1 균주(27% TGI, 24일)와 비교하여 향상된 종양 조절을 보였고 PBS 대조군(73% TGI, $p = 0.04$, 24일째)과 비교하여 유의한 종양 대조군이었다. 이러한 데이터는 편모가 종양 콜로니화에 필요하지 않을 뿐만 아니라 그 손실이 항종양 효능을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

[0970] **편모-결실된 균주는 뮤린 종양 모델에서 향상된 적응 면역력을 실증한다**

[0971] 면역 반응에 대한 플라젤린의 결실의 영향과 shRNA의 종양 골수성 세포 전달에서 STING 체크포인트 유전자 TREX1로의 STING 활성화가 적응형 유형 I IFN 면역 신호를 촉진하는지 여부를 평가하였다. 결장암의 CT26 뮤린 모델이 사용되었으며, 여기서 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(군당 5마리 마우스)에 CT26 세포(100 μL PBS에서 $2x10^5$ 세포)로 우측 옆구리에 SC를 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 YS1646ΔasdΔFLG-shTREX1 균주, 또는 모 YS1646Δasd-shTREX1 또는 스크램블된 플라스미드 대조군 균주 YS1646Δasd-sh의 $5 x10^6$ CFU를 종양 이식 후 11일에 IV 주사하고 PBS 대조군과 비교하였다. 소듐 헤파린 코팅된 튜브(Becton Dickinson)에서 투여 후 7일째에 마우스를 채혈하였다. 그 후에, 응고되지 않은 혈액을 동일한 부피의 PBS에 희석시키고 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 Lympholyte®-M 세포 분리 시약(Cedarlane)을 사용하여 전혈의 간기 층으로부터 분리하였다. 단리된 PBMC를 실온에서 3분 동안 1300 RPM에서 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 세척하고, 유동 완충액에 재현탁시켰다. V-바닥 96웰 플레이트의 웰당 100만 개의 PBMC를 시딩하였다. 세포를 실온(RT)에서 3분 동안 1300 RPM에서 원심분리하고 형광색소 결합 AH1 펩타이드:MHC 부류 I 사량체(MBL International) 및 세포 표면 유세포분석 항체 CD4 FITC 클론 RM4-5; CD8a BV421 클론 53-6.7; F4/80 APC 클론 BM8; CD11b PE-Cy7 클론 M1/70; CD45 BV570 클론 30-F11; CD3 PE 클론 145-2C11; Ly6C BV785 클론 HK1.4; I-A/I-E APC-Cy7 클론 M5/114.15.2; Ly6G BV605 클론 1A8; 및 CD24 PercP-Cy5.5 클론 M1/69(모두 BioLegend로부터)를 포함하는 100 μL의 유동 완충액에 실온 및 암실에서 45분 동안 재현탁하였다. 45분 후, 세포를 1200 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 두 번 세척하였다. 그 후에, 세포를 PBS + DAPI(4',6-디아미노-2-페닐인돌; 사멸/생존 염색)를 함유하는 PBS에 재현탁하고 NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.) 및 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[0972] 다음 세포 유형이 총 살아있는 세포의 백분율로 열거되었다: $CD11b^+$ $Gr1^+$ 호중구(생체외 기능 분석에서 추가 표현형 분석이 필요할지라도 MDSC일 수 있음), $CD11b^+$ $F4/80^+$ 대식세포, $CD8^+$ T-세포, 및 뮤린 백혈병 바이러스(MuLV) 관련 세포 표면 항원의 외피 유전자의 생성물인 CT26 종양 거부 항원 gp70(AH1)을 인식하는 $CD8^+$ T-세포(예를 들어, Castle 등 (2014) BMC Genomics 15(1) :190).

[0973] 아래 표에 요약된 결과는 비특이적 스크램블된 shRNA를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 YS1646Δasd-shSCR 균주가 PBS, 편모-무손상 YS1646Δasd-shTREX1 균주(p = 0.02) 및 편모-결실된 균주 YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1(p = 0.01)와 비교하여 유의하게 증가된 호중구의 전형적인 항박테리아 면역 프로파일을 이끌어냄을 보여주고(p = 0.02), 이는 순환 호중구 수준이 가장 낮았다. 유사하게는, 박테리아로 유도된 대식세포는 PBS(p = 0.01), YS1646Δasd-shTREX1 균주(p = 0.01) 및 YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 균주(p = 0.01)와 비교하여 YS1646Δasd-shSCR 균주에서 상당히 증가되었다. 따라서 유형 I IFN 유도 페이로드를 운반하는 두 균주는 호중구와 대식세포를 통해 박테리아 감염을 제거하고 적응 T-세포-매개 면역을 유도하지 않는 정상적인 항박테리아 면역 반응을 덮어쓸 수 있었다. 그러나 CD8+ T-세포의 전체 순환 수준은 모든 군에서 유사하였으나 편모가 결실된 YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 균주는 PBS와 비교하여 AH1-사량체+ CD8+ T-세포의 백분율이 유의하게 증가한 것으로 나타났다(p = 0.04).

[0974] 이러한 데이터는 바이러스와 같은 유형 I IFN 유도 플라스미드를 종양-체류 골수성 세포에 전달하도록 박테리아를 조작하는 가능성을 보여준다. 이는 더 많은 바이러스와 더 적은 박테리아의 면역 프로파일에 대한 면역 반응의 극적인 재프로그래밍을 초래한다. 편모의 결실은 박테리아가 모집한 호중구 및 대식세포로부터 상당히 증가된 종양 항원 특이적 CD8+ T-세포로의 이동을 더욱 강화하였다. 따라서 박테리아 TLR5-매개 염증을 제거하면 적응 면역력이 향상될 수 있다.

면역 세포	살아 있는 세포의 % 평균 ± SD			
	PBS	YS1646Δ*asd*-shSCR	YS1646Δ*asd*-shTREX1	YS1646Δ*asd*/ΔFLG-shTREX1
호중구	6.27 ± 2.62	19.21 ± 9.46	5.87 ± 3.94	4.01 ± 1.65
대식세포	10.08 ± 2.11	23.14 ± 9.04	9.12 ± 3.84	7.39 ± 2.11
$CD8^+$ T-세포	6.64 ± 0.56	7.17 ± 0.60	7.14 ± 2.30	6.44 + 1.43
$AH1^+$ $CD8^+$ T-세포	0.83 ± 0.12	1.06 ± 1.11	2.27 ± 1.44	4.12 ± 3.08

[0975] SD = 표준 편차

[0976] **편모-결실된 균주는 생체내에서 포식 골수성 면역 세포 구획으로 제한된다**

[0977] 문헌에 따르면, ΔfljB/ΔfliC 균주는 SPI-1 매개된 비-식세포 세포로의 진입과 관련된 많은 다운스트림 유전자의 억제를 보여준다. YS1646Δasd/ΔFLG 균주가 또한 비-식세포 세포 흡수에 대해 결핍되었는지 여부를 결정하기 위해, 박테리아 rpsM 프로모터 하에 mCherry(적색 형광 단백질)를 항시적으로 발현하는 YS1646Δasd/ΔFLG 균주를 MC38 피하 옆구리 종양 보유 마우스에게 IV 투여하였다.

[0978] MC38(뮤린 결장 선암종 #38) 모델은 돌연변이유발을 사용하지만 디메틸히드랄라진과 C57BL/6 마우스 균주를 사용하여 CT26 모델과 유사하게 유도되었다(예를 들어, Corbett 등 (1975) Cancer Res. 35(9) 참조):2434-2439). CT26과 유사하게는, 피하 이식은 결장에 동소 이식될 때보다 더 많은 T-세포 배제 및 면역억제성 종양 미세환경을 초래한다(예를 들어, Zhao 등 (2017) Oncotarget 8(33):54775-54787 참조). MC38은 CT26보다 돌연변이 부담이 높고 CD8+ T-세포에서 검출할 수 있는 유사한 바이러스 유래 gp70 항원(p15E)이 있지만 거부 항원으로 간주되지는 않는다. MC38의 변이체가 체크포인트 요법에 부분적으로 반응하는 것으로 밝혀졌지만, 세포주의 대부분의 변이체는 체크포인트 불응성으로 간주되고 T-세포는 여기에 사용된 MC38 세포를 포함하여 제외된다(예를 들어, Mariathasan 등 (2018) Nature 555:544-548 참조).

[0979] 이 실험을 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)의 우측 옆구리에 MC38 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$ 세포)를 SC 접종하였다. 큰 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 $1x10^6$ CFU의 YS1646Δasd/ΔFLG-mCherry 균주를

34일째에 IV 주사하였다. 종양을 IV 투여 후 7일째에 절제하고, 2.5 mL 효소 혼합물(1 mg/mL 콜라게나제 IV 및 20 μg/mL DNase I가 포함된 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640)으로 채워진 gentleMACS™ C 튜브(Miltenyi Biotec)로 2-3mm 조각으로 절단하였다. OctoMACS™(Miltenyi Biotec) 특이적 해리 프로그램(마우스 이식 종양)을 사용하여 종양 조각을 해리하고 전체 세포 제제를 37℃에서 45분 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 45분 인큐베이션 후, OctoMACS™(마우스 이식 종양) 프로그램을 사용하여 제2 분리 라운드를 수행하고, 생성된 단일 세포 현탁액을 70 μM 나일론 메쉬를 통해 50 mL 튜브로 여과하였다. 나일론 메쉬를 5 mL의 RPMI-1640 + 10% FBS로 한 번 세척하고, 새로운 70 μM 나일론 메쉬를 사용하여 새 50 mL 튜브에 세포를 제2로 여과하였다. 나일론 메쉬를 5 mL의 RPMI-1640 + 10% FBS로 세척한 후, 여과된 세포를 1000 RPM에서 7분 동안 원심분리하였다. 생성된 해리된 세포를 PBS에 재현탁하고 염색 공정 전에 얼음에 보관하였다.

[0980] 유세포분석 염색을 위해 100 μL의 단일 세포 현탁액을 V-바닥 96웰 플레이트의 웰에 접종하였다. 사멸/생존 염색(Dead/live stain)(Zombie Aqua™, BioLegend) 및 Fc 차단 시약(BD Biosciences)을 포함하는 PBS를 웰당 100 μL씩 첨가하고 세포를 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 형광색소 결합 항체(CD4 FITC 클론 RM4-5; CD8a BV421 클론 53-6.7; F4/80 APC 클론 BM8; CD11b PE-Cy7 클론 M1/70; CD45 BV570 클론 30-F11, CD3 PE 클론 145-2C11, Ly6C BV785 클론 HK1.4, I-A/I-E APC-Cy7 클론 M5/114.15.2, Ly6G BV605 클론 1A8 및 CD24 PercP-Cy5.5 클론 M1/69, 모두 BioLegend)를 함유하는 PBS + 2% FBS에 재현탁시키고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고, 유세포분석 고정 완충액(Thermo Fisher Scientific)에 재현탁시켰다. 유세포분석 데이터는 NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 획득하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[0981] 결과는 종양 침윤 단핵구의 7.27%가 종양 미세환경에서 편모가 결실된 mCherry 균주를 흡수했음을 보여주었다. 유사하게는, 종양-연관 대식세포(TAM) 인구의 8.96%와 종양 침윤 수지상 세포(DC)의 3.33%가 편모가 결실된 mCherry 균주를 차지하였다. 대조적으로, 간질 및 종양 세포에 해당하는 CD45-집단 내에서, 0.076%만이 mCherry 발현에 대해 양성을 나타내었다(0.067% 배경 염색과 비교). 이러한 데이터는 편모와 SPI-1에 대한 이의 다운스트림 신호전달 영향이 상피 세포 감염을 가능하게 하는 데 필요하며, 이의 결여가 박테리아의 흡수를 종양 미세환경(즉, 종양-체류 면역/골수성 세포))의 식세포 면역 세포 구획으로만 제한한다는 것을 실증한다.

[0982] 편모의 제거는 적응 면역력을 억제하는 TLR5 유도 염증성 사이토카인 제거, 대식세포 파이롭토시스 감소, 전신 투여 시 종양-특이적 농축 유지(또는 강화)를 포함하여 면역자극성 *에스. 티피무리움* 균주에 여러 이점을 부여한다. 종양-체류 식세포에 국한된다.

[0983] **실시예 5**

[0984] ***살모넬라 pagP* 유전자 넉아웃 균주 조작 및 특징화**

[0985] 이 예에서 YS1646ΔasdΔFLG 균주는 pagP를 결실하도록 추가로 변형되었다. pagP 유전자는 *에스. 티피무리움*의 감염성 생활사 동안 유도되며, 지질 A를 팔미테이트로 변형시키는 효소(지질 A 팔미토일트랜스퍼라제)를 인코딩한다. 야생형 *에스. 티피무리움*에서 pagP의 발현은 헵타-아실화된 지질 A 분자를 생성한다. 지질 A의 말단 아실 사슬이 추가될 수 없는 msbB-돌연변이에서, pagP의 발현은 헥사-아실화된 지질 A 분자를 생성한다. 헥사-아실화된 지질 A가 있는 LPS는 염증유발성이 높고 TLR4에 대해 높은 친화도를 갖는 것으로 나타났다(야생형에서 발견되는 헵타-아실화된 LPS는 TLR4에 대해 가장 높은 친화도를 가짐). 이 예에서, pagP 및 msbB가 결실된 균주는 펜타-아실화된 지질 A만을 생성할 수 있으며, 이는 박테리아가 면역 조절 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 전달하도록 조작될 때 TLR4에 대한 낮은 친화도, 향상된 내약성 및 증가된 적응 면역력으로 인해 더 낮은 전염증성 사이토카인을 허용한다.

[0986] **ΔpagP 균주 작제**

[0987] pagP 유전자는 이전 실시예에 기재된 방법의 변형을 사용하여 YS1646ΔasdΔFLG 균주로부터 결실되었다. pagP 유전자를 플랭킹하는 각각 좌측 및 우측 서열의 203개 및 279개 염기를 함유하는 합성 pagP 유전자 상동성 아암 서열을 합성하고 pSL0191(SEQ ID NO: 331)이라고 하는 플라스미드에 클로닝하였다. 그 후에, cre/loxP 부위가 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 pSL0191로 클로닝하고, pagP 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 pagp-1(SEQ ID NO: 315) 및 pagp-2(SEQ ID NO: 316)로 PCR 증폭하였다(표 1 참조), 겔 정제되고 전기천공법에 의해 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 보유하는 균주 YS1646ΔasdΔFLG에 도입된다. 그 후에, 카

나마이신 내성 유전자는 상기 기재된 대로 Cre-매개 재조합에 의해 경화되었고 온도 민감성 플라스미드는 비허용 온도에서 성장에 의해 경화되었다. pagP 유전자 넉아웃 서열은 프라이머 pagp-3(SEQ ID NO: 317) 및 pagp-4(SEQ ID NO: 318)를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었고, DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. YS1646의 생성된 돌연변이 유도체는 YS1646ΔasdΔFLGΔpagP로 지정되었다.

[0988] **pagP 결실 돌연변이체는 펜타-아실화 지질 A와 함께 LPS를 갖고, 감소된 염증성 사이토카인을 유도한다**

[0989] pagP 유전자는 Datsenko 및 Wanner(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6640-6645 (2000)) 및 상기에 기재된 바와 같이 람다 유래 레드 재조합 시스템을 사용하여 YS1646Δasd 균주로부터 결실되어, 균주 YS1646ΔasdΔpagP를 생성하였다. 그 후에, 이 균주를 기능적 asd 유전자를 함유하는 플라스미드로 전기천공하여 결실된 asd 유전자를 보완하고 생체내 플라스미드 유지를 보장하였다. 그 후에, 지질 A를 이 균주에서 추출하고 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 질량 분광법(MALDI MS)으로 평가하고 야생형 *에스. 티피무리움* 균주 ATCC 14028, YS1646 균주(이는 결실 msbB 및 purI에 대해 결실됨) 및 YS1646Δasd 균주로부터의 지질 A를 비교하였다. 야생형 살모넬라는 기능성 msbB 유전자의 존재로 인해 각각 헵타-아실화 및 헥사-아실화 종에 해당하는 2034의 질량으로 작은 지질 A 피크와 1796의 질량을 가진 주요 피크를 가졌다. msbB 결실 균주 YS1646 및 YS1646Δasd는 1828 및 1585에서 주요 피크를 가졌으며, 이는 헥사-아실화 및 펜타-아실화 지질 A의 혼합물에 해당한다. msbB 및 pagP 결실 균주 YS1646ΔasdΔpagP는 단일 피크 펜타-아실화 지질 A에 해당하는 1585의 질량으로. 이러한 데이터는 pagP의 결실이 지질 A의 팔미토일화를 방지하여 이를 단일 펜타-아실화 종으로 제한한다는 것을 실증한다.

[0990] ΔpagP 돌연변이체 균주로부터의 펜타-아실화된 지질 A를 갖는 LPS가 TLR4 신호전달을 감소시켰는지 여부를 결정하기 위해, 야생형 균주, YS1646 균주 또는 YS1646ΔasdΔpagP 균주로부터 정제된 LPS 4 μg을 THP-1 인간 단핵구 세포(ATCC 카탈로그 # TIB-202)에 첨가하고, 상층액을 24시간 후 사이토메트릭 비드 어레이(CBA) 키트(BD Biosciences)를 사용하여 염증성 사이토카인의 존재에 대해 평가하였다. 그 결과 YS1646ΔasdΔpagP 균주의 LPS는 야생형 LPS와 비교하여 25%의 TNFα 양을 유도하였고, 야생형 LPS보다 7배 적은 IL-6을 유도함을 보여주었다. YS1646ΔasdΔpagP 균주의 LPS는 균주 YS1646보다 22배 적은 IL-6을 유도하였으며, 이는 ΔpagP 돌연변이의 펜타-아실화된 LPS 종이 인간 세포에서 훨씬 덜 염증을 나타내고 ΔpagP 돌연변이가 인간에서 더 잘 견딜 수 있음을 나타낸다.

[0991] ***pagP*의 결실은 1차 인간 M2 대식세포에서 현저히 적은 IL-6을 유도한다**

[0992] YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 균주가 또한 1차 인간 M2 대식세포로부터 덜 염증성 및 용량-제한 IL-6을 이끌어낸다는 것을 입증하기 위해 균주를 평가하고 YS1646ΔasdΔFLG 및 모 YS1646 균주와 비교하였다. 인간 공여자로부터 유래된 M2 대식세포는 T-세포 배제 고형 종양이 매우 풍부한 면역억제 표현형을 대표한다. 건강한 인간 공여자로부터 분리된 냉동 인간 PBMC를 완전 배지(RPMI-1640 + 1X 비필수 아미노산 + 5% 인간 AB 혈청)에서 해동하고 실온에서 800 RPM에서 10분 동안 원심분리하여 세척하였다. PBMC는 PBS + 2% FBS에 재현탁되었고 단핵구는 CD16 고갈 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 음성으로 분리되었다. 그 후에, 분리된 비접촉 단핵구를 PBS + 2% FBS에서 원심분리하여 세척하고 100 ng/mL 인간 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF) 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지에 재현탁시켰다. 그 후에, 분리된 단핵구(웰당 3e5)를 750 μL의 최종 부피로 24-웰 플레이트에 접종하였다. 접종 2일 후, 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 새로운 완전 배지로 교체하였다. 이틀 후(4일째), 사이토카인 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지 500 μL를 48시간 동안 웰당 첨가하였다. 6일째에, 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 사이토카인이 없는 신선한 완전 배지 단독으로 또는 MOI 20에서 *에스. 티피무리움* 균주의 대수기 배양물을 함유하는 배지로 교체하였다. 세포를 1시간 동안 감염시키고, 그 후에, PBS로 세척하고 배지를 50 μg/mL 겐타마이신을 포함하는 새로운 배지로 교체하여 세포외 박테리아를 죽였다. 그 후에, 웰을 세척하고 새로운 배지로 교체하고 37℃ 및 5% CO2에서 배양하였다. 48시간 후, 상층액을 수합하고 제조업체의 설명서에 따라 인간 IL-6 세포측정 비드 어레이(CBA) 키트(BD Biosciences)를 사용하여 사이토카인에 대해 분석하였다.

[0993] 결과는 모 균주 YS1646에 감염된 인간 1차 M2 대식세포에서 분비된 IL-6 수준이 평균 14839 ± 926 pg/mL를 산출한 반면 YS1646ΔasdΔFLG 균주의 IL-6 수준은 2075± 723 pg/mL(p = 0.004)에서 상당히 더 낮음을 입증하였다. 이는 편모의 결실 및 TLR5 신호전달의 제거가 IL-6의 유도에 미치는 영향을 더욱 확증한다. YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 균주는 332 ± 100 pg/mL에서 가장 낮은 IL-6 수준을 이끌어내었으며, 이는 TLR4를 자극하는 이 변형된 LPS 코팅의 감소된 능력을 입증하고 결과적으로 염증성 IL-6 생성을 극적으로 감소시켰다.

[0994] **조합된 편모 및 pagP 결실은 마우스의 내약성을 크게 향상시킨다**

[0995] 상기 기재된 변형된 균주가 모 균주 YS1646보다 더 약독화되었는지 여부를 결정하기 위해 중앙 치사량(LD50) 연구를 수행하였다. 6-8주령 BALB/c 마우스(군당 5마리)에 YS1646 균주 또는 유래 균주 YS1646ΔasdΔFLG, YS1646ΔasdΔpagP 및 YS1646ΔasdΔFL의 3e5 내지 3e7 CFU의 용량 범위를 정맥 주사하였다. YS1646 균주와 달리 유래 균주는 전신 투여 시 상당한 독성을 나타내는 FDA 승인 사이토카인인 뮤린 IL-2를 인코딩하는 플라스미드도 갖고 있다.

[0996] YS1646 균주에 대한 LD50은 이전에 발표된 YS1646의 LD50 보고서와 일치하는 4.4 x 10^6 CFU(2개 연구의 평균)로 밝혀졌으며 야생형 *에스. 티피무리움*과 비교하여 >1000배 개선되었다(예를 들어, Clairmont 등 (2000) J. Infect. Dis. 181:1996-2002). YS1646ΔasdΔFLG 균주에 대한 LD50은 2.07 x 10^7 CFU로 결정되었으며, 이는 균주 YS1646과 비교하여 독성이 4.5배 이상 감소되었음을 나타낸다. YS1646ΔasdΔpagP 균주에 대한 LD50은 1.39 x 10^6 CFU로 결정되었으며, 이는 균주가 여전히 높은 염증성 편모를 갖고 있다는 점을 감안할 때 예상되는 균주 YS1646과 비교하여 독성이 최소 3.2배 감소하는 것을 보여준다. YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 균주에 대한 LD50은 주어진 최고 용량에서 사망한 마우스가 없었기 때문에 확립될 수 없었지만 >6.2 x 10^7 CFU였다. 따라서 YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 균주는 모 YS1646 균주와 비교하여 독성에서 >14배 감소를 나타낸다. 이러한 데이터는 상기 기재된 유전자 변형이 임상 *에스. 티피무리움* 균주 YS1646(VNP20009로도 알려짐)의 독성을 감소시키고 따라서 인간의 내약성을 증가시킨다는 것을 실증한다.

[0997] VNP20009의 I상 임상 시험에서(예를 들어, Toso 등 (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152 참조), 환자의 종양에서 박테리아의 존재는 다음에서 부분적으로만 관찰되었다. 시험된 2개의 최고 용량, 3 x 10^8 CFU/m^2(33% 존재) 및 1 x 10^9 CFU/m^2(50% 존재)는 VNP20009의 허용 용량이 종양 콜로니화를 달성하기에는 너무 낮음을 나타낸다. 상기 기재된 변형을 통해 균주의 내약성을 개선함으로써 필요한 경우 >14배 더 높은 용량을 투여할 수 있으며, 종양이 콜로니화될 환자의 비율을 개선하고 종양당 치료 콜로니화 수준을 증가시켜 VNP20009에서 관찰된 문제를 해결할 수 있다.

[0998] **조합된 편모 및 pagP 결실은 마우스에서 항-*에스.티피무리움* 항체 생성을 크게 제한한다.**

[0999] 위에서 설명된 3 x 10^6 CFU 투여 군(N=5, YS1646 투여 군에서 N=4 제외)에서 살아남은 마우스를 IV-투여 후 40일 동안 유지하였으며, 이 시간에 혈청을 채혈하고 평가하였다. 변형된 흐름-기초 항체 역가 시스템에 의해 *에스. 티피무리움*에 대한 항체 역가에 대해. YS1646ΔasdΔFLG-mCherry 균주의 밤새 배양물을 세척하고 유세포분석 고정 완충액으로 고정하였다. 이전에 처리한 마우스와 미접촉 대조군 마우스의 혈청을 96웰 플레이트에 접종하고 PBS에서 연속 희석을 수행하였다. 다음으로, 1 x 10^6 CFU를 포함하는 YS1646ΔasdΔFLG-mCherry 배양물 25 μL를 혈청에 첨가하고 실온(RT)에서 25분 동안 배양하였다. 그 후에, 박테리아를 4000 RPM에서 5분 동안 회전시켜 PBS로 두 번 세척하였다. 마지막 세척 후, 박테리아를 2차 염소 항-마우스 Fc AF488 항체(스톡에서 1/400 희석)를 포함하는 PBS에 재현탁하고 실온에서 25분 동안 인큐베이션하고 빛으로부터 보호하였다. 그 후에, 박테리아를 4000 RPM에서 5분 동안 회전시켜 PBS로 3회 세척하였다. 마지막 세척 후, 박테리아를 PBS에 재현탁하고 NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 데이터를 획득하고 MFI FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1000] 유세포분석으로 결과를 평가하기 위해 모든 군에서 신호가 있는 가장 높은 희석액을 선택하고(1250X 혈청 희석액) 해당하는 평균 형광 강도(MFI) 값을 플로팅하였다. 검출 한계(LOD)는 MFI 1000에서 선택하였는데, 이는 염색 없이 얻은 MFI 뿐만 아니라 염소 항-마우스 Fc AF488 항체만을 사용한 배경 염색으로 얻은 것이다. 따라서 MFI 값이 1000보다 크면 양의 신호로 간주하고, MFI 값이 있음에도 이 값 이하이면 모두 음의 결과로 간주한다.

[1001] 이 검정의 결과는 YS1646이 혈청 항체(중화되지 않음)를 생성할 수 있다는 이전에 발표된 데이터에 따라 3 x 10^6 CFU의 YS1646 균주(29196.3 ± 20730의 MOI)로 처리된 마우스의 높은 MFI 역가의 항-에스. 티피무리움 혈청 항체를 보여주었다. YS1646ΔasdΔFLG 균주(11257 ± 9290의 MOI)로 처리한 마우스에서 더 적은 수의 항체가 검출되었는데, 이는 편모에서 보조제 활성이 부족하기 때문일 수 있다. YS1646ΔasdΔpagP 균주로 처리된 마우스에서는 변경된 LPS 표면 코팅으로 인한 것일 수 있는 균주 YS1646(p = 0.033)와 비교하여 훨씬 적은 수의 항체가 생성되었다(4494 ± 3861의 MFI). 혈청 항체의 가장 현저한 감소는 YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 처리군(1930 ± 2445의 MFI)에서 입증되었으며, 여기서 몇몇 마우스는 1000 미만의 MFI 역가를 나타내므로 혈청 항체에 대해 음성으로 간주되었다(p = 0.021, 대 균주 YS1646). 따라서, 편모와 pagP 유전자의 결합된 결실은 개선

된 안전성뿐만 아니라 현저하게 감소된 면역원성을 모두 가능하게 하여 인간에서 높은 CFU의 반복 투여를 가능하게 할 것이다.

[1002] **_pagP_ 및 편모 결실 균주 및 이의 조합은 균주 YS1646와 비교하여 인간 혈청에서 상당히 더 높은 생존력을 보여준다**

[1003] 균주 YS1646은 전신 투여 후 인간에서 제한된 종양 콜로니화를 나타낸다. 균주 YS1646이 인간 혈액의 보체 인자에 의해 비활성화되는 것이 본원에서 제시된다. 이를 입증하기 위해, 균주 YS1646 및 이. 콜라이 D10B를 박테리아의 표면을 변경하는 추가 돌연변이를 함유하는 본원에 제공된 예시적인 면역자극성 박테리아와 비교하였다. 이러한 예시적인 변형된 균주는 YS1646 _Δasd/ΔpagP_, YS1646 _Δasd/ΔFLG_, 및 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP_였다. YS1646 및 이. 콜라이 D10B 배양에 첨가하여 이러한 3개의 균주를 풀링된 마우스 혈액 또는 풀링된 건강한 인간 공여자(n=3)로부터의 혈청 또는 열-비활성화(HI) 혈청과 함께 3시간 동안 인큐베이션하였다. 37℃ 혈청과 함께 인큐베이션한 후, 박테리아를 연속적으로 희석시키고 LB 한천 플레이트에 평판배양하고 콜로니 형성 단위(CFU)를 결정하였다.

[1004] 마우스 혈청에서 모든 균주는 100% 생존 상태로 남아 있었고 보체 비활성화에 대해 완전히 내성이 있었다. 인간 혈청에서 모든 균주는 열 비활성화 혈청에서 100% 생존하였다. 이. 콜라이 D10B 균주는 전체 인간 혈청에서 3시간 후에 완전히 제거되었다. 전체 인간 혈청에서 YS1646 균주는 살아있는 콜로니의 6.37%만 나타내어 YS1646 임상 균주의 종양 콜로니화가 인간 혈액에서 보체 비활성화로 인해 제한되었음을 입증하였다. YS1646 _Δasd/ΔFLG_ 균주의 경우 31.47%의 살아있는 콜로니이 남아 있었고, YS1646 _Δasd/ΔpagP_ 균주의 경우 3시간 동안 인간 혈청과 인큐베이션한 후 살아있는 콜로니의 72.9%가 남아 있었다. 결합된 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP_ 균주는 인간 혈청의 보체에 대해 완전히 내성이 있었다.

[1005] 이러한 데이터는 YS1646 균주(VNP20009)가 전신 투여될 때 종양 콜로니화가 매우 낮은 이유를 설명한다. 균주 YS1646은 인간 혈청에서 보체 비활성화에 매우 민감하지만 마우스 혈청에서는 그렇지 않다는 것이 본원에서 제시된다. 이 데이터는 왜 제한된 종양 콜로니화가 인간에서 관찰된 반면 마우스 종양은 높은 수준에서 콜로니화되었는지를 설명한다. fljB/fliC 또는 pagP 결실, 또는 이러한 돌연변이의 조합은 이 표현형을 부분적으로 또는 완전히 구출한다. 따라서, YS1646 _Δasd/ΔpagP_, YS1646 _Δasd/ΔFLG_, 및 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP_ 균주를 사용하여 인간 혈청에서 관찰된 향상된 안정성은 인간 종양 콜로니화의 증가를 제공한다.

[1006] **실시예 6**

[1007] ***살모넬라 ansB* 유전자 넉아웃 균주 조작 및 특징화**

[1008] 이 예에서 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP_ 균주는 박테리아 L-아스파라기나제 II를 인코딩하는 유전자인 ansB를 결실하도록 추가로 변형되었다. T-세포의 존재 하에 _에스. 티피무리움_에 의한 L-아스파라기나제 II의 분비는 T-세포 수용체(TCR) 발현을 감소시키고 세포용해성 사이토카인 생산을 손상시킴으로써 T-세포 기능을 직접적으로 손상시키는 것으로 나타났다. 결과적으로 박테리아 유래 아스파라기나제는 수십 년 동안 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 치료하는 데 성공적으로 사용되었다. 박테리아 게놈으로부터 ansB의 결실은 L-아스파라기나제 II를 생성하는 _에스. 티피무리움_ 균주의 능력을 제거하여 박테리아 군집화된 종양 미세환경에서 T-세포의 기능을 향상시킨다.

[1009] ***ΔansB* 균주 작제**

[1010] ansB 유전자는 이전 실시예에 기재된 방법의 변형을 사용하여 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP_ 균주로부터 결실되었다. ansB 유전자를 플랭킹하는 좌측 및 우측 서열의 각각 236개 및 251개 염기를 포함하는 합성 ansB 유전자 상동성 아암 서열을 합성하고 pSL0230(SEQ ID NO: 332)이라고 하는 플라스미드에 클로닝하였다. 그 후에, cre/loxP 부위가 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 플라스미드 pSL0230에 클로닝하고 ansB 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 ansb-1(SEQ ID NO: 319) 및 ansb-2(SEQ ID NO: 320)로 PCR 증폭시키고, 겔을 정제하고, 전기천공법에 의해 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 운반하는 균주 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP_에 도입하였다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자는 상기 기재된 대로 Cre-매개 재조합에 의해 경화되었고 온도 민감성 플라스미드는 비허용 온도에서 성장에 의해 경화되었다. ansB 유전자 넉아웃 서열은 프라이머 ansb-3(SEQ ID NO: 321) 및 ansb-4(SEQ ID NO: 322)를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었고(표 1 참조), DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. 생성된 YS1646 돌연변이체 유도체를 YS1646 _Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB_로 명명하였다.

[1011] ***ansB*의 결실은 시험관 내 아스파라기나제 활성을 제거한다**

[1012] YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB* 균주가 L-아스파라기나제 II를 덜 생산하는지 여부를 결정하기 위해, ansB-온전한 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP* 균주와 함께 이 균주의 배양물을 LB에서 성장시키고 정지기에 도달하도록 하였다. 이때 배양물에서 50 μL의 조절 배지를 제조사의 지침에 따라 비색 아스파라기나제 검정 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 아스파라기나아제 활성을 분석하였다. 40분 인큐베이션 후, 570 nm의 흡광도 파장에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)에서 흡광도 단위를 판독하였다.

[1013] 1.95의 흡광도를 제공한 재조합 L-아스파라기나제 II 양성 대조군과 비교하여 ansB-무손상 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP* 균주의 흡광도는 0.82였다. 그러나 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB* 균주에서 ansB의 결실은 0.109의 흡광도에서 검출된 아스파라기나제 활성의 배경 수준을 초래하였다. 이러한 데이터는 ΔansB 돌연변이가 아스파라기나제 활성을 완전히 제거한다는 것을 확인한다.

[1014] **_ansB_의 결실은 시험관 내 공동배양 분석에서 T-세포 기능을 복원한다**

[1015] T-세포에 대한 감소된 L-아스파라기나제 II 활성의 영향에 대해 ansB가 결실된 균주를 기능적으로 특성화하기 위해, 비장 정제 T-세포와의 배양물에서 균주에 감염된 뮤린 1차 골수 유래 대식세포(BMM)를 사용하여 공동배양 분석을 확립하였다. 이 분석을 위해 건강한 BALB/c 마우스의 비장을 분리하여 분리하였으며 제조업체의 설명서에 따라 마우스 T-세포 분리 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 비장 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 분리하였다. 분리된 T-세포에서 2e5 세포를 5 μg/ml의 항-마우스 CD3ε 항체(클론 145-2C11, Thermo Fisher Scientific)로 코팅되었던 편평-바닥 96웰 플레이트에 웰당 첨가하였다. YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP* 및 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB* 배양물로부터의 조건화된 LB 배지를 정지기으로 성장시키고, 0.45 μM 나일론 메쉬를 통해 여과하고 공동자극을 위한 10 μg/ml 작용성 항-CD28 항체의 첨가 여부에 관계없이 T-세포에 첨가하였다. 20 U/mL의 재조합 아스파라기나제를 함유하는 대조군 및 정상 배양 배지를 검정에서 대조군으로 사용하였다. 플레이트를 5% CO2 인큐베이터에서 37℃로 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 24시간에 100 μL의 공동배양 상층액을 웰에서 수합하고 뮤린 Th1-특이적 사이토카인 비드 어레이(CBA, BioLegend)를 수행하였다. 동시에, T-세포를 수합하고 유세포분석에 의한 CD4+ 및 CD8+ T-세포의 표면 T-세포 수용체 β(TCRβ) 발현과 IFNɣ, TNFα 및 IL-2의 세포내 염색에 대해 분석하였다.

[1016] 결과는 대식세포를 감염시키는 데 사용된 ansB 온전한 균주(YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*)가 T-세포와 공동배양된 후 깊은 T-세포 면역억제를 유도한다는 것을 확인하였다. 이는 배지 대조군 및 20 U/mL의 농도에서 재조합 아스파라기나제의 양성 대조군과 비교하여 CD4+ 및 CD8+ T-세포(아래 표 참조) 모두에서 TCRβ 표면 발현의 현저한 하향조절에 의해 나타났다. YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB* 균주에서 ansB의 결실은 모 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP* 균주와 비교하여 CD4+(p = 0.004) 및 CD8+ T-세포(p = 0.002) 모두에서 TCRβ 표면 발현을 유의하게 회복시켰다.

치료	TCRβ 발현 (MFI 평균 ± SD)	
	CD4⁺ T-세포	CD8⁺ T-세포
배지 대조군	8141.0 ± 405.9	12655.0 ± 534.6
균주 YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*	3817.0 ± 200.8	6492.0 ± 260.2
균주 YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*	7047.5 ± 204.4	13350.0 ± 339.4
재조합 아스파라기나제 II (20 U/mL)	4253.5 ± 576.3	6305.0 ± 687.3

SD = 표준 편차

[1017]

[1018] 공동배양 24시간 후 사이토카인의 T-세포 분비를 T-세포 세포용해 기능의 마커로 측정하였다. 아래 표에 나타난 바와 같이, 사이토카인 IFNɣ, TNFα 및 IL-2의 T-세포 생산은 YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 균주로 처리한 후 배지 대조군와 비교하여 현저히 낮았으며, YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주에서 ansB 결실(IFNɣ(p = 0.05), TNFα(p = 0.012) 및 IL-2(p = 0.006)). 이러한 데이터는 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주에서 ansB의 결실이 모 YS1646ΔasdΔFLGΔpagP 균주와 비교하여 T-세포 세포용해 기능을 유의하게 회복시킨다는 것을 나타낸다.

치료	T-세포 사이토카인 발현 (pg/mL, 평균 ± SD)		
	IFNγ	TNFα	IL-2
배지 대조군	4176.1 ± 20.8	136.0 ± 11.1	3118.2 ± 154.3
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*	238.1 ± 0.6	35.7 ± 7.1	134.9 ± 12.7
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*	1788.9 ± 515.5	120.5 ± 11.2	1947.6 + 190.5
재조합 아스파라기나제 II (20 U/mL)	166.2 ± 19.7	33.2 ± 3.4	114.5 ± 4.8

SD = 표준 편차

[1019]

[1020] ***ansB*의 결실은 생체내에서 종양-체류 T-세포 TCRβ 발현을 복구시킨다**

[1021] 시험관 내 공동배양 분석에서 ansB의 발현은 유세포분석에 의한 T-세포에 대한 TCR의 하향 조절을 포함하여 T-세포 기능에 대한 면역억제 효과를 입증하였다. 이것이 생체 내에서 유사하게 발생할지 여부를 평가하기 위해 결장직장암의 MC38 마우스 모델을 사용하였다.

[1022] 이 실험을 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 4마리 마우스)의 우측 옆구리에 MC38 세포(100 μL PBS 중 5x105개 세포)를 SC 접종하였다. 큰 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 YS1646Δasd/ΔFLG-mCherry 균주의 $1x10^7$ CFU를 17일째에 IV 주사하였다. 종양을 IV 투여 후 7일째에 절제하고 2.5 mL 효소 믹스(1 mg/mL 콜라게나제 IV 및 20 μg/mL DNase I가 포함된 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640)로 채워진 gentleMACS™ C 튜브(Miltenyi Biotec)로 2-3mm 조각으로 절단하였다. OctoMACS™(Miltenyi Biotec) 특이적 해리 프로그램(마우스 이식 종양)을 사용하여 종양 조각을 해리하고 전체 세포 제제를 37℃에서 45분 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 45분의 인큐베이션 후, OctoMACS™(마우스 이식 종양) 프로그램을 사용하여 제2 분리 라운드를 수행하고, 생성된 단일 세포 현탁액을 70 μM 나일론 메쉬를 통해 50 mL 튜브로 여과하였다. 나일론 메쉬를 5 mL의 RPMI-1640 + 10% FBS로 한 번 세척하고, 세포를 새로운 70 μM 나일론 메쉬를 사용하여 새 50 mL 튜브에 제2로 여과하였다. 나일론 메쉬를 5 mL의 RPMI-1640 + 10% FBS로 세척한 후, 여과된 세포를 1000 RPM에서 7분 동안 원심분리하였다. 생성된 해리된 세포를 PBS에 재현탁하고 염색 공정 전에 얼음에 보관하였다.

[1023] 유세포분석 염색을 위해 100 μL의 단일 세포 현탁액을 V-바닥 96웰 플레이트의 웰에 접종하였다. 사멸/생존 염색(Zombie Aqua™, BioLegend) 및 Fc 차단 시약(BD Biosciences)이 포함된 PBS를 웰당 100 μL씩 첨가하고, 세포를 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 형광색소 결합 항체(CD45 BV570 클론 30-F11, TCR PE 클론 H57-597, CD4 FITC 클론 RM4-5, 모두 BioLegend에서 제공) 및 DAPI(BioLegend)를 포함하는 PBS + 2% FBS에 재현탁하였다. 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 배양한다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고, 유세포분석 고정 완충액(Thermo Fisher Scientific)에 재현탁시켰다. 유세포분석 데이터는 ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 획득하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1024] 아래 표에 나타난 바와 같이, 종양 침윤성 CD4+ T-세포에서 TCRβ의 표면 발현에 대한 평균 평균 형광 강도(MFI)는 종양 내에서 콜로니화된 모 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP 균주와의 상호작용 후 유의하게 낮았다. ansB가 결실된 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB 균주(p = 0.042)를 사용하여 PBS 대조군 처리 마우스보다 더 높았다.

	종양-침윤성 CD4⁺ T-세포 상에서 TCRβ 발현에 대한 MFI		
	PBS	YS1646 Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*	YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*
	13980	13933	14412
	14543	13480	14957
	14177	12087	14844
	13931	14010	14233
AVG	**14157.8**	**13377.5**	**14611.5**
SD	**278.0**	**891.5**	**344.7**

MFI = 평균 형광 강도; AVG = 평균; SD = 표준 편차

[1025]

[1026] 종합하면, 이러한 데이터는 면역억제성 L-아스파라기나아제 II의 박테리아 생성으로 인한 T-세포 기능 회복을 위해 ansB 유전자 결실의 필요성을 확인하고, YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주에서 ansB 결실로 관찰되는 강화된 T-세포 기능을 실증한다.

[1027] **실시예 7**

[1028] ***살모넬라 csgD* 유전자 넉아웃 균주 조작 및 특징화**

[1029] YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주는 *에스. 티피무리움* 컬리 핌브리애 형성, 셀룰로스 생산 및 c-디-GMP 생산을 제어하는 마스터 유전자인 csgD를 결실하도록 추가로 변형되었다. *csgD* 유전자 결실은 셀룰로스-매개 생물막 형성 가능성을 제거하고 염증 유발 신호를 감소시키며 숙주 식세포에 의한 흡수를 향상시킨다. 세포내 국소화의 이러한 증가는 플라스미드 전달 및 면역조절 단백질 생산의 효율성을 향상시킬 것이다.

[1030] **ΔcsgD 균주 작제**

[1031] csgD 유전자는 이전 실시예에 기재된 방법의 변형을 사용하여 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주로부터 결실되었다. 좌측 및 우측 염기서열의 207개 및 209개 염기를 각각 포함하는 합성 csgD 유전자 상동성 아암 서열을 csgD 유전자에 인접하여 합성하고 pSL0196(SEQ ID NO: 333)이라고 하는 플라스미드에 클로닝하였다. 그 후에, cre/loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 플라스미드 pSL0196에 클로닝하고, csgD 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 csgd-1(SEQ ID NO: 323) 및 csgd-2(SEQ ID NO: 324)로 PCR 증폭하였다. 겔 정제하고, 전기천공법에 의해 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 보유하는 균주 YS1646ΔasdΔFLGΔpagP/ansB에 도입하였다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자는 상기 기재된 바와 같이 Cre-매개 재조합에 의해 경화되었고, 온도 민감성 플라스미드는 비허용 온도에서 성장에 의해 경화되었다. csgD 유전자 넉아웃 서열은 프라이머 csgd-3(SEQ ID NO: 325) 및 csgd-4(SEQ ID NO: 326)를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었고, DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. 모 균주 YS1646의 생성된 돌연변이 유도체를 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD로 명명하였다.

[1032] ***csgD*가 결실된 균주는 콩고 레드 플레이트에서 RDAR 콜로니를 형성할 수 없음**

[1033] 콩고 레드 플레이트에서 성장한 후 RDAR(Rough Dry And Red) 콜로니를 형성하는 능력은 박테리아 생물막 형성에 대한 검증된 분석이다. 거칠고 건조한 질감은 셀룰로스 생산을 통해 발생하며 빨간색은 곱슬 섬유소 표면 구조에 의한 안료 축적으로 인한 것이다. 이 분석을 위해 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주는 콩고 레드 한천 플레이트에서 배양 후 RDAR 표현형을 형성하는 능력에 대해 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD 균주와 비교되었다.

[1034] 콩고 레드 한천 플레이트는 대두(10 g/L) 및 효모 추출물(5 g/L)(NaCl 없이 변형된 LB)로 준비하고 콩고 레드(40 mg/L)와 쿠마시 브릴리언트 블루 G-250(20 mg/L)로 보충하였다. 5 마이크로리터의 정지기 박테리아 배양물을 콩고 레드 플레이트에 점적하고 37℃에서 16시간 동안 배양한 다음 30℃로 옮기고 추가로 120시간 동안 배양하였다. 콜로니 형태 및 색상의 시각적 분석을 수행하고 매일 기록하여 RDAR 콜로니 형태형의 존재 또는 부재를 확인하였다.

[1035] 두 균주 간의 콜로니 형태형을 비교하면, YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD 균주는 부드러운 표현형을 보였고, 콜로니는 색소가 부족하였다. 이와 비교하여 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB 균주는 여전히 csgD 유전자를 함유하고 있으며 고전적인 거칠고 건조한 외관과 색소 흡수의 명확한 증거를 보여주었다. 따라서, 기능적 분석은 ΔcsgD 균주가 컬리 핌브리애 및 셀룰로스 생산이 부족하기 때문에 생물막을 형성할 수 없음을 확인

한다.

[1036] **_csgD_가 결실된 균주는 삼중 음성 유방암의 성불응이 높은 마우스 모델에서 우수한 항종양 효능을 보여준다**

[1037] 면역자극성 박테리아 요법이 종양에 콜로니를 형성하지만 제한된 효능을 보인 모델에서 csgD 결실의 영향이 평가되었다. 이는 종양-체류 골수성 세포로의 흡수를 제한할 수 있는 박테리아 생성 셀룰로스의 존재를 나타낼 수 있으며, 이에 따라 치료 이점을 제한할 수 있다(예를 들어, Crull 등 (2011) Cellular Microbiology 13(8):1223-1233 참조). 인간 삼중음성 유방암의 대표적인 모델인 치료가 어려운 EMT6 모델이 활용되었다(예를 들어, Yu 등 (2018) PLoS ONE 13(11):e0206223 참조). EMT6 종양 세포가 옆구리에 피하가 아니라 유선 지방 패드에 동소적으로 투여되는 경우, 모델은 T-세포가 배제되고 고도로 전이되며 승인된 모든 체크포인트 항체를 포함한 면역 요법에 대해 매우 성불응이다(예를 들어, Mariathasan 참조). 등 (2018) Nature 554: 544-548).

[1038] 이 실험을 위해 6-8주령의 암컷 BALB/c 마우스(군당 5마리)에 EMT6 종양 세포(ATCC # CRL-2755)(100 μL PBS 중 $2x10^5$개 세포)가 있는 좌측 유선 지방 패드에 접종하였다. 13일 된 확립된 유선 종양(약 55 mm^3)을 보유한 마우스에 csgD가 결실된 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD 균주, 또는 모 YS1646/ΔasdΔFLG/Δ*pagP*/ΔansB 균주의 단일 용량 $1 x10^7$ CFU를 IV 주사하고, PBS 대조군과 비교하였다. 박테리아 균주는 항시적으로 활성인 뮤린 STING(EF-1α muSTING R283G)을 인코딩하는 플라스미드를 함유하였다.

[1039] PBS 치료된 마우스의 종양은 고르게 성장하여 35일째에 최대 종양 부피에 도달하였다(1199.0 ± 298.1 mm^3). csgD-무손상 균주로 처리된 마우스, YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB는 이 모델에서 항종양 효능의 증거를 입증하지 않았으며 또한 35일째에 최대 종양 부피에 도달하였다(1689.1 ± 537.0). 이러한 종양의 생체외 LB 평판 배양은 모든 종양이 콜로니화되는 것으로 밝혀졌다. 그러나, csgD가 결실된 균주 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD는 5마리 중 3마리의 마우스가 원발성 및 전이성 질환 모두에서 완전히 치유되었다(60일 이상). 전체 종양 성장 저해(TGI)는 45.7%였으며 나머지 두 종양 중 하나는 결국 성장하기 전에 부분적으로 반응하였다. 두 박테리아 균주는 동일한 플라스미드 페이로드를 포함하였으나 단 하나만 상당한 항종양 효능을 나타냈다. 따라서, 가장 다루기 어렵고 고도로 전이된 동계 종양 모델 중 하나인 동소성 EMT6에서 csgD가 결실된 균주는 전신 항종양 효능을 유도할 수 있었고 60% 완전한 반응을 보였다.

[1040] **csgD-결실된 균주는 생체 내에서 향상된 세포내 흡수를 보여준다**

[1041] csgD가 제거된 균주가 종양-체류 골수성 세포로의 더 큰 박테리아 흡수로 인해 개선된 효능을 입증했는지 여부를 결정하기 위해 생체외 겐타마이신 보호 분석을 수행하였다(예를 들어 Crull 등 (2011) Cellular Microbiology 13(8): 1223-1233 참조). 이 실험을 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 4마리 마우스)의 우측 옆구리에 MC38 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$개 세포)를 SC 접종하였다. 큰 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 17일째에 csgD가 결실된 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD 균주(N=12) 또는 모 YS1646 균주(N=4)의 $1x10^7$ CFU를 IV 주사하였다. 종양을 IV 투여 후 7일에 절제하고, 칭량하고, 1 mg/mL 콜라게나제 IV 및 20 mg/mL DNase I이 보충된 RPMI에서 잘게 썰고, 37℃에서 30분 동안 진탕하면서 인큐베이션하여 단일 세포 현탁액을 생성하였다. 30분 후, 현탁액을 70 mm 필터에 통과시키고 회수된 부피를 2개의 별개의 동일한 시료로 나누었다. 겐타마이신(Thermo Fisher Scientific)을 200 mg/mL의 농도로 쌍을 이룬 각각의 시료 중 하나에 첨가하여 세포외 박테리아를 죽이고 시료을 37℃에서 90분 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포 현탁액 시료을 세척하고 0.05% Triton X로 용해하고 LB 한천 플레이트에 평판배양하여 CFU를 계산하였다.

[1042] 결과는 겐타마이신 처리 없이 YS1646 처리된 종양의 CFU(11925 ± 19859 CFU)와 비교하여 겐타마이신 처리가 종양에서 매우 적은 수의 CFU(51 ± 45 CFU)가 검출되었음을 보여준다. 이는 박테리아가 이러한 종양에서 대부분 세포외에 존재하고 따라서 겐타마이신 제거에 민감함을 나타낸다. csgD가 결실된 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgD 치료군에서 겐타마이신 처리되지 않은 종양은 잘 콜로니화된 종양에서 예상한 대로 높은 CFU를 산출하였으며 겐타마이신 치료는 더 적은 CFU(1276 ± 2410 CFU)를 산출하였다. 모 YS1646 계통 처리된 종양보다 훨씬 더 많다. 이는 csgD가 제거된 박테리아가 세포 내에 더 많이 존재하여 겐타마이신으로부터 보호되기 때문이다. 이러한 데이터는 csgD 결실이 박테리아의 세포내 흡수를 개선하여 생체내 면역조절 단백질의 플라스미드 전달을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

[1043] **실시예 8**

[1044] **pATI-1.75 및 pATI-1.76 벡터 작제**

[1045] 플라스미드는 pBR322 복제 원점, asd 유전자, 경화를 위한 HindIII 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 내성 유전자, 발현 카세트 삽입을 위한 다중 복제 부위를 포함하는 설계 및 합성되었다. 발현 카세트는 다양한 구성으로 조립된 진핵생물 프로모터, 개방 리딩 프레임(ORF), 전사후 조절 요소 및 폴리아데닐화 신호를 비롯한 여러 요소로 구성된다.

[1046] 예시적인 프로모터는 CMV 즉시 초기 인핸서 서열의 직접 다운스트림에 인코딩된 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 코어 프로모터, 및 인간 신장 인자-1 알파(EF-1α)에 대한 코어 프로모터를 포함한다. 개방 리딩 프레임(ORF)은 각각이 단백질로 번역되는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있고, 2A 서열의 삽입에 의해 별개의 폴리펩타이드로 분리될 수 있으며, 이에 의해 진핵생물 리보솜은 2A 서열 내부의 Gly 및 Pro 잔기 사이에 펩타이드 결합을 삽입하지 못한다. 2A 서열의 예는 테사 아시그나 바이러스(TaV) 캡시드 단백질의 T2A 펩타이드(예를 들어 SEQ ID NO: 327 참조) 및 돼지 테스코바이러스(PTV)의 P2A 펩타이드(예를 들어 SEQ ID NO: 328 참조)이다. 업스트림 푸린 절두 부위(RRKR) 및 다른 인핸서 요소는 발현된 단백질을 분리하기 위해 절두를 용이하게 하기 위해 업스트림에 배치된다.

[1047] 전사후 조절 요소(PRE)의 예는 우드척 간염 바이러스 PRE(WPRE; SEQ ID NO: 346) 및 B형 간염 바이러스 PRE(HPRE; SEQ ID NO: 347)를 포함하며, 이는 다음의 세포질로 mRNA 핵 외수송을 촉진하여 3' 말단 처리 및 안정성을 향상시키는 유전자의 세포질 mRNA의 축적을 증가시킨다. 폴리아데닐화 신호 서열의 예는 SV40 폴리아데닐화(SV40polyA, 또는 SV40pA) 신호 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpolyA, 또는 bGHpA) 신호를 포함하며, 둘 다 전사 종결을 촉진하는 역할을 하는 3' 조절 요소이며 RNA 절두 복합체에 의해 인식되는 서열 모티프를 포함한다.

[1048] 도 1a 내지 도 1c는 pATI-1.75 및 pATI-1.76(각각 도 1a 및 도 1b) 플라스미드 삽입물을 도시한다; 도 1c는 샤인-달가노 서열이 진핵 세포, 예컨대 골수성 세포에서 번역을 위해 코작 서열로 대체됨을 보여준다. 이러한 서열을 갖는 플라스미드 및 작제는 박테리아가, 박테리아 숙주에 의해 번역될 수 없으나 진핵생물에서 생체내에서 번역될 수 있는 RNA를 전달하도록 설계된 구현예에서 사용될 수 있다.

[1049] **실시예 9**

[1050] **설계된 이종성 단백질 발현 플라스미드는 인간 세포로부터 기능적 단백질 생성을 유도한다**

[1051] **인간 세포에서 확립된 사이토카인의 최적의 발현**

[1052] 면역자극성 사이토카인이 인간 세포에서 설계된 플라스미드로부터 발현될 수 있다는 것을 예시하기 위해, 사이토카인 패널을 EF-1α 프로모터의 제어 하에 pATI-1.75 플라스미드에 클로닝하였다. 사이토카인은 뮤린 IL-2(muIL-2), muIL-12p70, muIL-23 및 인간 IL-2(huIL-2)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. IL-15 단일 사슬(muIL-15Rα-IL-15sc)에 융합된 muIL-15 수용체-α에 대해 EF-1α 및 CMV 프로모터를 시험하였다. HEK293T STING Null Cells(InvivoGen)를 웰당 200,000개의 세포로 폴리-L-리신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 시딩하여 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날, 200 ng의 각각의 사이토카인 플라스미드 DNA를 무혈청 배지에서 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하고 형질주입되지 않은 웰을 음성 대조군(2벌 중복)으로 사용하였다. 각각의 시료의 세포 배양 상층액을 형질주입 후 24시간에 수집하고 각각의 사이토카인에 대해 특이적인 ELISA에 의해 단백질 발현에 대해 평가하였다.

[1053] muIL-2 작제물은 제조업체의 설명서에 따라 뮤린 IL-2 ELISA(R&D Systems)에서 평가되었으며 코돈 최적화(muIL-2 CO)가 있는 추가 버전의 muIL-2도 평가되었다. 순수한 상층액의 농도를 시험한 결과, muIL-2 작제물의 경우 평균 1680 pg/mL의 muIL-2가 생성되었고, muIL-2 CO 작제물의 경우 1812 pg/mL의 muIL-2가 생성되었다. 이 데이터는 구조의 기능을 확인하고 코돈 최적화로 수율을 향상시킬 수 있음을 보여주었다. muIL-12p70 구조는 제조업체의 프로토콜에 따라 뮤린 IL-12 ELISA(R&D Systems)에서 평가되었다. 상층액을 순수하게 첨가하였을 때 분비된 muIL-12p70의 평균 400 pg/mL가 측정되었지만 이는 선형 범위를 벗어났다. 상층액을 5배 희석시켰을 때 분비된 muIL-12p70의 평균 105 pg/mL가 검출되었다. muIL-23 플라스미드의 경우, 키트 지침에 따라 뮤린 IL-23 ELISA(BioLegend)를 사용하여 단백질 검출을 달성하였다. 상층액을 순수하게 첨가하면 평균 966 pg/mL의 muIL-23이 검출되었다. 인간 IL-2 플라스미드의 경우 키트 지침에 따라 인간 IL-2 ELISA(Invitrogen)를 사용하여 단백질을 검출하였다. 순수 첨가된 상층액으로, 평균 1422 pg/mL의 huIL-2가 검출되었다. EF-1α 또는 CMV 프로모터를 사용하여 발현된 muIL-15Rα-IL-15sc 작제물의 경우 키트 지침에 따라 뮤린 IL-15 ELISA(eBioscience, Inc.)가 사용되었다. 순수하게 첨가하였을 때, EF-1α 프로모터가 있는 muIL-15Rα-IL-15sc 플라스미드는 평균 131 pg/mL를 생성한 반면, CMV 프로모터가 있는 muIL-15Rα-IL-15sc 플라스미드는 평균 289 pg/mL를 생성하였

다.

[1054] 이 데이터는 인간 세포에서 마우스와 인간 모두의 면역조절 사이토카인을 인코딩하는 플라스미드 발현 작제물을 검증한다. 또한, 이는 코돈 최적화 및 CMV와 같은 프로모터의 사용이 단백질 발현을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[1055] **전사후 조절 요소는 사이토카인 발현을 향상시킨다**

[1056] ORF의 3' 말단에 추가된 전사후 조절 요소(PREs)가 EF-1α 프로모터의 제어 하에 인간 세포에서 면역자극성 사이토카인의 발현, huIL-2의 발현을 향상시키는지 여부를 결정하기 위해, pATI-1.75 플라스미드에 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)를 첨가하거나 첨가하지 않고 시험하였다.

[1057] HEK293T STING Null Cells(InvivoGen)를 웰당 200,000개의 세포로 폴리-L-리신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 시딩하여 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날, 200 ng의 각각의 사이토카인 플라스미드 DNA를 무혈청 배지에서 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하고 형질주입되지 않은 웰을 음성 대조군(2벌 중복)으로 사용하였다. 각각의 시료의 세포 배양 상층액을 형질주입 후 24시간에 수집하고 제조업체의 설명서에 따라 인간 IL-2 ELISA(Invitrogen)로 활성을 평가하였다. 상층액을 순수하게 첨가하거나 5배 희석시켰다.

[1058] 결과는 상층액이 순수하게 첨가되었을 때, 평균 1540 pg/mL를 분비하는 WPRE가 없는 huIL-2 작제물과 비교하여, WPRE가 있는 huIL-2 작제물이 3.6배 증가의 5511 pg/mL를 분비함을 입증하였다. 5배 희석된 상층액에서, 비-WPRE huIL-2 작제물은 315 pg/mL의 huIL-2를 분비한 반면, WPRE가 있는 huIL-2 작제물은 4.6배 증가된 1441 pg/mL를 분비하였다. 따라서 WPRE로 예시되지만 이로 제한되지 않는 3' 전사후 조절 요소의 추가는 인간 세포에서 단백질 발현을 상당히 개선할 수 있다.

[1059] **프로모터 최적화 및 전사후 조절 요소는 1차 M2 대식세포에서 사이토카인 생산을 향상시킨다**

[1060] muIL-15Rα-IL-15sc와 같은 사이토카인의 발현은 CMV 프로모터를 사용하여 인간 HEK293T-세포에서 향상되었지만, 사이토카인의 발현이, T-세포에서 우세한 대식세포 표현형이 배제된 고형 인간 종양, 공여자 유래 1차 인간 M2 대식세포에서 유사하게 향상될 수 있는지 여부가 결정되었다. 또한 WPRE와 같은 전사후 조절 요소가 이러한 세포에서 발현을 향상시킬 수 있는지 여부가 결정되었다.

[1061] 단백질 발현이 개선될 수 있는지 확인하기 위해 프로모터 EF-1α 및 CMV를 사용하여 muIL-2의 발현 조절을 시험하고 WPRE 전사후 조절 요소를 huIL-2의 발현에 대해 시험하였다. 건강한 인간 공여자로부터 분리된 동결된 인간 PBMC를 완전 배지(RPMI-1640 + 1X 비필수 아미노산 + 5% 인간 AB 혈청)에서 해동하고, 실온에서 800 RPM으로 10분 동안 원심분리하여 세척하였다. PBMC는 PBS + 2% FBS에 재현탁되었고 단핵구는 CD16 고갈 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 음성으로 분리되었다. 분리된 단핵구를 M-CSF 및 IL-4를 포함하는 RPMI 배지에서 6일 동안 배양하여 M2 대식세포를 생성하였다. 이를 위해, 분리되지 않은 단핵구를 PBS + 2% FBS에서 원심분리하여 세척하고, 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지에 재현탁시켰다. 그 후에, 분리된 단핵구(웰당 3e5개)를 750 마이크로리터의 최종 부피로 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 접종 2일 후, 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 새로운 완전 배지로 교체하였다. 이틀 후(4일차), 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지 500 μL를 웰당 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 6일째에 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 Viromer® RED mRNA 및 플라스미드 형질주입 시약(Lipocalyx)으로 형질주입시키기 위해 사이토카인이 없는 새로운 완전 배지로 교체하였다.

[1062] Viromer® RED를 사용한 형질주입은 제조업체의 설명서에 따라 수행되었다. 간단히 말해서, EF-1α-muIL-2 작제물, CMV-muIL-2 작제물, EF-1α-huIL-2 구조 또는 EF-1α-huIL-2 구조를 포함하는 500 ng의 플라스미드 DNA + WPRE 작제물 및 형질주입되지 않은 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고 0.2 L의 Viromer® RED와 혼합하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되도록 하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 24-웰 플레이트의 각각의 웰에 천천히 첨가하고(2벌 중복으로) 플레이트를 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 상층액을 24시간에 수합하고, 키트 지침에 따라 뮤린 IL-2 ELISA(R&D Systems) 또는 인간 IL-2 ELISA(Invitrogen)를 사용하여 사이토카인에 대해 분석하였다.

[1063] 결과는 EF-1α 프로모터의 제어 하에 muIL-2 작제물로 형질주입된 1차 인간 M2 대식세포로부터 수합한 순수 상층액으로부터 muIL-2의 발현이 평균 59.7 pg/mL의 muIL-2을 분비한다는 것을 입증하였다. CMV 프로모터가 있는

muIL-2 작제물은 평균 275 pg/mL muIL-2를 생성하였으며, 이는 거의 5배 증가하였다. 인간 IL-2 ELISA의 경우, WPRE가 결여된 플라스미드로 형질주입된 세포의 순수한 상층액은 평균 170 pg/mL huIL-2를 산출하였다. WPRE를 함유하는 huIL-2 작제물은 평균 219 pg/mL huIL-2를 산출하였다. 이러한 데이터는 CMV와 같은 프로모터 및 WPRE와 같은 전사후 조절 요소가 1차 인간 M2 대식세포를 비롯한 여러 세포 유형에서 사이토카인 발현을 유의하게 개선할 수 있음을 확인한다.

[1064] **인간 세포에서 발현되는 공동자극 수용체 리간드 4-1BBL**

[1065] 4-1BBL과 같은 공동자극성 분자는 항원 제시 세포(APC)에서 발현될 때 T-세포에서 발현된 4-1BB와 결합하여 최적의 T-세포 기능을 촉진할 수 있다. 4-1BBL은 세포질 신호전달 도메인에 의해 부정적으로 조절된다. 대식세포를 T-세포에 연결하는 4-1BBL의 후기 단계에서, 4-1BBL 세포질 도메인의 역 신호전달은 4-1BBL의 표면 전위를 유도하여 TLR4와 신호전달 복합체를 결합하고 형성한다. 이는 TLR4의 LPS 활성화에 필적하는 높은 수준의 TNF-α를 유도하여 적응 면역 반응의 면역억제를 유도한다(예를 들어, Ma 등 (2013) Sci. Signal. 6(295):ra87 참조).

[1066] 이 예에서, 뮤린 4-1BBL을 인코딩하는 서열은 pATI-1.75 벡터로 클로닝되었다. T-세포를 최대로 결합시키기 위해, 4-1BBL 세포질 도메인의 역 신호전달은 세포질 도메인(SEQ ID NO: 344의 아미노산 잔기 1-82에 상응)을 결실시켜 제거되어 mu4-1BBL△cyt를 생성하였다. mu4-1BBL△cyt가 인간 세포 표면에서 기능적으로 발현될 수 있는지 여부를 결정하기 위해 HEK-293T-세포를 이용하였다. HEK293T STING Null Cells(InvivoGen)를 웰당 200,000개의 세포로 폴리-L-리신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 접종하여 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날, mu4-1BBL△cyt를 인코딩하는 200ng의 플라스미드 DNA를 무혈청 배지에 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하고 형질주입되지 않은 웰을 음성 대조군으로 사용하였다(2벌 중복). 48시간 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 PBS + 2% FBS에 재현탁시키고, PE-접합된 뮤린 항-4-1BBL 항체(클론 TKS-1, BioLegend) 및 DAPI(사멸/생존 염색)로 염색하였다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고, PBS + 2% FBS에 재현탁시켰다. 유세포분석 데이터는 ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 획득하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1067] 살아있는 세포의 백분율로서, 형질주입되지 않은 대조군 세포는 14.6의 뮤린 4-1BBL에 대한 양성 염색 백분율을 나타내었다. 이와 비교하여 mu4-1BBL△cyt를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 세포의 93.4%가 4-1BBL의 표면 발현에 대해 양성이었다. 이러한 데이터는 pATI-1.75 플라스미드가 인간 세포 표면에서 높은 수준으로 4-1BBL을 발현하는 데 효과적으로 사용될 수 있음을 실증한다.

[1068] **인간 세포에서 발현되는 가용성 TGFβ 수용체 II**

[1069] 가용성 마우스 TGFβ 수용체 II 변이체는 전체 TGFβ 수용체 II의 세포질 및 막횡단 부분을 제거하여 설계되었다. 또한 검출을 위해 FLAG 또는 Fc 태그가 추가되었다. 이러한 변이체는 CMV 프로모터 및 3' WPRE의 제어 하에 pATI-1.75 벡터에 클로닝되었다. 서열는 Sanger 시퀀싱에 의해 확인되었다. 1.5 x 10^6 HEK293T-세포를 하루 전에 폴리-L-리신으로 코팅된 6웰 플레이트에 평판배양하여 80% 합류도를 달성하였다. 형질주입 당일 3g의 DNA를 무혈청 배지에 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하였다. 각각의 시료의 세포 배양 상층액을 인큐베이션 48시간 후에 수집하였다. 일부 상층액은 10kDa 스핀 컬럼(Millipore)에서 농축되었다. 마우스 TGF-β1(R&D Systems)을 사용한 직접 ELISA를 형질주입된 HEK293T-세포의 상층액에서 수행하였다. 450 nm에서의 흡광도를 갖는 ELISA 데이터가 아래 표에 제공되어 있다.

작제물	450 nm 에서의 흡광도
농축된 가용성 마우스 TGFβ 수용체 II-Fc	1.522 ± 0.025
가용성 마우스 TGFβ 수용체 II-Fc	1.508 ± 0.018
배지 (대조군)	0.041 ± 0.002

[1070]

[1071] 이러한 구성의 기능은 T-세포 분석에서 시험되었다. 자기 격리 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 비장에

서 마우스 T-세포를 수합하였다. T-세포는 다양한 농도의 마우스 TGF-베타에서 가용성 수용체가 있거나 없는 항-마우스 CD3ε 항체와 함께 배양되었다. T-세포 활성화는 마우스 TH1 CBA 키트(BioLegend) 및 CD4, CD8, 4-1BB 및 CD69의 유세포분석 라벨링을 사용하여 정량화되었다.

[1072] 이러한 데이터는 면역자극성 박테리아에 의해 인간과 같은 진핵생물 세포로의 전달을 위해 조작된 플라스미드로부터 Fc 도메인에 융합된 세포외 수용체와 같은 이종성 분자를 발현하는 능력을 실증한다.

[1073] **인간 세포로부터 CD3xCD19 이중특이적 T-세포 연계자의 발현**

[1074] 플래그 태그와 His 태그를 포함하는 CD3xCD19 이중특이적 T-세포 연계자(BiTE®)를 CMV 프로모터의 제어 및 3' WPRE를 사용하여 pATI-1.75 벡터에 클로닝하였다. 서열는 Sanger 시퀀싱에 의해 확인되었다. 1.5 x 10^6 HEK293T-세포를 하루 전에 폴리-L-리신으로 코팅된 6웰 플레이트에 평판배양하여 80% 합류도를 달성하였다. 형질주입 당일 3g의 DNA를 무혈청 배지에 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하였다. 각각의 시료의 세포 배양 상층액을 인큐베이션 48시간 후에 수집하였다. 일부 상층액은 10kDa 스핀 컬럼(Millipore)에서 농축되었다.

[1075] 이 작제물의 기능은 CD3xCD19 BiTE®를 Raji 및 Jurkat-Lucia™ NFAT-세포(InvivoGen)에 결합하여 시험하였다. BiTE®는 유세포분석을 사용하여 항-FLAG-APC(BioLegend)를 사용하여 검출되었다. 각각의 조건에 대해 50,000개 세포 중 하나의 웰을 실행하였다. APC 양성 이벤트의 평균 형광 강도(MFI) 및 APC 양성으로 게이트된 세포의 수가 아래 표에 나와 있다.

시료	APC^+ 세포의 수	APC^+ 세포의 평균 형광 강도 (MFI)
항-FLAG-APC 단독과 함께 Raji 세포	41	1439
CD3xCD19 BiTE®와 함께 Raji 세포	10307	7408
농축된 CD3xCD19 BiTE®와 함께 Raji 세포	11248	16045
항-FLAG-APC 단독과 함께 Jurkat 세포	100	1519
CD3xCD19 BiTE®와 함께 Jurkat 세포	18482	4584
농축된 CD3xCD19 BiTE®와 함께 Jurkat 세포	17563	14089

[1076]

[1077] 추가로, 이 구성은 Raji 및 Jurkat-Lucia™ NFAT-세포의 공동배양에서 시험되었다. 세포를 CD3xCD19 BiTE®와 함께 또는 없이 인큐베이션하고, BiTE®의 첨가 후 6시간 및 24시간에 발광(NFAT 활성화로부터 비롯되는 Lucia™ 루시퍼라제 활성에 상응함)이 검출되었다. 이 분석의 발광 판독값은 아래 표에 나와 있다.

실험 조건	농축된 CD3xCD19 BiTE® (발광)	CD3xCD19 BiTE® (발광)	배지 (발광)
2 Raji: 1 Jurkat, 6 시간 시점	12110.5 ± 837.9	3445.0 ± 717.0	44.5 ± 10.6
1 Raji: 1 Jurkat, 6 시간 시점	4337.0 ± 219.2	2057.5 ± 20.5	26.0 ± 15.6
2 Raji: 1 Jurkat, 24 시간 시점	47159.5 ± 1038.7	11274 ± 408.7	114.5 ± 57.3
1 Raji: 1 Jurkat, 24 시간 시점	18614 ± 1540.1	6017 ± 31.1	122 ± 15.6

[1078]

[1079] 이러한 데이터는 본원의 면역자극성 박테리아에 의해 전달될 수 있는 조작된 플라스미드로부터 인간과 같은 진핵 세포에서 scFv, 대안적 항체 작제물 및 이중특이적 T-세포 연계자와 같은 이종성 분자를 발현하는 능력을 실증한다.

[1080] **실시예 10**

[1081] **면역자극성 박테리아 균주는 인간 세포에서 플라스미드를 효율적으로 전달하고 사이토카인을 발현한다**

[1082] **뮤린 IL-2를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 편모-결실된 균주는 인간 단핵구에서의 감염 후 기능적 IL-2 단백질 발현을 유도한다**

[1083] 상기 기재된 대로 플라젤린 유전자 fljB 및 fliC는 asd 유전자가 결실된 *에스. 티피무리움*의 YS1646 균주에서 결실되어 균주 YS1646△asd/△FLG를 생성하였다. 이 균주는 EF-1α 프로모터 및 뮤린 사이토카인 IL-2(muIL-2)가 있는 발현 카세트를 포함하는 플라스미드로 전기천공되었다. 또한, YS1646△asd/△FLG 균주는 비동족 사이토카인에 대한 대조군으로서 뮤린 IL-15δ를 인코딩하는 발현 플라스미드로 전기천공되었다. CMV 프로모터를 사용하여 추가 작제물을 생성하였다.

[1084] 발현 플라스미드를 함유하는 이러한 균주가 인간 단핵구를 감염시키고 뮤린 IL-2의 생산을 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 감염 하루 전에 THP-1 인간 단핵구 세포를 RPMI 1640(Gibco™) + 10% Nu-혈청™(Corning®)에서 평판배양하였다. 세포를 RPMI에서 1시간 동안 MOI 50에서 다양한 균주로 감염시킨 다음 PBS로 3회 세척하고 RPMI + 100 μg/mL 겐타마이신(Sigma)에 재현탁시켰다. 48시간 후 상층액을 96-웰 플레이트에서 수집하고 ELISA(R&D Systems)에 의해 뮤린 IL-2 농도를 평가하였다.

[1085] YS1646△asd/△FLG-IL15δ 대조군 웰에서 검출된 muIL-2의 농도는 예상대로 매우 낮았으며(6.52 pg/mL), 내인성 인간 IL-2 수용체에 대한 일부 교차 반응성을 반영하는 것 같다. 대조적으로, YS1646△asd/△FLG-muIL-2 균주는 평균 35.1 pg/mL의 muIL-2를 유도하였다. 이러한 데이터는 인간 단핵구에서 *에스. 티피무리움* 면역조절 플랫폼 균주로부터 IL-2와 같은 기능적 이종성 단백질을 발현하고 분비하는 가능성을 실증한다.

[1086] **뮤린 IL-2를 인코딩하는 플라스미드 포함하는 편모가 결실되고 pagP가 결실된 균주가 1차 인간 M2 대식세포에서 형질주입된 muIL-2 DNA와 비교하여 향상된 IL-2 발현 입증**

[1087] muIL-2의 발현에 대한 1차 인간 M2 대식세포에서 형질주입(즉, 플라스미드 DNA의 직접 전달) 대 박토펙션(즉, 본원의 면역자극성 박테리아 균주에 의한 플라스미드 DNA의 전달)의 상대적 효율을 비교하였다. 건강한 인간 공여자로부터 분리된 동결된 인간 PBMC를 완전 배지(RPMI-1640 + 1X 비필수 아미노산 + 5% 인간 AB 혈청)에서 해동하고 실온에서 800 RPM에서 10분 동안 원심분리하여 세척하였다. PBMC는 PBS + 2% FBS에 재현탁되었고 단핵구는 CD16 고갈 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 음성으로 분리되었다. 그 후에, 분리되지 않은 단핵구를 PBS + 2% FBS에서 원심분리에 의해 세척하고, 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지에 재현탁시켰다. 그 후에, 분리된 단핵구(웰당 3e5개)를 750마이크로리터의 최종 부피로 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 접종 2일 후, 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 새로운 완전 배지로 교체하였다. 이틀 후(4일차), 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지 500 μL를 웰당 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 6일째에 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 Viromer® RED mRNA 및 플라스미드 형질주입 시약(Lipocalyx)으로 형질주입시키기 위해 사이토카인이 없는 새로운 완전 배지로 교체하였다.

[1088] Viromer® RED를 사용한 형질주입은 키트 지침에 따라 수행되었다. 간단히 말해서, EF-1α 프로모터(EF-1α-muIL-2)의 제어 하에, 또는 CMV 프로모터(CMV-muIL-2)의 제어 하에, muIL-2를 인코딩하는 작제물로부터 500 ng의 플라스미드 DNA 대조군 또는 형질주입되지 않은 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고 0.2 μL의 Viromer® RED 형질주입 시약과 혼합하고 실온에서 15분 동안 배양하여 DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되도록 하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 단핵구를 포함하는 24-웰 플레이트의 각각의 웰에 천천히 첨가하고(2벌 중복으로) 플레이트를 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포의 추가 웰은 EF-1α-muIL-2 작제물를 포함하는 YS1646△asd/△FLG/△pagP 균주 또는 CMV-muIL-2 작제물을 포함하는 YS1646△asd/△FLG/△pagP 균주로 450의 MOI에서 RPMI에서 1시간 동안 감염시킨 다음, PBS로 3회 세척하고, RPMI + 100 μg/mL 겐타마이신(Sigma)에 재현탁시켰다.

[1089] 24시간 후, 세포를 β-머캅토에탄올(β-ME)과 함께 350 μL 완충제 RLT(Qiagen)로 용해하고, 하기와 같이 변형된 Qiagen RNeasy® Mini Kit를 사용하여 RNA 추출을 수행하였다. RNase-Free DNase 키트(Qiagen)를 사용하는

게놈 DNA 제거 단계가 키트에 포함되어 전체 RNA에서 게놈 DNA를 제거하였다. 총 RNA 농도는 NanoDrop™ OneC UV-Vis 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 측정되었다. 각각의 시료의 순도는 A260/A230 흡수 비율에서도 평가되었다. RNA는 역전사가 수행될 때까지 동결-해동 없이 -80℃에서 보관되었다. cDNA 합성은 제조업체의 설명서에 따라 30 μL 반응에서 C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 및 SuperScript™ VILO™ Master Mix(Invitrogen)를 사용하여 0.4-1 μg의 주형 RNA를 사용하여 수행되었다.

[1090] qPCR(정량적 중합효소 연쇄 반응)은 CFX96™ 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad)으로 수행되었다. 뮤린 IL-2용 SYBR® 프라이머(분석 ID: qMmuCED0060978)는 Bio-Rad에서 구입하였다. iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(Bio-Rad)를 사용하여 프로토콜당 qPCR 반응(20 μL)을 수행하였다. Bio-Rad CFX96™ 실시간 시스템의 표준 열순환 프로그램은 30초 동안 95℃ 변성 후 5초 동안 95℃ 및 30초 동안 60℃의 40 주기로 구성되었다. 주형이 없는 대조군을 사용한 반응은 각각의 플레이트의 각각의 프라이머 세트에 포함되었다. 모든 시료을 이중으로 실행하고 평균 Cq 값을 계산하였다. 표적 mRNA의 정량화는 Gapdh(글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소) 기준 mRNA(Bio-Rad, 분석 ID: qMmuCED0027497)를 사용하여 정규화되었다. ΔCq는 표적(mu-IL2)과 기준(Gapdh) 유전자 간의 차이로 계산되었다. ΔΔCq는 처리의 ΔCq 값을 비처리 대조군의 ΔCq 값으로 정규화하여 얻었다. 폴드 증가는 2^-ΔΔCq로 계산되었다. 형질주입되지 않은/감염되지 않은 대조군와 비교하여 증가하는 배수는 아래 표에 나와 있다.

치료군	muIL-2 에서의 배수 증가
YS1646	<1
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*, EF-1α-muIL-2 (감염)	74
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*, CMV-muIL-2 (감염)	668.2
형질주입, EF-1α-muIL-2	249.4
형질주입, CMV-muIL-2	1527

[1091]

[1092] 결과는 형질주입 또는 박토펙션에서 CMV 프로모터가 1차 인간 M2 대식세포에서 EF-1α 프로모터와 비교하여 muIL-2의 우수한 발현을 입증했음을 보여준다. 현재 이용 가능한 가장 효율적인 시약을 사용한 형질주입이 가장 높은 수준의 muIL-2 발현을 제공한 반면, 박토펙션은 또한 높은 수준의 muIL-2를 이끌어내어 본원에 제공된 박테리아 플랫폼을 사용한 이종성 유전자 전달의 높은 효능을 입증하였다.

[1093] **실시예 11**

[1094] **박테리아 균주는 *생체내에서* 면역조절성 플라스미드를 효율적으로 전달하고 강력한 항종양 활성을 실증한다**

[1095] **뮤린 IL-2를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 편모-결실된 균주는 결장직장 암종의 마우스 모델에서 독성 없이 강력한 종양 저해를 유도한다**

[1096] muIL-2 발현 플라스미드를 함유하는 *에스. 티피무리움* 균주가 추가 독성 없이 항종양 효능을 유도할 수 있음을 입증하기 위해, muIL-2 플라스미드를 함유하는 YS1646Δasd/ΔFLG 균주를 MC38 결장직장 선암종 모델에서 피하 측면에서의 안전성 및 효능에 대해 PBS 대조군과 비교하였다. 이 연구를 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)에 MC38 세포(100 μL PBS에서 $5x10^5$ 세포)를 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 11일째에 YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2 균주의 $5x10^5$ CFU 또는 PBS 비히클 대조군을 IV 주사하였다. 종양 측정 및 체중을 매주 2회 기록하였다.

[1097] 결과는 YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2 균주가 PBS(76.7% TGI, P = 0.005, 21일째)와 비교하여 PBS 마우스가 안락사되었을 때 상당한 종양 성장 저해(TGI)를 나타내었으며 종양은 이식 후 40일째까지 잘 제어됨을 보여주었다. 요법은 추가 균주 약독화 없이도 내약성이 우수하였으며 초기의 체중 감소는 일시적이었고 40일째 PBS 대조군과 비교하여 체중이 3.4% 감소하였다. 따라서 muIL-2를 강력하게 발현하는 면역자극 균주 결장직장암 모델에서 안전하고 독성이 없는 방식으로 종양 성장 저해를 억제한다.

[1098] **뮤린 IL-2를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 편모가 결실된 균주는 생체 내에서 IL-2의 종양-특이적 생산을 유도한다**

[1099] 비장에 대한 종양 muIL-2 발현 수준은 전달의 종양-특이적 특성을 확인하기 위해 결정되었다. 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)의 우측 옆구리에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$개 세포)를 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 10일째에 균주 YS1646ΔasdΔFLG-muIL-2의 $5x10^5$ CFU 또는 PBS 비히클 대조군을 IV 주사하였다. 종양 이식 후 31일에 종양 및 비장을 절제하고 2 mL의 PBS에서 gentleMACS™ Octo Dissociator 및 M 튜브(Miltenyi Biotec) 분자 설정을 사용하여 종양 추출물에 대해 처리하였다. 균질액을 1300 RPM에서 10분 동안 회전시키고 상층액을 수집하고 제조업체의 설명서에 따라 muIL-2 CBA 키트(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 결과는 pg/mL의 muIL-2로 정량화되고 조직 그램당 표준화되었다.

[1100] PBS 대조군 종양은 종양 조직 그램당 평균 134 pg/mL로 종양에서 muIL-2의 배경 수준을 나타내었다. YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2 처리된 종양은 종양 조직 그램당 389.9 pg/mL muIL-2의 훨씬 더 높은 평균을 산출하여 종양-체류 골수성 세포에서 플라스미드 전달로 인한 상승된 muIL-2 수준을 검출하는 능력을 실증한다. 균주 YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2를 주사한 마우스의 비장에서 muIL-2 수준은 조직 그램당 평균 6.6 pg/mL였으며, 이는 PBS 대조군보다 낮았다. 종양에 대한 이러한 특이성은 종양을 표적으로 하지 않는 기존의 사이토카인 요법보다 훨씬 안전한 방식으로 IL-2의 면역 조절 수준을 전달할 수 있다.

[1101] **뮤린 공동자극 수용체 리간드 4-1BBL을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 약독화 박테리아 균주는 생체 내에서 치료 효과를 보여준다**

[1102] 4-1BBL과 같은 공동자극성 분자의 종양-특이적 전달이 항종양 효능을 향상시키는지 여부를 결정하기 위해, 4-1BBL(Δcyt)을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 박테리아 균주 CMV 프로모터 및 3' WPRE를 함유하는 결장직장 선암종의 MC38 쥐 모델에서 평가되었다. 이 연구를 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리 마우스)에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS에서 $5x10^5$ 세포)를 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 CMV-4-1BBL(Δcyt)-WPRE 플라스미드를 함유하는 균주 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB의 $1x10^7$ CFU를 10일째에 IV 주사하거나 PBS 비히클 대조군으로 IV 주사하였다.

[1103] 치료는 매우 잘 견디어 3일 후에 완전히 회복된 초기 체중 감소가 2.2%에 불과하였다. PBS와 비교하여 4-1BBL(Δcyt) 요법은 매우 효과적이고 치유적이었다(90.7% TGI, 60% 완전 반응(CR), 30일째). 이러한 데이터는 종양-특이적 방식으로 공동자극성 분자를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아를 전달하는 효능 및 안전성을 실증한다.

[1104] **실시예 12**

[1105] **항시적 유형 I 인터페론 생성을 촉진하는 유전자에서 기능-획득 돌연변이의 식별**

[1106] 심각한 자가염증성 상태와 원인을 알 수 없는 혈관병증을 나타내는 개체의 사례가 발생하며 종종 돌연변이에서 유래된다. 이러한 상태의 원인은 확인되었으며 확인될 수 있다. 이러한 병리의 돌연변이 기반을 확인하는 단계는 하기와 같다. 1단계에서는 증상이 있는 환자와 건강한 개인으로부터 온전한 게놈 DNA를 수득한다. 전체 게놈 시퀀싱을 수행한 다음 인트론과 엑손을 분석한다. 유형 I 인터페론(IFN)의 발현과 관련된 경로에서 유전자 분석 및 생성물의 돌연변이 식별이 수행된다. 이 분석에서, 인코딩된 단백질의 항시적 기능적 활성화 및 후속적으로 유형 I IFN의 지속적인 발현을 유도하는 것으로 알려진 유전자에서 돌연변이가 발견된다.

[1107] 돌연변이의 확인 후, 확인된 돌연변이(들)가 있거나 없는 전장 유전자를 인코딩하는 cDNA는 유형 I IFN의 발현을 측정하는 리포터 세포주로 형질주입된다. 예를 들어, 루시페라제의 발현이 IFN-β에 대한 프로모터의 제어하에 놓이는 리포터 세포주가 생성될 수 있다. 항시적으로 활성인 기능-획득(GOF) 돌연변이는 IFN-β의 발현을 촉진하지만 자극되지 않은 야생형(WT) 단백질은 그렇지 않다. 알려진 STING SAVI(유아기 발병이 있는 STING 관련 혈관병증) 돌연변이의 경우, IFN-β의 WT-STING 자극은 WT-STING을 직접 활성화하기 위해 외인성 수준의 cGAMP를 증가시키는 추가를 필요로 한다. 항시적으로 활성인 돌연변이는 cGAMP와 무관한 방식으로 IFN-β의 발현을 자극한다. 각각의 STING, RIG-I, MDA5, IRF3, 및 IRF7에서의 예시적인 기능-획득 돌연변이는 하기 실시예 15에서 제시되고 본원의 다른 곳에서 논의된다. 기능-획득 돌연변이가 대상체에서 확인되거나 시험관내 돌연변이 및 스크리닝에 의해 생성될 수 있는 이러한 다른 유전자에는 TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 및 SNRNP200이 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[1108] **인간 세포에서 기능적 구성 유형 I IFN 돌연변이체의 발현**

[1109] 인간 STING(대립유전자 R232) 및 IRF3 기능-획득(GOF) 돌연변이체(아래 표 참조)를 pATI-1.75 벡터에 클로닝하고 PCR로 서열을 확인하였다. STING 및 IRF3 GOF 발현 플라스미드가 인간 세포에서 기능적 유형 I IFN을 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 플라스미드는 내인성 STING을 포함하지 않는 HEK293T STING Null 리포터 세포(InvivoGen)를 사용하여 평가되었다. 이 세포는 내인성 IFN-자극 반응 요소(ISRE) 프로모터의 제어 하에 배치된 분비된 배아 알칼리성 인산분해효소(SEAP)를 발현하며, 여기서 ISRE의 인코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여 SEAP ORF로 대체되었다. 유형 I 인터페론 활성은 세포 배양 상층액에서 유형 I IFN 자극 SEAP 생산을 모니터링하여 평가할 수 있다.

[1110] 각 GOF 돌연변이에 의한 유형 I IFN의 상대적 생산을 시험하기 위해, $1x10^5$ 293T-Dual™ Null Cells(InvivoGen)를 하루 전에 24-웰 플레이트에서 폴리-L-리신으로 코팅된 플레이트에 평판배양하여 24시간 동안 80% 합류도를 달성하였다. 형질주입 당일, STING 야생형(WT) 및 IRF3 WT 대조군을 포함하는 STING 및 IRF3 GOF 돌연변이체 패널을 인코딩하는 플라스미드 200 ng, 문헌에 보고되지 않은 것으로 보고된 음성 대조군 STING 돌연변이체 인간 세포(STING V155R 음성 대조군(NC))에서 기능하는 세포를 무혈청 배지에 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하였다. 밤새 배양 후 각각의 시료의 세포 배양 상층액을 채취하고 SEAP 측정에 사용되는 50 µL QUANTI-Blue™ 시약(InvivoGen)에 10 µL의 세포 배양 상층액을 첨가하였다. 유형 I 인터페론 활성화는 650 nm의 흡광도 파장에서 SpectraMax® M3 분광 광도계(Molecular Devices)에서 ISRE 유도 SEAP 활성을 측정하여 결정되었다.

[1111] 하기 표에 나타난 바와 같이, 모든 GOF 돌연변이체는 유형 I IFN 활성을 유도하지 않은 야생형 및 음성 대조군과 비교하여 인간 세포에서 STING 리간드 독립적인 방식으로 유형 I IFN 활성을 유도할 수 있었다. 인간 STING R284G 변이체 및 인간 IRF3 S396D 포스포모방체 변이체에서 가장 높은 수준의 유형 I IFN 유도가 관찰되었다. 이러한 데이터는 기능적, 항시적으로 활성인 STING 및 항시적으로 활성인 포스포모방체 IRF3를 생성하는 GOF 돌연변이체를 인코딩하는 플라스미드의 능력을 뒷받침하며, 이는 cGAMP 독립적인 방식으로 유형 I IFN을 유도할 수 있다.

GOF 돌연변이체	평균 흡광도 (650 nm)	표준 편차
플라스미드 대조군	0.049	±0.002
huSTING WT	0.144	±0.004
huSTING V147L	1.399	±0.015
huSTING N154S	1.382	±0.008
huSTING V155M	1.360	±0.048
huSTING C206Y	1.566	±0.121
huSTING R281Q	1.546	±0.132
huSTING R284G	1.831	±0.039
huSTING V155R (NC)	0.181	±0.014
huIRF3 WT	0.781	±0.073
huIRF3 S396D	1.922	±0.131

[1112]

[1113] **항시적으로 활성인 유형 I IFN 돌연변이를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 편모가 결실된 균주의 감염은 인간 M2 대식세포를 유형 I IFN 생성 M1 대식세포로 변환**한다

[1114] 항시적으로 활성인 유형 I IFN GOF 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 편모가 결실된 균주로 감염된 1차 인간 M2 대식세포가 CXCL10(IP-10으로도 알려짐)과 같은 유형 I IFN 및 다운스트림 케모카인의 생산자로 전환될 수 있는지 여부가 결정되었다.

[1115] 건강한 인간 공여자로부터 분리된 동결된 인간 PBMC를 완전 배지(RPMI-1640 + 1X 비필수 아미노산 + 5% 인간 AB 혈청)에서 해동하고 실온에서 800 RPM에서 10분 동안 원심분리하여 세척하였다. PBMC는 PBS + 2% FBS에 재현탁되었고 단핵구는 CD16 고갈 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 음성으로 분리되었다. 1차 인간 M2 대식세포를 생성하기 위해, 분리되지 않은 단핵구를 PBS + 2% FBS에서 원심분리하여 세척하고, 100 ng/mL 인간 M-CSF

및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지에 재현탁시켰다. 그 후에, 분리된 단핵구(웰당 3e5개)를 750마이크로리터의 최종 부피로 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 접종 2일 후, 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 새로운 완전 배지로 교체하였다. 2일 후(4일째), 100 ng/mL 인간 M-CSF 및 10 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 완전 배지 500 μL를 웰당 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 6일째에 세포 배양 배지를 완전히 흡인하고 사이토카인이 없는 신선한 완전 배지로 교체하였다. 복제 웰을 450 MOI에서 RPMI에서 1시간 동안 다음 균주로 감염시켰다: 야생형(WT) 인간(hu) STING을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646Δasd/ΔFLG; huSTING R284G 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646Δasd/ΔFLG; WT huIRF3을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646Δasd/ΔFLG; huIRF3 S396D 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646Δasd/ΔFLG; 또는 플라스미드 대조군을 포함하는 균주. 그 후에, 세포를 PBS로 3회 세척하고 RPMI + 100 μg/mL 겐타마이신(Sigma)에 재현탁시켰다. 대조군으로 임상 화합물 ADU-S100의 유사체인 STING 작용제 3'5' RpRp c-디-AMP(InvivoGen)를 10 μg/mL의 농도로 세포에 첨가하였다.

[1116] 24시간 후, 세포를 β-ME와 함께 350 L 완충제 RLT(Qiagen)로 용해하고, 하기와 같이 변형된 Qiagen RNeasy® Mini Kit를 사용하여 RNA 추출을 수행하였다. RNase-Free DNase 키트(Qiagen)를 사용하는 게놈 DNA 제거 단계를 포함하여 전체 RNA에서 게놈 DNA를 제거하였다. 총 RNA 농도는 NanoDrop™ OneC UV-Vis 분광광도계(Thermo Scientific)를 사용하여 측정하였다. 각각의 시료의 순도는 A260/A230 흡수 비율에서도 평가되었다. RNA는 역전사가 수행될 때까지 동결-해동 없이 -80℃에서 보관되었다. cDNA 합성은 제조업체의 설명서에 따라 30 μL 반응에서 C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 및 SuperScript™ VILO™ Master Mix(Invitrogen)를 사용하여 0.4-1 μg의 주형 RNA에서 수행되었다.

[1117] qPCR은 CFX96™ 실시간 시스템(Bio-Rad)으로 수행되었다. huCXCL10(qHsaCED0046619), huIRF3(qHsaCID0013122), huSTING(qHsaCID0010565) 및 huIFNβ1(qHsaCED0046851)용 SYBR® 프라이머는 Bio-Rad에서 구입하였다. iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(Bio-Rad)를 사용하여 프로토콜당 qPCR 반응(20 μL)을 수행하였다. BioRad CFX96™ 실시간 시스템의 표준 열순환 프로그램은 30초 동안 95℃ 변성, 5초 동안 95℃ 및 30초 동안 60℃의 40주기로 구성되었다. 주형이 없는 대조군과의 반응은 각각의 플레이트의 각각의 프라이머 세트에 포함되었다. 모든 시료을 이중으로 실행하고 평균 Cq 값을 계산하였다. 표적 mRNA의 정량화는 Gapdh 기준 mRNA(Bio-Rad, qMmuCED0027497)를 사용하여 정규화되었다. ΔCq는 표적 유전자와 기준 유전자의 차이로 계산되었다. ΔΔCq는 처리의 ΔCq 값을 무처리 대조군의 ΔCq 값으로 정규화하여 얻었다. 폴드 증가는 2^-ΔΔCq로 계산되었다. 값은 중복 웰의 평균으로 아래 표에 나와 있다.

[1118] 하기 표에 나타난 바와 같이, WT huSTING 및 huSTING R284G를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646Δasd/ΔFLG 균주는 플라스미드 대조군의 감염과 비교하여 높은 수준의 STING 발현을 유도하였고, 이는 플라스미드 대조군 또는 작은 분자 STING 작용제와 비교하여 상당히 더 높았다. 유사하게는, WT huIRF3 및 huIRF3-S396D를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 균주는 플라스미드 대조군 또는 저분자 STING 작용제보다 상당히 높은 높은 수준의 IRF3 발현을 유도하였다. huSTING R284G 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 박테리아 균주는 WT huSTING을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 균주와 비교하여 IFNβ 및 CXCL10의 훨씬 더 높은 발현을 유도하였다. 이는 항시적으로 활성인 STING GOF 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 균주가 인간 1차 면역억제성 M2 대식세포를 M1, 유형 I IFN 생성 세포로 전환시키는 능력을 실증한다. WT huIRF3 및 huIRF3-S396D를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 균주는 둘 다 더 많거나 유사한 수준의 IFNβ를 유도하였으나 huSTING-R284G 변이체보다 CXCL10을 덜 유도하였다.

GOF 돌연변이체	비형질주입된 대조군과 비교한 배수 발현			
	STING	IRF3	IFNβ	CXCL10
플라스미드 대조군	22.3	0	ND	ND
WT huSTING	24017.1	ND	3.4	3934.5
huSTING R284G	36542.7	ND	20	23484.5
WT huIRF3	22.7	478.9	17.5	10766.2
huIRF3-S396D	30.8	346.4	26.3	15696.1
3'5' RpRp c-di-AMP	244.8	1.11	1.77	594.1

ND = 데이터 없음

[1119]

[1120] 이러한 데이터는 인간 1차 M2 대식세포에서 항시적으로 활성인 GOF 유형 I IFN 변이체의 발현 및 이러한 세포를

M1-유사, 유형 I IFN 생성 세포로 전환시키는 것을 실증한다.

[1121] **실시예 13**

[1122] **항시적 유형 I IFN 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아는 결장직장암의 뮤린 모델에서 강력한 항종양 면역력을 실증한다**

[1123] **인간 GOF STING 돌연변이체는 마우스 모델에서 항종양 활성을 보여준다**

[1124] 항시적으로 활성인 STING 변이체를 인코딩하는 발현 플라스미드를 함유하는 면역자극성 박테리아 균주가 항종양 효능을 유도한다는 것을 입증하기 위해 균주 YS1646Δasd/ΔFLG(플라젤린 유전자 fljB 및 fliC 모두의 넉아웃)를 인간 STING용 발현 카세트를 함유하는 플라스미드로 전기천공하였다. 대립유전자 R232 및 GOF 돌연변이 V155M(huSTING V155M), 인간 신장 인자-1 알파(EF-1α) 프로모터 뒤에 있고, 균주 YS1646 단독 및 PBS 비히클 대조군과 비교하였다. huSTING V155M을 인코딩하는 유전자는 DNA 합성을 사용하여 생성되었고 pATI-1.75 벡터에 클로닝되었다. 항시적으로 활성인 인간 STING 변이체가 마우스에서 항종양 활성을 나타낼 수 있는지 여부를 평가하기 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$ 세포)를 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양을 보유하고 있는 마우스에 균주 YS1646Δasd/ΔFLG-huSTING V155M의 $5x10^5$ CFU, 균주 YS1646 또는 PBS 대조군을 8일째에 IV 주사하였다.

[1125] 결과는 YS1646 모 균주가 항종양 요법으로서 약간만 효과적이었고 치유적이지 않다는 것을 보여주었고(35% TGI, p = NS(중요하지 않음), 28일째), 이전에 발표된 데이터와 일치한다. 그러나 항시적으로 활성인 인간 STING, YS1646Δasd/ΔFLG-huSTING V155M을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 더 약독화된 균주는 PBS와 비교하여 유의한 종양 제어(60% TGI, $p < 0.05$, 28일째)를 이끌어내었고, 치료율은 20%였다. 따라서, 항시적으로 활성인 STING 변이체를 전달하는 면역자극성 박테리아 균주는 종양 성장을 강력하게 억제하고 결장직장 선암종 모델에서 치료 효과를 보여준다.

[1126] **뮤린 인산모방체 IRF3는 생체 내에서 치료 효과를 보여준다**

[1127] 인산모방체 인간 IRF3 변이체의 쥐 버전이 설계되고 muIRF3-S388D로 지정되었으며 결장직장 선암종의 쥐 모델에서 평가되었다. 균주 YS1646Δasd/ΔFLG를 인간 신장 인자-1 알파(EF-1α) 프로모터 뒤에 GOF 돌연변이 S388D(muIRF3-S388D)를 갖는 뮤린 IRF3용 발현 카세트를 함유하는 플라스미드로 전기천공하고, PBS 비히클 대조군과 비교하였다. muIRF3-S388D를 인코딩하는 유전자는 DNA 합성을 사용하여 생성되었고 pATI-1.75 벡터에 클로닝되었다. 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)의 우측 옆구리에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$개 세포)를 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 10일째에 균주 YS1646Δasd/ΔFLG-EF-1α-muIRF3-S388D의 $5 x10^5$ CFU를 IV 주사하고 PBS 비히클 대조군과 비교하였다.

[1128] 이 요법은 초기 체중 감소 최저치가 0.3%에 불과하여 내약성이 매우 우수하였다. PBS와 비교하여 muIRF3-S388D GOF 돌연변이를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 박테리아 균주는 매우 효과적이고 치료적이었다(81.8% TGI, 60% CR, 42일째). 이러한 데이터는 종양-특이적 방식으로 변이체를 유도하는 항시적으로 활성인 유형 I IFN 전달의 효능 및 안전성을 실증한다.

[1129] **뮤린 STING GOF 변이체는 강력하고 치료적인 항종양 활성을 나타낸다**

[1130] 인간 환자에서 발견된 인간 STING 변이체의 뮤린 오르토로그 패널이 설계되었다. 이 오르토로그는 인간 변이체와 하나의 코돈이 다르며 EF-1α 프로모터의 제어 하에 pATI-1.75 벡터에 클로닝되어 다음 돌연변이 세트를 생성한다: muSTING N153S, muSTING V154M, muSTING R280Q, muSTING V146L, muSTING R283G 및 muSTING C205Y 등이 있다. STING 변이체는 항종양 효능에 대해 쥐 선암종의 MC38 모델에서 평가되었다. 연구를 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)의 우측 옆구리에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$개 세포)를 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 10일째 $5 x 10^5$ CFU의 균주 YS1646Δasd/ΔFLG를 IV 주사하였으며, 이는 muSTING N153S, muSTING V154M, muSTING R280Q, muS83 또는 muSTING V146L의 발현을 유도하는 EF-1α이 있는 플라스미드, 또는 스크램블된 shRNA 플라스미드 대조군를 포함하였고, PBS 비히클 대조군과 비교하였다.

[1131] 이 실험에서 균주 YS1646Δasd/ΔFLG-EF-1α-shSCR(스크램블된 플라스미드 대조군)은 YS1646 모 균주보다 훨씬 더 강력한 PBS 대조군(73% TGI, 26일째)과 비교하여 항종양 효능을 입증하였다. 역사적으로 보여주었다. 이는

CpG 및 RNAi 자극 요소와 같은 플라스미드 자체의 본질적으로 면역 자극 요소 때문일 수 있다. 그러나 이 요법은 군 중 가장 내약성이 낮았으며 9.9%의 체중 감소 최하점을 보여 연구의 맨 끝에만 해결되었다. 대조적으로, 항시적으로 활성인 뮤린 STING 돌연변이체는 일시적이고 수일 내에 해결되는 더 낮은 체중 감소를 초래하였다. 이러한 변이체의 상대적인 항종양 효능은 활성의 차이를 나타냈으며, 플라스미드 대조군인 muSTING N153S 및 muSTING R283G와 비교하여 치료 효과 및 강화된 효능을 나타내는 변이체 두 개뿐이다.

뮤린 STING GOF 돌연변이체	TGI vs. PBS, 제 26 일	완전 반응	체중 손실 최하점 및 일수
플라스미드 대조군	73.0%	0/5	9.9%, 제 19 일
muSTING N153S	81.7%	1/5	6.2%, 제 12 일
muSTING V154M	69.4%	0/5	4.3%, 제 12 일
muSTING R280Q	68.7%	0/5	5.4%, 제 12 일
muSTING V146L	63.4%	0/5	2.8%, 제 12 일
muSTING R283G	81.2%	1/5	6.9%, 제 12 일

[1132]

[1133] 후속 연구에서 뮤린 STING C205Y 변이체를 R283G 및 N153S 변이체와 함께 시험하여 항종양 효능을 비교하였다. 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리)의 우측 옆구리에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$개 세포)를 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 9일째에 5×10^5 CFU의 균주 YS1646ΔasdΔFLG를 IV 주사하였고, 이는 EF-1α가 포함된 플라스미드가 muSTING N153S, muSTING R283G 또는 muSTING C205Y의 발현을 유도하고 PBS 비히클 대조군과 비교되었다. 이전과 마찬가지로 STING 변이체는 내약성이 우수하였으며 일시적인 체중 감소만 관찰되어 빠르게 해결되었다. 이는 저분자 STING 작용제에서도 관찰되기 때문에 표적 치료로 인한 것 같다. 2개의 항시적으로 활성인 뮤린 STING 균주인 muSTING N153S 및 muSTING R283G의 효능은 이전 연구와 거의 동일하였으나, 체중 감소는 불분명한 이유로 훨씬 적었다. muSTING C205Y 균주도 치료 효과는 없었지만 매우 효과적이었다.

뮤린 STING GOF 돌연변이체	TGI vs. PBS, 제 29 일	완전 반응	체중 손실 최하점 및 일수
muSTING C205Y	79.4%	0/5	2.6%, 제 13 일
muSTING N153S	79.3%	1/5	2.2%, 제 13 일
muSTING R283G	85.1%	1/5	1.8%, 제 13 일

[1134]

[1135] 이 연구에서 STING으로 치료된 마우스는 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS에서 $5x10^5$ 세포)로 반대쪽 측면 SC에 초기 종양 이식 후 40일째에 다시 공격을 받았다. 모든 종양이 성장한 미접촉 마우스(N=5)와 비교하여 STING으로 치료된 모든 마우스는 종양을 거부하여 적응 면역력의 참여를 입증하였다.

[1136] 이러한 데이터는 결장직장암의 쥐 모델에서 인간 항시적으로 활성인 STING 변이체의 쥐 버전의 안전성과 효능을 검증하고 다른 STING 변이체와 비교하여 효능이 향상된 변이의 작은 하위 집합을 나타낸다. 이러한 고도로 활성적인 변이체는 또한 보호 면역을 이끌어내어 유형 I 인터페론의 종양-특이적 생성의 효능을 보여준다.

[1137] **뮤린 STING GOF 변이체는 IV 투여 후 상당한 종양 리모델링을 보여준다**

[1138] 항시적으로 활성인 STING 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 박테리아 균주가 IV 투여 후 종양 미세환경(TME)을 리모델링하는 능력의 차이를 나타내는지 여부가 다음으로 결정되었다. 이를 시험하기 위해 6-8주령

암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리 마우스)의 우측 옆구리에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$개 세포)를 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 8일째에 muSTING N153S, muSTING V154M, muSTING R280Q, muSTING STING V146L, muSTING R280Q, muS3G V146L의 발현을 유도하는 EF-1α이 있는 플라스미드 또는 플라스미드 대조군을 포함하는 균주 YS1646Δasd/ΔFLG의 5 $x10^5$ CFU를 IV 주사하고, PBS 비히클 대조군과 비교하였다.

[1139] 종양 이식 후 28일째에, 분석을 위해 종양을 절제하였다. 종양을 2-3mm 조각으로 절단하여 2.5 mL 효소 믹스(RPMI-1640 + 1 mg/mL 콜라게나제 IV 및 20 μg/mL DNase I가 포함된 10% FBS)로 채워진 gentleMACS™ C 튜브(Miltenyi Biotec)로 절단하였다. OctoMACS™(Miltenyi Biotec) 특이적 해리 프로그램(마우스 이식 종양)을 사용하여 종양 조각을 해리하고 전체 세포 제제를 37℃에서 45분 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 45분의 인큐베이션 후, OctoMACS™(마우스 이식 종양) 프로그램을 사용하여 제2 분리 라운드를 수행하고, 생성된 단일 세포 현탁액을 70 μM 나일론 메쉬를 통해 50 mL 튜브로 여과하였다. 나일론 메쉬를 5 mL의 RPMI-1640 + 10% FBS로 한 번 세척하고, 새로운 70 μM 나일론 메쉬를 사용하여 새 50 mL 튜브에 세포를 제2로 여과하였다. 나일론 메쉬를 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 5 mL로 세척한 후, 여과된 세포를 1000 RPM에서 7분 동안 원심분리하였다. 생성된 해리된 세포를 PBS에 재현탁하고 염색 공정 전에 얼음에 보관하였다.

[1140] 다양한 GOF muSTING 돌연변이를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 균주 YS1646Δasd/ΔFLG의 투여 후 CD4+ Treg, CD4+ Th1 세포, CD8+ T-세포, 호중구, 단핵구, 수지상 세포(DC), M1 대식세포 및 M2 대식세포를 포함한 살아있는 종양 침윤 백혈구(TIL)의 백분율은 유세포분석에 의해 결정되었다. 유세포분석 염색을 위해 100 μL의 단일 세포 현탁액을 V-바닥 96웰 플레이트의 웰에 접종하였다. 사멸/생존 염색(Zombie Aqua™, BioLegend) 및 Fc 차단 시약(BD Biosciences)을 포함하는 PBS를 웰당 100 μL씩 첨가하고, 암실에서 얼음 위에서 30분간 배양하였다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 형광색소 결합 항체(CD4 FITC 클론 RM4-5; CD8a BV421 클론 53-6.7; F4/80 APC 클론 BM8; CD11b PE-Cy7 클론 M1/70; CD45 BV570 클론 30-F11; CD3 PE 클론 145-2C11; Ly6C BV785 클론 HK1.4; I-A/I-E APC-Cy7 클론 M5/114.15.2; Ly6G BV605 클론 1A8; 및 CD24 PercP-Cy5.5 클론 M1/69; 모두 BioLegend)를 함유하는 PBS + 2% FBS에 재현탁하고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고 유세포분석 고정 완충액(Thermo Fisher Scientific)에 재현탁하였다. 유세포분석 데이터는 ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 획득하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1141] 아래 표에서 볼 수 있듯이, EF-1α 플라스미드 대조군이 있는 YS1646Δasd/ΔFLG 균주는 일부 CD8+ T-세포 모집에도 불구하고 플라스미드의 면역자극 요소로 인해 주로 높은 호중구 침윤을 나타냈다. 대조적으로, 다른 muSTING 변이체는 고유한 종양 침윤 면역 세포 특징을 가지고 있으며, muSTING V146L 및 muSTING R283G와 같은 일부는 PBS 대조군보다 면역억제성 호중구가 더 적다. 가장 유리한 면역 프로파일은 muSTING R283G 및 muSTING N153S 돌연변이가 투여된 마우스의 종양에서 관찰되었으며, CD4+ Th1 세포 및 CD8+ T-세포의 수가 많고 호중구 수가 적으며, 이는 적응 면역 반응에서 생성에 매우 유리한 조건을 나타낸다. 또한, muSTING R283G 및 muSTING N153S 돌연변이체는 PBS와 비교하여 종양에서 유의하게 더 높은 p15e 종양-항원-특이적 CD8+ T-세포를 가졌다. 이러한 경향은 아래와 같이 총 세포 수에서도 요약되었다. 따라서, 항시적으로 활성인 STING 변이체를 종양-체류 골수성 세포에 전달하면 면역억제성 종양 미세환경이 적응성 항종양 표현형으로 완전히 리모델링되고, 박테리아 표현형이 제거되고, 이는 내재성 면역 촉진 및 적응 면역력의 억제를 특징으로 한다.

살아 있는 종양-침윤성 림프구(TIL)의 %

% TIL	IV-투여되는 YS1646Δ*asd*/ΔFLG 균주에서 플라스미드 상에서 인코딩되는 muSTING GOF 돌연변이체						
	PBS	플라스미드 대조군	muSTING N153S	muSTING V154M	muSTING R280Q	muSTING V146L	muSTING R283G
CD4+ Tregs	2.9 ± 1.7	1.8 ± 0.5	3.3 ± 2.6	1.5 ± 0.5	2 ± 0.9	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.4
CD4+ Th1 세포	6.6 ± 3.2	13 ± 4.3	20.7 ± 10.4	13.2 ± 6.1	22.6 ± 7.4	19.5 ± 4.9	25.6 ± 7.8
CD8+ T 세포	16.2 ± 10.2	24.5 ± 11.6	25.8 ± 9.2	16.5 ± 4.4	20.2 ± 7.2	20.8 ± 3.6	27.8 ± 8.7
호중구	11.3 ± 14.2	30.6 ± 17.4	13.5 ± 12.4	21.4 ± 12.5	15.9 ± 11.6	9.1 ± 6.5	6.6 ± 5.9
단핵구	16.6 ± 3.5	12.7 ± 2.7	13.7 ± 3.9	16.4 ± 5.4	15.8 ± 6.5	15.6 ± 2.2	13.5 ± 1.3
DCs	1.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
M1 대식세포	10.2 ± 6.2	3.1 ± 2.1	4.6 ± 2.1	9.4 ± 5	5.6 ± 4.2	8.6 ± 3.7	5.4 ± 2
M2 대식세포	14.9 ± 10.6	4.6 ± 2.6	7.3 ± 3.1	11.6 ± 5.2	8.6 ± 6.3	12.8 ± 5	9.2 ± 4

[1142]

총 세포 카운트

	IV-투여되는 YS1646Δ*asd*/ΔFLG 균주에서 플라스미드 상에서 인코딩되는 muSTING GOF 돌연변이체						
	PBS	플라스미드 대조군	muSTING N153S	muSTING V154M	muSTING R280Q	muSTING V146L	muSTING R283G
CD4+ Tregs	437 ± 230	148 ± 102	530 ± 117	310 ± 114	520 ± 169	297 ± 207	438 ± 176
CD4+ Th1 세포	1108 ± 599	1059 ± 711	3765 ± 917	3349 ± 2869	5864 ± 1618	2961 ± 1800	7463 ± 3240
CD8+ T 세포	2948 ± 3119	1571 ± 601	6152 ± 3820	3898 ± 2823	5446 ± 2454	3266 ± 1277	7566 ± 1782
호중구	1531 ± 1604	2604 ± 1975	3699 ± 4400	4815 ± 3423	4301 ± 3502	1240 ± 1160	1698 ± 1485
단핵구	2871 ± 1472	912 ± 369	3182 ± 1708	3350 ± 1183	4132 ± 1595	2524 ± 1420	3811 ± 996
DCs	233 ± 97	28 ± 18	161 ± 45	82 ± 31	130 ± 90	78 ± 48	135 ± 90
M1 대식세포	2163 ± 2025	227 ± 213	881 ± 316	1797 ± 750	1421 ± 910	1325 ± 856	1524 ± 658
M2 대식세포	3046 ± 2996	334 ± 275	1391 ± 373	2183 ± 608	2189 ± 1402	2043 ± 1237	2612 ±1330

[1143]

[1144] **실시예 14**

[1145] **조합적 플라스미드 발현 카세트를 사용한 다수의 면역조절성 단백질의 발현**

[1146] **멀티-모듈러 플라스미드 발현 카세트는 인간 세포에서 다수의 면역조절성 단백질을 생성하는 능력을 실증한다**

[1147] GOF 유형 I IFN 유도 변이체 및 사이토카인을 인코딩하는 핵산 조합을 CMV 및 EF-1α 프로모터(이중 프로모터 시스템)의 제어 하에 ORF 및 하나의 프로모터(단일 프로모터 시스템) 내에서 두 개의 개별 ORF를 사용하거나 T2A 서열을 사용하여 pATI-1.75 벡터에 클로닝하였다. 작제물은 또한 선택적으로 3' WPRE 또는 HPRE와 같은 전사후 조절 요소(PRE) 및/또는 SV40 또는 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호와 같은 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하였다. 제조된 작제물은 사이토카인 muIL-2, 코돈 최적화가 있는 mu-IL-2(muIL-2 CO), muIL-21, muIL-12p70, muIL-15Rα-IL-15sc, muIL-18 및 muIFN-α2, 및 이의 조합; 돌연변이 R283G를 갖는 muSTING 변이체; 및/또는 세포질 도메인(mu4-1BBLΔcyt)이 결실된 뮤린 공동자극성 분자 4-1BBL을 인코딩하는 것을 포함하였다. 서열은 PCR로 확인하였다.

[1148] GOF 유형 I IFN 유도 변이체를 포함하는 조합 플라스미드가 인간 세포에서 기능적 유형 I IFN을 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 플라스미드를 내인성 STING을 포함하지 않는 HEK293T STING Null 리포터 세포(InvivoGen)를 사용하여 평가하였다. 이 세포는 내인성 IFN-자극 반응 요소(ISRE) 프로모터의 제어 하에 배치된 분비된 배아 알칼리성 인산분해효소(SEAP)를 발현하며, 여기서 ISRE의 인코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여

SEAP ORF로 대체되었다. 유형 I 인터페론 활성은 세포 상층액에서 유형 I IFN 자극 SEAP 생산을 모니터링하여 평가할 수 있다. 또한, 배양 상층액을 수집하고 ELISA에 의해 상대적 사이토카인 농도를 평가하였다.

[1149] 유형 I IFN 및 공동-발현된 사이토카인의 상대적 생산을 시험하기 위해 $2x10^5$ 293T-Dual™ Null Cells(InvivoGen)를 폴리-L-라이신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 하루 전에 평판배양하여 80% 합류도를 달성하였다. 형질주입 당일, 단독으로 또는 다양한 조합으로 GOF 변이체, 사이토카인 및 공동자극성 분자 패널을 인코딩하는 플라스미드 500 ng을 무혈청 배지에 희석시키고 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였다. 각각의 시료의 세포 배양 상층액을 밤새 배양한 후 수집하고 20 μL의 세포 배양 상층액을 180 μL QUANTI-Blue™ 시약(InvivoGen)에 첨가하였다. 유형 I 인터페론 활성화는 650 nm의 흡광도 파장에서 SpectraMax® M3 분광 광도계(Molecular Devices)에서 ISRE 유도 SEAP 활성을 측정하여 결정되었다. muIL-2 작제물은 제조업체의 설명서에 따라 뮤린 IL-2 ELISA(R&D Systems)에서 muIL-2 발현에 대해 평가되었다. muIL-12p70 구조는 제조업체의 권장 사항에 따라 뮤린 IL-12 ELISA(R&D Systems)에서 평가되었다. muIL-15Rα-IL-15sc 작제물의 경우, 키트 지침에 따라 뮤린 IL-15 ELISA(eBioscience)를 사용하였다. IFN-α2는 RAW-Lucia™ ISG 리포터 세포주(InvivoGen)를 사용하여 측정되었다. 뮤린 IL-18 및 뮤린 IL-21을 ELISA(Invitrogen)로 측정하였다.

[1150] 하기 표에 나타난 바와 같이, 분비된 기능성 단백질의 존재를 검출하기 위해 수행된 검정은 다중 조합 페이로드의 높은 발현을 입증하였다. 여기에는 사이토카인 조합뿐만 아니라 유형 I IFN 유도 GOF 변이체 및/또는 공동자극 페이로드와의 조합이 포함된다. 이러한 데이터는 단일 발현 카세트로부터 다중 면역조절 단백질을 발현하는 본원에 제공된 플랫폼의 능력을 검증한다.

[1151]

작제물	단백질 발현							
	STING (Abs 650 nm)	IL-2 (Abs 650 nm)	IL-12 (Abs 650 nm)	IL-15 (pg/mL)	IL-15 (Abs 650 nm)	IFN-α2 (발광)	IL-21 (OD at 450 nm)	IL-18 (pg/mL)
CMV-mu-IL-2		1.995						
CMV-muIL-2 CO-WPRE		2.0073						
EF-1α-muIL-21							1.138 ± 0.1853	
CMV-muIL-21							0.4758 ± 0.0461	
EF-1α-muIL-12p70			0.9052					
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc-WPRE				30140.8 ±535.5	0.8224			
EF-1α-muIFN-α2						14570		

작제물	단백질 발현							
	STING (Abs 650 nm)	IL-2 (Abs 650 nm)	IL-12 (Abs 650 nm)	IL-15 (pg/mL)	IL-15 (Abs 650 nm)	IFN-α2 (발광)	IL-21 (OD at 450 nm)	IL-18 (pg/mL)
CMV-muIFN-α2-WPRE						18658		
CMV-muIL-2 CO_T2A_muIFN-α2-WPRE		2.0998				13066		
CMV-muIL-15Rα-sc T2A muIFN-α2-WPRE				29895.9 ±630.9	1.0125	8571		
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIFN-α2		2.0589				8297		
CMV-muIL-21 + EF-1α-muIFN-α2						8682	0.3797 ± 0.0830	
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIL-21		2.0085					0.7565 ± 0.1271	
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc + EF-1α-muIL-21				12605 ± 278.6	0.2362		0.2963 ± 0.0155	
CMV-muIL-12p70 + EF-1α-muIL-21			1.0893				0.1479 ± 0.001	
CMV-muIL-2 CO-HPRE-bGHpolyA		1.207 ± 0.121						
EF-1α-muSTING-R283G	0.4874 ± 0.0045							
CMV-muSTING-R283G-WPRE	0.4866 ± 0.0511							
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIL-12p70		0.9971 ± 0.0104	0.3303 ± 0.0157					
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc + EF-1α-muIL-12p70			0.3629 ± 0.0242		0.1464 ± 0.0034			
CMV-muIL-18 + EF-1α-muSTING-	0.7096 ± 0.0169							5991.4 ± 1642.0

[1152]

작제물	단백질 발현							
	STING (Abs 650 nm)	IL-2 (Abs 650 nm)	IL-12 (Abs 650 nm)	IL-15 (pg/mL)	IL-15 (Abs 650 nm)	IFN-α2 (발광)	IL-21 (OD at 450 nm)	IL-18 (pg/mL)
R283G-WPRE								
CMV-muIL-12p70_T2A_muIFN-α2 + EF-1α-IL-18-WPRE			0.6538 ± 0.0205			577.3 ± 122.5		12685.0 ± 4402.8
CMV-muIL-12p70 T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE	0.454 ± 0.123		0.4581 ± 0.0158					3805.8 ± 1369.5
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE	0.5867 ± 0.0333				0.2326 ± 0.0049			3626 ± 1248
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc T2A_muIFN-α2 + EF-1α-muIL-18-WPRE					0.3512 ± 0.0172	1802 ± 216.5		6872 ± 1671
CMV-4-1BBL(Δcyt) + EF-1α-muSTING-R283G-WPRE	0.2525 ± 0.0144							

[1153]

[1154] **항시적으로 활성인 유형 I IFN 유도 변이체는 독특한 사이토카인 및 케모카인 프로파일을 갖는다**

[1155] 상기 기재된 바와 같이 시험한 인간 유형 I IFN 유도 GOF 변이체 패널을 사용한 HEK293T 형질주입 실험에서 수합한 상층액은 제조업체의 프로토콜에 따라 인간 항바이러스 CBA 패널(BD Biosciences)을 사용하여 다운스트림 신호전달 차이에 대해 평가되었다. 각각의 형질주입을 이중으로 수행하고 사이토카인 수준을 측정하였다. 두 측정값의 평균을 계산하였다. 평균 사이토카인 분비의 배수 증가는 평균 사이토카인 분비가 1.00으로 설정된 형질주입되지 않은 웰과 비교하여 계산되었다.

[1156] 아래 표에 나타난 바와 같이 세포에서 낮은 수준의 인간 IL-12p70이 생성되었다. 그러나 GOF 변이체를 유도하는 몇몇 인간 유형 I IFN은 인산모방체 IRF3 변이체(huIRF3-S396D)와 여러 항시적으로 활성인 STING 변이체를 포함하여 유형 I IFN-α2 및/또는 IFN-β의 생산을 유도하였다. 다수의 이러한 GOF 변이체는 분비된 CXCL10을 높은 수준으로 생성하여 이러한 발현된 변이체가 T-세포를 종양 미세환경으로 모집하는 능력을 보여준다. 가장 높은 수준의 CXCL10 발현은 돌연변이 R284G를 갖는 huSTING 변이체의 발현 후에 관찰되었다.

[1157] 이러한 데이터는 CXCL10/IP-10과 같은 기능적 다운스트림 사이토카인 및 케모카인의 유도를 위한 유형 I IFN 유도 GOF 변이체를 포함하는 다중 플라스미드 발현 작제물물의 사용을 검증한다. 이러한 변이체는 모두 고유한 서명을 가지고 있으며 STING GOF 변이체는 최고 수준의 CXCL10 분비, 특히 huSTING-R284G(muSTING-R283G에 상응함)를 유도하였다.

작제물	분비된 면역자극성 사이토카인 및 케모카인 (비형질주입과 비교한 배수)			
	IL-12p70	IFN-α2	IFN-β	CXCL10
비형질주입된 대조군	1.00	1.00	1.00	1.00
EF-1α-mCherry 대조군	1.50	1.59	1.50	2.05
EF-1α-huSTING 음성 대조군	1.32	2.10	1.43	2.16
EF-1α-huSTING WT	1.66	1.69	1.46	2.77
EF-1α-huSTING-V147L	1.78	2.35	21.35	332.14
EF-1α-huSTING-N154S	1.52	2.23	23.37	398.99
EF-1α-huSTING-V155M	2.00	2.09	6.02	121.38
EF-1α-huSTING-C206Y	1.39	2.02	16.51	218.38
EF-1α-huSTING-R281Q	1.35	1.35	8.17	301.18
EF-1α-huSTING-R284G	1.46	2.14	13.41	429.40
EF-1α-huIRF3-WT	1.50	1.49	1.50	1.11
EF-1α-huIRF3-S396D	1.93	9.37	38.06	65.89
CMV-muIFN-α2-WPRE	1.03	3.63	1.37	146.49
CMV-muIL-2 CO_T2A_muIFN-α2-WPRE	1.03	1.63	1.37	86.02
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_muIFN-α2-WPRE	1.03	0.80	1.37	40.85

[1158]

[1159] **면역 세포 공동배양 검정은 면역조절성 표적의 최적 조합을 식별한다**

[1160] T-세포 모집 및 활성화를 이끌어내기 위한 사이토카인의 최적 조합을 결정하기 위해 대식세포 및 T-세포 공동배양 분석에서 패널을 시험하였다. 골든 티켓(STING 결핍) 뮤린 1차 골수 유래 대식세포(BMM)를 24-웰 플레이트를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 생성하였다(실시예 6 참조). FuGENE® 형질주입 시약(Promega)을 사용하여 각각의 웰을 적절한 DNA 구성물로 형질주입하였다. 작제물은 muIL-2 CO, muIL-12p70, muSTING-R283G, muIL-2 CO + muIL-12p70, muIL-15Rα-IL-15sc + muIL-12p70, 및 muIL-12p70 + muSTING-R283G + muIL-18을 인코딩하는 것을 포함하였다.

[1161] 형질주입 24시간 후, 유세포분석-기초 사이토카인 비드 어레이(CBA)를 위해 100 μL의 세포 배양 상층액을 웰에서 수합하였다. 동시에, C57BL/6 마우스의 비장 2개를 해부하고, 마우스 T-세포 분리 키트(StemCell Technologies)의 지침에 따라 비장 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 분리하였다. 웰당 200,000개의 분리된 T-세포를 CD3ε 항체(클론 145-2C11, BioLegend)의 유무에 관계없이 웰당 0.5 μg/ml의 최종 농도로 형질주입된 세포에 첨가하였다. T-세포를 형질주입된 세포에 첨가한 후 24시간 및 48시간에 100 μL의 공동배양 상층액을 유세포분석-기초 사이토카인 비드 어레이를 위해 웰에서 수합하였다. 형질주입된 골수 대식세포(BMM) 및 골수 대식세포/T-세포 공동배양물의 상층액을 각각 뮤린 항바이러스 및 뮤린 Th1 특이적 사이토카인 비드 어레이를 사용하여 사이토카인 함량에 대해 분석하였다.

[1162] 아래 표에서 볼 수 있듯이 muSTING-R283G를 인코딩하는 플라스미드만 대식세포에서 CXCL10 생산을 이끌어낸 한편, muIL-12p70을 인코딩하는 플라스미드 단독 또는 다른 단백질과 함께 공동배양된 T-에서 가장 높은 수준의 IFNɣ를 이끌어내었다. CD3ε 자극으로 인한 배경 양보다 더 많은 세포. muIL-12p70 + muIL-18 + muSTING-R283G의 조합은 대식세포로부터의 CXCL10 생산과 공동배양된 T-세포로부터의 IFNɣ 생산을 모두 유도할 수 있었다.

[1163] 이러한 데이터는 단일 플라스미드에서 다중 면역조절 페이로드를 발현할 수 있는 가능성과 이러한 조합의 상승작용 활성을 보여준다.

작제물	BMM에 의한 CXCL10 생성 (pg/mL)	T-세포에 의한 IFNγ 생성 (pg/mL)
비형질주입	3.82	3170.28
CMV-muIL-2 CO-WPRE	5.92	7633.19
EF-1α-muIL-12p70	12.24	11495.65
CMV-muSTING-R283G	662.03	1060.82
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIL-12p70	4.59	8511.19
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc + EF-1α-muIL-12p70	5.82	11694.78
CMV-muIL-12p70_T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18	324.92	9331.51

[1164]

[1165] **병용 면역요법은 결장직장 선암종의 뮤린 모델에서 증강된 항종양 활성을 실증한다**

[1166] 사이토카인 조합의 종양-특이적 전달이 항종양 효능을 향상시키는지 여부를 결정하기 위해 muIL-12p70, muIL-18 및 muSTING-R283G(CMV-muIL-12p70_T2A_ muIL-18 + EF-1α-muSTING-R283G-WPRE)는 결장직장 선암종의 MC38 뮤린 모델에서 평가되었다. 이 연구를 위해 6-8주령 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5마리 마우스)에 MC38 결장직장 선암종 세포(100 μL PBS에서 $5x10^5$ 세포)를 우측 옆구리에 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에게 muIL-12p70, muIL-18 및 muSTING-R283G(CMV-muIL-12p70_T2A_muIL-18 + EF-1α-muSTING-R283G-WPRE)의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 균주 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansB의 $1x10^7$ CFU를 또는 PBS 비히클 대조군과 함께 10일째에 IV 주사하였다.

[1167] 병용 요법은 초기 체중 감소가 3.6%로 3일 후에 완전히 회복되어 내약성이 매우 우수하였다. 이는 이러한 사이토카인(IL-12p70 및 IL-18)의 전신 투여에서 관찰된 독성과 현저한 대조를 이룬다. PBS 대조군과 비교하여 병용 요법은 매우 효과적이고 치유적이었다(92.3% TGI, 60% 치료율, 30일째). 이러한 데이터는 본원에 기재된 면역자극성 박테리아 균주를 사용하여 종양-특이적 방식으로 사이토카인 조합을 전달하는 효능 및 안전성을 실증한다.

[1168] **실시예 15**

[1169] **STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF7, 및 다른 인터페론 경로 유전자에서 향상된 기능-획득 돌연변이를 식별하기 위한 단백질 조작 스크리닝**

[1170] 항시적으로 활성이고 인터페론병증을 촉진하는 기능-획득(GOF) 아미노산 돌연변이는 인간에서 확인된다. 많은 GOF 돌연변이는 유전자의 특정 위치에서 아미노산 코돈을 변경하는 단일 염기쌍 뉴클레오타이드 변화로 인해 발생한다. 예를 들어, STING에서 V147L 돌연변이는 c.439G->C에서의 돌연변이로 인해 발생한다. N154S는 c.461A->G에서의 돌연변이로 인해 발생한다. 그리고 V155M은 c.463G->A에서의 돌연변이로 인해 발생한다. 스크리닝의 목적은 높은 수준의 유형 I 인터페론 발현을 유도하는 항시적으로 활성인 돌연변이체를 확인하는 것이었다. 인간 환자에서 돌연변이되었을 때 인터페론병증을 촉진하는 것으로 알려진 부위에서 설계된 돌연변이는 더 많은 수의 아미노산 치환을 시험할 수 있다. 이 예에서 설계된 아미노산을 사용한 부위 지정 돌연변이유발은 알려진 돌연변이(아래 표 참조, 인터페론병증을 촉진하는 유전자의 돌연변이 나열)의 위치에서 수행되어 높은 수준의 유형 I 인터페론 발현을 유발하는 활성이 강화된 돌연변이를 식별한다.

돌연변이가 도입되는 예시적인 정상 기능 단백질	기능 획득 돌연변이
STING/TMEM173 (SEQ ID NO: 305-309)	S102P
	V147L
	V147M
	N154S
	V155M
	G166E
	C206Y
	G207E
	S102P/F279L
	F279L
	R281Q
	R284G
	R284S
	R284M
	R284K
	R284T
	R197A
	D205A
	R310A
	R293A
	T294A
	E296A
	R197A/D205A
	S272A/Q273A
	R310A/E316A
	E316A
	E316N
	E316Q
	S272A
	R375A
	R293A/T294A/E296A
	D231A
	R232A
	K236A
	Q273A
	S358A/E360A/S366A
	D231A/R232A/K236A/R238A
	S358A
	E360A
	S366A
	R238A

[1171]

돌연변이가 도입되는 예시적인 정상 기능 단백질	기능 획득 돌연변이
	S324A/S326A
MDA5/IFIH1 (SEQ ID NO: 310)	T331I
	T331R
	A489T
	R822Q
	G821S
	A946T
	R337G
	D393V
	G495R
	R720Q
	R779H
	R779C
	L372F
	A452T
RIG-I (SEQ ID NO: 311)	E373A
	C268F

[1172]

[1173] SEQ ID NO: 305-309로 표시된 인간 STING의 서열을 기준으로 아미노산 잔기 R197, D205, R310, R293, T294, E296, S272, Q273, E316, D231, R232, K236, S358, E360, S366 및 R238은 SEQ ID NO: 369로 표시된 뮤린 STING의 서열을 기준으로 각각 아미노산 잔기 R196, D204, R309, R292, T293, E295, S271, Q272, E315, D230, R231, K235, S357, E359, S365 및 R237에 상응한다.

[1174] PCR 프라이머는 유전자의 상동성 cDNA 서열이 있는 5' 및 3' 말단에 설계된 치환으로 생성된다. QuikChange® 부위-특정 돌연변이형성 키트(Agilent) 또는 다른 유사한 상용 키트를 사용하여 설계된 돌연변이를 포함하는 PCR 생성물을 생성한다. PCR 증폭된 플라스미드는 DpnI로 처리된 다음 유능한 이. 콜라이 세포에 전기천공된다. 개별 클론을 분리하고 플라스미드 미니 준비를 수행하고 원하는 돌연변이의 서열 동일성을 확인한다. 그 후에, 더 큰 규모의 플라스미드 준비가 수행되고(Qiagen 키트 사용) DNA가 내인성 STING을 포함하지 않는 HEK293T STING 리포터 세포(InvivoGen)에 형질주입된다. 이러한 세포는 내인성 IFN-β 프로모터의 제어 하에 있는 분비된 루시퍼라제인 Lucia™ 루시퍼라제를 발현한다. IFN-β의 인코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여 Lucia™ 루시퍼라제 ORF로 대체되었다. 항시적으로 활성화된 돌연변이체는 루시페라제 활성의 IFN-β 프로모터 유도 발현의 측정에 의해 확인되고 순위가 매겨진다.

[1175] **실시예 16**

[1176] ***살모넬라 티피무리움*에서의 결실에 상응하는 비활성화 결실을 갖는 면역자극성 박테리아의 다양한 종**

[1177] 상기 실시예는 면역 상주 골수성 세포 및 종양 미세환경에서 살모넬라 티피무리움의 표적화 및 축적을 증가시키고, 종양에 치료제/페이로드를 전달하고, 다른 세포 유형을 감염시키는 능력을 제거한다. 이러한 유전적 변형은 유사하게는, 예를 들어 하기에 기재된 바와 같이 다른 종에서 상응하는 유전자의 결실에 의해 다른 박테리아 균주 및 종에 도입될 수 있다.

[1178] ***에스케리키아 콜라이***

[1179] *lpxM, purM, asd, fliC, fliE, pagP, ansB* 및 *csgD* 유전자의 프레임 내 염색체 결실은 Datsenko 및 Wanner에 기반한 기법을 사용하여 *이. 콜라이* 균주에서 순차적으로 제조하였다(Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 97:6640-6645 (2000)). *이. 콜라이*의 유전자는 하기와 같다:

[1180] 1) *lpxM*, 미리스토일-아실 담체 단백질-의존적 아실트랜스퍼라제를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 945143];

[1181] 2) *purM*, 포스포리보실포르밀글리신아미드 사이클로-리가제를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 946975];

[1182] 3) *asd*, 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 947939];

[1183] 4) *fliC*, 편모 필라멘트 구조 단백질을 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID:

949101];

[1184] 5) *fliE*, 편모 기저체 단백질 FliE를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 946446];

[1185] 6) *pagP*, 지질 IVA 팔미토일트랜스퍼라제를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 946360];

[1186] 7) *ansB*, L-아스파라기나제 2를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 947454];

[1187] 8) *csgD*, DNA-결합 전사 이중 조절자 CsgD를 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 949119]; 및

[1188] 9) *rpsM*, 30S 리보솜 하위단위 단백질 S13(프로모터)을 인코딩함[*이. 콜라이* 균주 K-12, 하위균주 MG1655; NCBI 유전자 ID: 947791].

[1189] 간단히 말해서, 특정 염색체 서열은 상동성 아암에 의해 플랭킹된 선택 가능한 항생제 내성 마커로 대체되고, 이후 cre/loxP 시스템에 의해 제거된다. 각각의 표적 유전자의 5' 및 3' 플랭킹 서열이 확인되고 항생제 내성 유전자의 반대면에 있는 플라스미드 벡터에 클로닝된다. 항생제 내성 유전자와 측면 5' 및 3' 상동성 아암을 포함하는 유전자 결실 카세트는 PCR 증폭되고, 겔 정제되고, 전기천공에 의해 이. 콜라이 균주에 도입된다. 전기천공된 세포를 회수하고 항생제 플레이트에서 형질전환체를 선택한다. 그 후에, 항생제 마커는 cre/loxP 재조합 시스템을 사용하여 처리되며, 여기서 항생제 내성 클론은 cre-발현 온도 의존성 플라스미드로 형질전환된다. 콜로니는 30℃에서 선택되고 42℃에서 연속 계대에 의해 제거된 다음 항생제 내성 손실에 대해 스크리닝된다. 항생제 감수성 클론은 콜로니 PCR 및 서열 분석에 의해 유전자 결실에 대해 확인된다.

[1190] **내성 증가 또는 인간 보체에 내성이 있는 에스케리키아 콜라이 렌더링**

[1191] *이. 콜라이* △*lpxM*/△*purM*/△*asd*/△*fliC*/△*fliE*/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*에서 *살모넬라 티피무리움* rck(보체 사멸에 대한 내성) 유전자, *예르시니아 엔테로콜리티카* 상동체 ail(부착 침입 좌위) 또는 *살모넬라 티피무리움* pgtE(외막 세린 프로테아제) 유전자의 발현은 플라스미드에서 *이. 콜라이* 또는 *에스. 티피무리움* rpsM과 같은 항시적 프로모터의 다운스트림 *rck*, *ail* 또는 *pgtE* 유전자 서열을 인코딩하여(*asd* 보체 시스템 호환 가능) 또는 박테리아 염색체에 삽입하여(*lpxM*, *purM*, *asd*, *fliC*, *fliE*, *pagP*, *ansB* 또는 *csgD* 좌위 중 하나에서) 달성된다.

[1192] ***살모넬라 티피***

[1193] *msbB*, *purM*, *asd*, *fliC*, *flgB*, *pagP*, *ansB* 및 *csgD* 유전자의 프레임 내 염색체 결실은 *이. 콜라이*-기초 균주에 대해 상기 기재된 기술을 사용하여 *에스. 티피* 균주에서 순차적으로 이루어진다.

[1194] *에스. 티피* △msbB/△purM/△asd/△fliC/△*flg*B/△pggP/△ansB/△csgD 균주에서 *살모넬라 티피무리움* rck(보체 사멸에 대한 내성) 유전자, *예르시니아 엔테로콜리티카* 상동체 ail 또는 *살모넬라 티피무리움* pgtE 유전자의 발현은 플라스미드(asd 보체 시스템 호환)에서 *에스. 티피무리움* 또는 *에스. 티피* rpsM과 같은 항시적 프로모터의 다운스트림 *rck*, *ail* 또는 *pgtE* 유전자 서열을 인코딩하거나 박테리아 염색체에 삽입하여 달성된다(*msbB*, *purM*, *asd*, *fliC*, *flgB*, *pagP*, *ansB* 또는 *csgD* 좌위 중 하나에서). 에스. 티피의 유전자는 하기와 같다:

[1195] 1) *msbB*(STY2097), 지질 A 아실트랜스퍼라제를 인코딩함[*살모넬라 엔테리카*하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1248440];

[1196] 2) *purM*(STY2740), 포스포리보실포르밀글리신아미딘 사이클로-리가제를 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1249054];

[1197] 3) *asd*(STY4271), 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1250488];

[1198] 4) *fliC*(STY2167), 플라젤린을 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1248507];

[1199] 5) *flgB*(STY1213), 편모 기저체 간상체 단백질 FlgB를 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1247617];

[1200] 6) *pagP*(STY0677), 항미생물 펩타이드 내성 및 지질 A 아실화 단백질을 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔*

테리카 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1247137];

[1201] 7) *ansB*(STY3259), L-아스파라기나제를 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1249541];

[1202] 8) *csgD*(STY1179), 조절 단백질 CsgD를 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1247585]; 및

[1203] 9) *rpsM*(STY4380), 30S 리보솜 하위단위 단백질 S13(프로모터)을 인코딩함[*살모넬라 엔테리카* 하위종 *엔테리카* 혈청 변이형 티피, 균주 CT18; NCBI 유전자 ID: 1250594].

[1204] ***리스테리아 모노사이토게네스***

[1205] *리스테리아 모노사이토게네스*에서 *purA, purQ, purS, asd, flaA, fliC, flgB* 및 *ansB* 유전자의 프레임 내 염색체 결실은 항생제 내성을 부여하는 pKSV7과 같은 온도에 민감한 셔틀 벡터를 사용하는 대립형질 교환 기술에 의해 달성된다. 저온(30℃)에서는 복제가 가능하지만 고온(43℃)에서는 복제할 수 없다. 각각의 표적 유전자의 5' 및 3' 플랭킹 서열을 확인하고 pKSV7 벡터에 동시에 클로닝한다. 이 벡터는 수용체 리스테리아 모노사이토게네스로 형질전환되고 항생제가 있는 한천 플레이트에 평판배양하여 선택된다. 플라스미드의 염색체 통합은 선택하에 42℃에서 항생제 내성 형질전환체의 연속 계대에 의해 유도된다. 후속적으로 30℃에서 균주를 계대 배양하면 플라스미드가 제2 교차 이벤트를 통해 절제되어 원래의 야생형 유전자로 복귀하거나 5' 및 3' 플랭킹 서열 상동성 아암이 통합되는 세포의 하위 집단이 생성되어, 표적 결실 돌연변이를 생성한다. 항생제 감수성 클론은 이 단계에서 콜로니 PCR 및 서열 분석에 의해 스크리닝된다.

[1206] 보체 내성을 증가시키기 위해 *리스테리아 모노사이토게네스* △purA/△purQ/△purS/△asd/△flaA/△fliC/△flgB/△ansB 균주에서 *살모넬라 티피무리움* rck(보체 사멸에 대한 내성) 유전자, *예르시니아 엔테로콜리티카* 상동체 ail 또는 *살모넬라 티피무리움* pgtE 유전자의 발현은 플라스미드(asd 보체 시스템 호환)에서 P_{hyper} 또는 $P_{헬퍼}$와 같은 항시적 프로모터의 다운스트림 *rck, ail* 또는 *pgtE* 유전자 서열을 인코딩하거나 박테리아 염색체에 삽입하여 달성된다(*purA, purQ, purS, asd, flaA, fliC, flgB* 또는 *ansB* 좌위 중 하나에서). *엘. 모노사이토게네스*의 유전자는 하기와 같다:

[1207] 1) *purA* (lmo0055), 아데닐로숙시네이트 합성효소를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 986069];

[1208] 2) *purQ* (lmo1769), 포스포리보실포르밀글리신아미딘 합성효소 II를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 985972];

[1209] 3) *purS* (lmo1771), 포스포리보실포르밀글리신아미딘 합성효소 하위단위 PurS를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 985970];

[1210] 4) *asd* (lmo1437), 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 986492];

[1211] 5) *flaA* (lmo0690), 플라젤린을 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 987167];

[1212] 6) *fliE* (lmo0712), 편모 후크-기저체 단백질 FliE를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 985062];

[1213] 7) *flgB* (lmo0710), 편모 기저체 간상체 단백질 FlgB를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID 985059]; 및

[1214] 8) *ansB* (lmo1663), 아스파라긴 합성효소를 인코딩함[*리스테리아 모노사이토게네스* 균주 EGD-e; NCBI 유전자 ID: 985663].

[1215] msbB 및 pagP 유전자는 그람 양성 박테리아인 리스테리아 모노사이토게네스에 없다. CsgD는 리스테리아 모노사이토게네스에도 존재하지 않는다. 대신, 리스테리아는 생물막 형성에 관여하는 리스테리아 셀룰로스 결합 단백질을 인코딩하는 lcp를 발현하며, 이 또한 결실될 수 있다.

[1216] ***비피도박테리움 롱검***

[1217] *비피도박테리움 롱검*에서 BL1122(purM), BL0492(asd) 및 BL1142(L-아스파라기나제 전구체 인코딩)의 프레임 내

염색체 결실은 조건부 복제 벡터가 있는 비호환 플라스미드 벡터 시스템을 사용하는 대립형질 교환 기술에 의해 달성된다. pBS423-△repA와 같은 플라스미드 복제 유전자인 repA는 처음에 게놈에 통합되어 항생제 내성을 제공한다. repA 유전자를 인코딩하는 pTBR101-CM과 같은 제2 플라스미드는 후속적으로 형질전환되고 초기 통합체의 절제를 선택하는 제2 교차 이벤트를 촉진한다. 각각의 표적 유전자의 5' 및 3' 플랭킹 서열이 확인되고 repA가 없는 조건부 복제 벡터에 나란히 복제되고 *비피도박테리움 롱검* △BL1122/△BL0492/△BL1142 균주로 형질전환된다. 교차 재조합 이벤트는 상동성 아암 서열에서 발생할 수 있으며 성공적인 플라스미드 통합체가 항생제 플레이트에 대해 선택되고 분리된다. 그 후에, 통합체는 repA의 기능적 사본을 인코딩하는 비호환성 플라스미드로 형질전환되며, 이는 제2 교차 이벤트 및 repA 결핍 플라스미드의 절두를 촉진하며, 이는 플라스미드 비호환성으로 인해 후속적으로 손실된다. 게놈 결실은 콜로니 PCR 및 서열 분석에 의해 확인되고, 나머지 플라스미드는 선별 및 후속 Rif 처리를 제거함으로써 경화된다.

[1218] *비피도박테리움 롱검* △BL1122/△BL0492/△BL1142 균주에서 *살모넬라 티피무리움* rck(보체 사멸에 대한 내성) 유전자, *예르시니아 엔테로콜리티카* 상동체 ail 또는 *살모넬라 티피무리움* pgtE 유전자의 발현은 플라스미드(asd 보체 시스템 호환)에서 $P_{젭}$과 같은 강한 항시적 프로모터의 다운스트림 *rck, ail* 또는 *pgtE* 유전자 서열을 인코딩하거나 박테리아 염색체에 삽입하여 달성된다(BL1122, BL0492 또는 BL1142 좌위 중 하나에서). *비피도박테리움 롱검*의 유전자는 하기와 같다:

[1219] 1) *purM* (BL1122), 포스포리보실포르밀글리신아미딘 사이클로-리가제를 인코딩함[*비피도박테리움 롱검* 균주 NCC2705; NCBI 유전자 ID: 1022669];

[1220] 2) *asd* (BL0492), 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 인코딩함[*비피도박테리움 롱검* 균주 NCC2705; NCBI 유전자 ID: 1023089];

[1221] 3) BL1142, L-아스파라기나제 전구체를 인코딩함(Ntn_아스파라기나제_2_유사; NTN-하이드롤라제 슈퍼계열의 L-아스파라기나제 유형 2-유사 효소)[*비피도박테리움 롱검* 균주 NCC2705; NCBI 유전자 ID: 1023120]; 및

[1222] 4) BL1363 갭(프로모터)[*비피도박테리움 롱검* 균주 NCC2705; NCBI 유전자 ID: 1022828].

[1223] *비피도박테리움 롱검*은 운동성이 없고 플라젤린이 결핍되어 있으며 그람 양성이고 msbB와 pagP가 결여되어 있다. ansB 유전자가 존재하지만, 아스파르테이트로부터 푸마레이트 형성을 촉매하는 아스파르테이트 암모니아-리아제를 인코딩한다(aspA/ansB)[BL0338, *비피도박테리움 롱검* 균주 NCC2705; NCBI 유전자 ID: 1023259].

[1224] ***클로스트리디움 노비***

[1225] NT01CX_RS09765, NT01CX_RS07625 및 NT01CX_RS04325(asd)의 프레임 내 염색체 결실; 플라젤린 유전자 NT01CX_RS04995, NT01CX_RS04990, NT01CX_RS05070, 및 NT01CX_RS05075; 및 클로스트리디움의 편모 기저체 간상체 단백질 유전자 NT01CX_RS05080(flgB), NT01CX_RS05085(flgC) 및 NT01CX_RS05215(flgG)는 독소-항독소 프로모터를 포함하는 역선택 방법을 요구하는 대립유전자 교환 기술에 의해 달성되며, 이는 이. 콜라이 mRNA 인터페라제 mazF와 같은 유도적 프로모터 및 독성 유전자를 필요로 한다. 각각의 표적 유전자의 5' 및 3' 플랭킹 서열은 대립형질 교환 역선택-함유 벡터에서 frt-플랭킹된 항생제 내성 카세트의 반대 면에 있는 구성으로 식별되고 클로닝되며, *클로스트리디움 노비*로 형질전환된다. mazF 유전자는 대립형질 교환 벡터의 유도성 lac 프로모터의 제어 하에 인코딩되며, 유당이 보충된 한천 플레이트에서 성장에 의한 이중 교차 이벤트의 선택을 허용한다. 게놈 결실은 콜로니 PCR 및 서열 분석에 의해 확인된다. 그 후에, Flp-frt 재조합을 사용하여 염색체에서 항생제 내성 카세트를 치료할 수 있다.

[1226] *비피도박테리움 롱검* △BL1122/△BL0492/△BL1142 균주에서 *살모넬라 티피무리움* rck(보체 사멸에 대한 내성) 유전자, *예르시니아 엔테로콜리티카* 상동체 ail 또는 *살모넬라 티피무리움* pgtE 유전자의 발현은 플라스미드(asd 보체 시스템 호환)에서 $P_{젭}$과 같은 강한 항시적 프로모터의 다운스트림 *rck, ail* 또는 *pgtE* 유전자 서열을 인코딩하거나 박테리아 염색체에 삽입하여 달성된다(BL1122, BL0492 또는 BL1142 좌위 중 하나에서). *비피도박테리움 롱검*의 유전자는 하기와 같다:

[1227] *클로스트리디움 노비* △NT01CX_RS09765/△NT01CX_RS07625/△NT01CX_RS04325/△NT01CX_RS04995/△NT01CX_RS04990/△NT01CX_RS05070/△NT01CX_RS05075 /△NT01CX_RS05080/△NT01CX_RS05085/△NT01CX_RS05215 균주에서 *살모넬라 티피무리움* rck(보체 사멸에 대한 내성) 유전자, *예르시니아 엔테로콜리티카* 상동체 ail 또는 *살모넬라 티피무리움* pgtE 유전자의 발현은 플라스미드(상용 가능한 asd 보체 시스템)상에서 P_{thl}, P_{ptb} 또는 다른 변이체와 같은 강한 항시적 프로모터의 다운스트림 *rck, ail* 또는 *pgtE* 유전자 서열을 인코딩하거나 박테

리아 염색체에 삽입하여 달성된다(NT01CX_RS09765, NT01CX_RS07625, NT01CX_RS04325, NT01CX_RS04995, NT01CX_RS04990, NT01CX_RS05070, NT01CX_RS05075, NT01CX_RS05080, NT01CX_RS05085, 또는 NT01CX_RS05215 중 임의의 것에서). *클로스트리디움 노비* 유전자는 하기와 같다.

[1228] 1) NT01CX_RS09765, AIR 합성효소를 인코딩함[*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4541583];

[1229] 2) NT01CX_RS07625, 포스포리보실포르밀글리신아미딘 사이클로-리가제를 인코딩함[*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4540669];

[1230] 3) NT01CX_RS04325 (*asd*), 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 인코딩함[*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4541762];

[1231] 4) NT01CX_RS04995, 플라젤린을 인코딩함[*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4541703];

[1232] 5) NT01CX_RS04990, 플라젤린을 인코딩함[*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4539984];

[1233] 6) NT01CX_RS05070, 플라젤린을 인코딩함[*클로스트리디움 노비* NT; NCBI 유전자 ID: 4539886];

[1234] 7) NT01CX_RS05075, 플라젤린을 인코딩함[*클로스트리디움 노비* NT; NCBI 유전자 ID: 4539699];

[1235] 8) NT01CX_RS05080 (*flgB*), 편모 기저체 간상체 단백질 FlgB를 인코딩함[*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4540637];

[1236] 9) NT01CX_RS05085 (*flgC*), 편모 기저체 간상체 단백질 FlgC를 인코딩함 [*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4540143]; 및

[1237] 10) NT01CX_RS05215 (*flgG*), 편모 기저체 간상체 단백질 FlgG를 인코딩함 [*클로스트리디움 노비* 균주 NT; NCBI 유전자 ID: 4540245].

[1238] *클로스트리듐 노비*는 그람-양성이고, *msbB* 및 *pagP*가 결여되어 있다.

[1239] **실시예 17**

[1240] **인간 STING보다 더 강한 유형 I IFN 신호전달 및/또는 더 약한 NF-κB 신호전달을 유도하는 척추동물 STING 변이체를 발현하도록 변형된 면역자극성 박테리아**

[1241] STING 신호전달은 두 가지 신호 경로를 활성화한다. 제1 경로는 TANK 결합 키나제 1(TBK1)/IRF3 축으로, 유형 I IFN을 유도하고 수지상 세포(DC)를 활성화하고 종양 항원을 교차 제시하여 CD8+ T-세포-매개 항-종양 면역을 활성화시킨다. 제2 경로는 활성화된 B 세포(NF-κB) 신호전달 축의 핵 인자 카파-경쇄 증강 인자로, 전염증 반응을 유발하지만 항종양 면역력에 필요한 DC 및 CD8+ T-세포의 활성화에는 영향을 미치지 않는다. 박테리아-기초 암 면역 요법은 종양 항원 교차 제시 및 지속적인 항종양 면역력을 촉진하는 데 필요한 CD8+ T-세포를 모집하고 활성화하기 위해 유형 I IFN을 유도하는 능력이 제한적이다. 따라서, 유형 I IFN 신호전달을 유도 및/또는 증가시키고 NF-κB 신호전달을 감소시켜 CD8+ T-세포-매개 항종양 면역력의 유도를 증가시키고 박테리아의 치료 효능을 향상시키는 면역자극성 박테리아가 본원에 제공된다. 위에서 설명된 면역자극성 박테리아는 야생형 STING과 비교하여 유형 I IFN의 유도를 증가시키거나 유형 I IFN의 발현을 항시적으로 만들 수 있는 STING의 기능-획득 돌연변이인 변형된 STING 단백질을 인코딩한다. 이 실시예에서(또한 상세한 설명에 기재됨), STING 단백질은 NF-κB 신호전달 활성을 감소 또는 제거하고, 유형 I IFN을 유도하는 능력을 유지하도록 변형되고, 및/또는 증가되거나 항시적인 유형 I IFN 발현에 대해 변형된다. 이는 항종양 면역력을 유도하고 일반적으로 박테리아 병원체에 의한 감염으로 인해 발생하는 NF-κB 신호를 유도하지(또는 덜 유도하는) 면역자극성 박테리아를 생성한다.

[1242] 다른 종의 STING 단백질은 다른 수준의 유형 I IFN 및 NF-κB 신호전달 활성을 나타낸다. 예를 들어, 인간 및 마우스 세포에서 STING 신호전달은 강력한 유형 I IFN 반응 및 약한 전염증성 NF-κB 반응을 초래한다. 이와 비교하여 연어 및 제브라피쉬와 같은 지느러미가 있는 어류의 STING 신호전달은 주로 NF-κB-기초 반응의 강력한 활성화를 이끌어내며, 이는 IRF3-기초(즉, 유형 I IFN 유도) 반응과 비교하여 100배 이상 높다. 태즈메이니아 데빌과 같은 다른 종에서 STING 신호전달은 유형 I IFN 반응을 나타내지만 본질적으로 NF-κB 반응은 없다. 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 NF-κB 반응의 수반되는 유도 없이 유형 I IFN 반응을 유도하는 STING의 능력을 이용하기 위해 태즈메이니아 데빌 STING과 같은 비인간 종으로부터의 STING을 인코딩한다. 본원에 기재된 바와 같이, 이러한 비-인간 STING 단백질은 또한 돌연변이에 의해 변형되어 유형 I IFN 반응을 증가시키거나 이

를 항시적으로 제공한다. 인간 STING에서 이러한 효과를 갖는 확인된 돌연변이는 비인간 STING 단백질에 도입된다. 상응하는 잔기는 정렬에 의해 식별된다.

[1243] STING의 C-말단 테일(CTT)가 NF-κB 신호전달 활성을 거의 또는 전혀 나타내지 않는 제2(예를 들어, 비인간) 종의 STING 단백질로부터의 CTT로 인간과 같은 한 종에서 대체된 키메라가 또한 제공된다. CTT는 STING 인산화 및 IRF3 모집에 필요한 서열 모티프를 포함하는 약 40개 아미노산의 구조화되지 않은 스트레치이다. 유형 I IFN과 NF-κB 신호전달 간의 균형을 변경하여 다운스트림 면역을 형성할 수 있다. 이는 IRF3, TBK1 및 TRAF6 결합 모듈을 포함하여 CTT의 독립적인 모듈을 통해 제어된다. 예를 들어, 인간 STING 잔기 S366(예를 들어, SEQ ID NO: 305-309 참조)은 CTT에서 LxIS 모티프의 일부인 1차 TBK1 인산화 부위이며, 이는 IRF3 결합에 필요한 반면, 제2 PxPLR 모티프는, 잔기 L374를 포함하여 TBK1 결합에 필요하다. LxIS 및 PxPLR 모티프는 모든 척추동물 STING 대립유전자에서 고도로 보존된다. 예를 들어, 인간 STING의 CTT를 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 교체하면 유형 I IFN 반응을 유도하지만 NF-κB 반응은 유도하지 않는 STING 변이체가 생성된다.

[1244] 이 실시예에서, 면역자극성 박테리아는 야생형(WT) 인간 STING과 비교하여 증가된 유형 I IFN 신호전달 및/또는 감소된 NF-κB 신호전달을 갖는 STING 변이체를 발현하도록 조작된다(예를 들어, SEQ ID NO: 305-309 참조). STING 변이체는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 또는 어류와 같은 인간이 아닌 척추동물에서 유래할 수 있다. 비-인간 STING 단백질이 유래된 종에는 태즈메이니아 데빌(*사르코필루스 하리시이*; SEQ ID NO: 349), 마모셋(*칼리트릭스 야쿠스*; SEQ ID NO: 359), 소(*보스 타우루스*; SEQ ID NO: 360), 고양이(*펠리스 카투스*; SEQ ID NO: 356), 타조(*스트루티오 카멜루스 오스트랄리스*; SEQ ID NO: 361), 따오기(*니포니아 니폰*; SEQ ID NO: 362), 실러캔스(*라티메리아 칼룸내*, SEQ ID NO: 361) ID NOs:363-364), 야생돼지(*수스 스크로파*; SEQ ID NO: 365), 박쥐(*로우세투스 애깁티아쿠스*; SEQ ID NO: 366), 바다소(*트리케쿠스 마나투스 라티로스트리스*; SEQ ID NO: 367), 은상어(*칼로린쿠스 밀리이*) ; SEQ ID NO: 368), 및 마우스(*무스 무스쿨루스*; SEQ ID NO: 369)가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 이러한 척추동물 STING 단백질은 인간 세포에서 면역 신호전달을 쉽게 활성화하여 STING 신호전달의 분자 기전이 척추동물에서 공유됨을 나타낸다(예를 들어, de Oliveira Mann 등 (2019) Cell Reports 27:1165-1175 참조). 이러한 종의 STING 단백질은 인간 STING보다 적은 NF-κB 신호 활성화 및/또는 더 많은 유형 I IFN 신호 활성화를 유도한다(예를 들어, de Oliveira Mann 등 (2019), 도 1a 참조). 상이한 비-인간 종으로부터의 야생형 또는 변형된 STING 단백질은 인간 및 비-인간 STING 단백질의 키메라와 같이 본원의 면역자극성 박테리아에 의해 발현될 수 있다.

[1245] 다양한 비-인간 STING 단백질이 변형되어 비-인간 STING이 인간 STING보다 더 낮은 NF-κB 활성화 및 선택적으로 더 높은 유형 I 인터페론 활성화를 갖는다. 이러한 비인간 STING 단백질은 돌연변이 또는 돌연변이들을 포함하도록 변형되어 세포질 핵산 리간드(예를 들어, CDN)의 부재 하에 증가된 유형 I IFN 활성을 갖거나 항시적으로 작용한다. 돌연변이는 일반적으로 인간의 인터페론병증과 관련된 기능-획득 돌연변이와 같은 아미노산 돌연변이이다. 상응하는 돌연변이는 비인간 종 STING 단백질에 도입되고, 여기서 상응하는 아미노산 잔기는 정렬에 의해 확인된다. 예를 들어, 돌연변이에는 SEQ ID NO: 305-309에 기재된 인간 STING의 서열을 기준으로 S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, 및 S324A/S326A가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 다른 종의 STING에 해당하는 돌연변이가 아래 표에 나열되어 있다. 비-인간 STING 단백질의 생성된 변이체는 이러한 돌연변이 중 하나 이상, 및 임의로 CTT 대체, 및 임의로 TRAF6 결합 부위의 결실을 포함한다.

[1246] STING 변이체는 인산화 부위에서 아미노산 세린(S) 또는 트레오닌(T)을 인산화 유사체인 아스파르트산(D)으로 하나 이상 대체하여 활성을 증가시키거나 구성하는 것을 포함한다. 다른 돌연변이에는 STING에서 324-326 SLS -> ALA와 같은 인산화 부위 또는 부위의 결실 또는 교체, 및 STING에서 NF-κB 신호전달을 감소시키기 위해 인산화 부위를 제거하기 위한 다른 교체가 포함된다. 추가로, 다른 종의 STING이 있는 인간 STING의 키메라가 제공되며, 여기서 인간 STING의 C-말단 테일(CTT)는 더 낮은 NF-κB 신호 활성 및/또는 더 높은 수준을 갖는 다른 종의 STING의 CTT로 대체된다. 유형 I IFN 신호 활성. 변이체 STING 단백질은 NF-κB 신호전달을 감소시키기 위해 CTT의 TRAF6 결합 부위에 결실을 포함할 수 있다.

인간 STING (SEQ ID NO: 305-309)	태즈메이니아 데빌 STING (SEQ ID NO:349)	마모셋 STING (SEQ ID NO:359)	소 STING (SEQ ID NO:360)	고양이 STING (SEQ ID NO:356)	타조 STING (SEQ ID NO:361)	따오기 STING (SEQ ID NO:362)	실러캔스 STING (SEQ ID NO:363)
S102P	S102P	S102P	S102P	S102P	C107P	V106P	A102P
V147L	V147L	V145L	I147L	V146L	M152L	M151L	I147L
V147M	V147M	V145M	I147M	V146M	-	-	I147M
N154S	N154S	N152S	N154S	N153S	N159S	N158S	G154S
V155M	V155M	V153M	V155M	V154M	V160M	V159M	V155M
G166E	G166E	G164E	G166E	G165E	G171E	G170E	G166E
C206Y	C206Y	C204Y	C206Y	C205Y	C211Y	C210Y	C206Y
G207E	S207E	G205E	G207E	G206E	N212E	D211E	S207E
S102P/ F279L	S102P/ F279L	S102P/ F277L	S102P/ F279L	S102P/ F278L	C107P/ F283L	V106P/ F283L	A102P/ F279L
F279L	F279L	F277L	F279L	F278L	F283L	F283L	F279L
R281Q	R281Q	R279Q	R281Q	R280Q	R285Q	R285Q	K281Q
R284G	R284G	R282G	R284G	R283G	R288G	R288G	R284G
R284S	R284S	R282S	R284S	R283S	R288S	R288S	R284S
R284M	R284M	R282M	R284M	R283M	R288M	R288M	R284M
R284K	R284K	R282K	R284K	R283K	R288K	R288K	R284K
R284T	R284T	R282T	R284T	R283T	R288T	R288T	R284T
R197A	R197A	R195A	R197A	R196A	K202A	K201A	R197A
D205A	D205A	D203A	D205A	D204A	S210A	S209A	S205A
R310A	R310A	R308A	R310A	R309A	R314A	R314A	R310A
R293A	R293A	R291A	R293A	R292A	R297A	R297A	R293A
T294A	T294A	T292A	T294A	I293A	T298A	T298A	T294A
E296A	E296A	E294A	E296A	E295A	E300A	E300A	K296A
R197A/ D205A	R197A/ D205A	R195A/ D203A	R197A/ D205A	R196A/ D204A	K202A/ S210A	K201A/ S209A	R197A/ S205A
S272A/ Q273A	S272A/ Q273A	S270A/ Q271A	S272A/ Q273A	S271A/ Q272A	S276A/ Q277A	S276A/ Q277A	S272A/ K273A

[1247]

인간 STING (SEQ ID NO: 305-309)	태즈메이니아 데빌 STING (SEQ ID NO:349)	마모셋 STING (SEQ ID NO:359)	소 STING (SEQ ID NO:360)	고양이 STING (SEQ ID NO:356)	타조 STING (SEQ ID NO:361)	따오기 STING (SEQ ID NO:362)	실러캔스 STING (SEQ ID NO:363)
R310A/ E316A	R310A/ E316A	R308A/ E314A	R310A/ E316A	R309A/ E315A	R314A/ E320A	R314A/ E320A	R310A/ E318A
E316A	E316A	E314A	E316A	E315A	E320A	E320A	E318A
E316N	E316N	E314N	E316N	E315N	E320N	E320N	E318N
E316Q	E316Q	E314Q	E316Q	E315Q	E320Q	E320Q	E318Q
S272A	S272A	S270A	S272A	S271A	S276A	S276A	S272A
R375A	R377A	R373A	R374A	R373A	R371A	R379A	K376A
R293A/ T294A/ E296A	R293A/ T294A/ E296A	R291A/ T292A/ E294A	R293A/ T294A/ E296A	R292A/ I293A/ E295A	R297A/ T298A/ E300A	R297A/ T298A/ E300A	R293A/ T294A/ K296A
D231A	D231A	D229A	D231A	D230A	T236A	T235A	N231A
R232A	R232A	R230A	R232A	R231A	R237A	R236A	R232A
K236A	K236A	K234A	K236A	K235A	K241A	K240A	K236A
Q273A	Q273A	Q271A	Q273A	Q272A	Q277A	Q277A	K273A
S358A/ E360A/ S366A	S360A/ E362A/ S368A	S356A/ E358A/ S364A	S357A/ E359A/ S365A	S356A/ E358A/ S364A	S354A/ D356A/ S362A	S362A/ E364A/ S370A	S359A/ E361A/ S367A
D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D229A/ R230A/ K234A/ R236A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D230A/ R231A/ K235A/ R237A	T236A/ R237A/ K241A/ R243A	T235A/ R236A/ K240A/ R242A	N231A/ R232A/ K236A/ R238A
S358A	S360A	S356A	S357A	S356A	S354A	S362A	S359A
E360A	E362A	E358A	E359A	E358A	D356A	E364A	E361A
S366A	S368A	S364A	S365A	S364A	S362A	S370A	S367A
R238A	R238A	R236A	R238A	R237A	R243A	R242A	R238A
S324A/ S326A	S326A/ S328A	L322A/ S324A	S324A/ S326A	S323A/ S325A	F328A/ S330A	S328A/ S330A	S327A

[1248]

인간 STING (SEQ ID NO: 305-309)	야생돼지 STING (SEQ ID NO:365)	박쥐 STING (SEQ ID NO:366)	바다소 STING (SEQ ID NO:367)	은상어 STING (SEQ ID NO:368)	마우스 STING (SEQ ID NO:369)
S102P	S102P	S103P	S105P	S98P	S102P
V147L	I147L	V148L	I150L	I148L	V146L
V147M	I147M	V148M	I150M	I148M	V146M
N154S	N154S	N155S	N157S	N155S	N153S
V155M	V155M	V156M	V158M	V156S	V154M
G166E	G166E	G167E	G169E	G167E	G165E
C206Y	C206Y	C207Y	C209Y	C206Y	C205Y
G207E	G207E	G208E	G210E	K207E	G206E
S102P/F279L	S102P/F279L	S103P/F280L	S105P/F282L	S98P/F280L	S102P/F278L
F279L	F279L	F280L	F282L	F280L	F278L
R281Q	R281Q	-	R284Q	K282Q	R280Q
R284G	R284G	R285G	R287G	R285G	R283G
R284S	R284S	R285S	R287S	R285S	R283S
R284M	R284M	R285M	R287M	R285M	R283M
R284K	R284K	R285K	R287K	R285K	R283K
R284T	R284T	R285T	R287T	R285T	R283T
R197A	R197A	R198A	R200A	K197A	R196A
D205A	D205A	D206A	D208A	S205A	D204A
R310A	R310A	R311A	R313A	R311A	R309A
R293A	R293A	R294A	R296A	R294A	R292A
T294A	T294A	T295A	T297A	T295A	T293A
E296A	E296A	-	E299A	K297A	E295A
R197A/D205A	R197A/D205A	R198A/D206A	R200A/D208A	K197A/S205A	R196A/D204A
S272A/Q273A	S272A/Q273A	S273A/Q274A	S275A/Q276A	T273A/N274A	S271A/Q272A
R310A/E316A	R310A/E316A	R311A/E317A	R313A/E319A	R311A/D317A	R309A/E315A
E316A	E316A	E317A	E319A	D317A	E315A
E316N	E316N	E317N	E319N	D317N	E315N
E316Q	E316Q	E317Q	E319Q	D317Q	E315Q
S272A	S272A	S273A	S275A	T273A	S271A
R375A	S374A	R376A	R383A	R374A	R374A
R293A/ T294A/ E296A	R293A/ T294A/ E296A	R294A/T295A	R296A/ T297A/ E299A	R294A/ T295A/ K297A	R292A/ T293A/ E295A
D231A	D231A	D232A	D234A	D231A	D230A
R232A	R232A	R233A	C235A	R232A	R231A
K236A	K236A	K237A	K239A	K236A	K235A
Q273A	Q273A	Q274A	Q276A	N274A	Q272A
S358A/ E360A/ S366A	S357A/ E359A/ S365A	H359A/ E361A/ S367A	S366A/ E368A/ S374A	S359A/ E361A/ S367A	S357A/ E359A/ S365A
D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D232A/ R233A/ K237A/ R239A	D234A/ C235A/ K239A/ R241A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D230A/ R231A/ K235A/ R237A
S358A	S357A	H359A	S366A	S359A	S357A
E360A	E359A	E361A	E368A	E361A	E359A
S366A	S365A	S367A	S374A	S367A	S365A
R238A	R238A	R239A	R241A	R238A	R237A
S324A/S326A	S324A/S326A	S325A/S327A	S327A/S329A	G325A/S330A	S323A/S325A

[1249]

[1250] 예를 들어, 변형된 STING 변이체는 돌연변이 C206Y(SEQ ID NO: 350) 또는 R284G(SEQ ID NO: 351)를 갖는 태즈메이니아 데빌 STING; 인간 STING의 CTT가 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 대체된 변이체(SEQ ID NO: 352); 돌연변이 C206Y(SEQ ID NO: 353) 또는 R284G(SEQ ID NO: 354)를 갖는 인간 STING, 여기서 CTT는 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 대체됨; TRAF6 결합 도메인(잔기 377-379(DFS)에 상응함)에 결실이 있는 야생형 인간 STING(SEQ ID NO: 355); 돌연변이 C205Y(SEQ ID NO: 357) 또는 R283G(SEQ ID NO: 358)를 갖는 고양이 STING; 및 다른 이러한 변형된 STING 변이체가 포함된다.

[1251] STING 돌연변이에 대한 상응하는 아미노산 잔기를 결정하기 위해, 다양한 비인간 종의 야생형 STING 단백질 서열 각각을 야생형 인간 STING 단백질 서열(SEQ ID NO: 305(R232)의 대립유전자 변이체의 대립형질) 또는 SEQ ID NO: 306(H232 대립형질)). ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/에서 사용 가능한 Kalign 서열 정렬 도구 또는 ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/에서 사용 가능한 EMBOSS 바늘 서열 정렬 도구를 사용하여 정렬을 수행하였다. 도 2 내지 14는 각각 태즈메이니아 데블, 마모셋, 소, 고양이, 타조, 따오기, 실러캔스, 제브라피쉬, 야생돼지, 박쥐, 바다소, 은상어 및 마우스 종의 STING 단백질과 비교한 인간 STING에 대한 예시적인 서열 정렬을 묘사한다.

[1252] **STING GOF 하이브리드 변이체는 수지상 세포에서 NF-κB에 대한 유형 I 인터페론의 활성 비율이 크게 향상되었음을 보여준다.**

[1253] 마우스에서 최고 수준의 CD8+ T-세포 케모카인 CXCL10을 이끌어내는 최적의 STING GOF 돌연변이를 결정하기 위해 STING 돌연변이 패널을 뮤린 1차 골수 유래 수지상 세포(BMDC)에서 시험하였다. 여기에는 항시적으로 활성인 인간 GOF 돌연변이 C206Y(tazSTING C206Y; SEQ ID NO: 350) 또는 R284G(tazSTING R284G; SEQ ID NO: 351)가 있는 태즈메이니아 데빌 STING; 항시적 GOF 돌연변이 C205Y(muSTING C205Y) 또는 R283G(muSTING R283G)를 갖는 뮤린 STING; 항시적 GOF 돌연변이체 C205Y(catSTING C205Y; SEQ ID NO: 357) 또는 R283G(catSTING R283G; SEQ ID NO: 358)를 갖는 cat STING; 뿐만 아니라 인간 STING의 CTT(SEQ ID NO: 370)가 태즈메이니아 데빌 STING(SEQ ID NO: 371)의 CTT로 대체되고 야생형 인간 STING(huSTING tazCTT; 참조, 예를 들어, , SEQ ID NO: 352), 또는 인간 STING GOF 돌연변이 C206Y(huSTING C206Y tazCTT; 예를 들어, SEQ ID NO: 353 참조), 또는 R284G(huSTING R284G tazCTT; 예를 들어, SEQ ID NO: 354 참조). 또한 항시적 GOF 돌연변이 C206Y(huSTING C206Y) 또는 R284G(huSTING R284G)를 갖는 인간 STING 변이체가 포함되었다.

[1254] 이를 시험하기 위해 뮤린 골수를 분리하고 1.5 mL Eppendorf 튜브에 플러싱하고 5분 동안 1200RPM으로 회전하여 골수성 세포를 수집하였다. 세포를 RPMI-1640 + 10% FBS에서 1회 세척한 다음, RPMI-1640 + 10% FBS 및 20 ng/mL GM-CSF의 96웰 TC 처리 플레이트에 시딩하였다. 2일마다 배지의 50%를 새로운 완전 배지로 교체하였다. 6일 후, 비부착 세포를 웰에서 피펫으로 분리하고 형질주입을 위해 96웰 플레이트에서 RPMI-1640 + 10% FBS에서 웰당 1e5 세포로 다시 시딩하였다. 세포는 제조업체의 설명서에 따라 Viromer® RED를 사용하여 형질주입되었다. 간단히 말해서, STING GOF 돌연변이 패널의 플라스미드 DNA 200ng 및 형질주입되지 않은 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고 Viromer® RED 0.08 μL와 혼합하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 DNA/Viromer® RED 복합체를 형성한다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 천천히 첨가하고(2벌 중복으로) 플레이트를 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 상층액을 48시간에 수합하고 제조업체의 프로토콜에 따라 유세포분석-기초 사이토카인 비드 어레이(CBA)를 사용하여 쥐 CXCL10(IP-10)에 대해 분석하였다.

[1255] 하기 표에 나타난 바와 같이, 뮤린 CXCL10의 가장 높은 발현을 유도한 작제물은 GOF 돌연변이 R284G를 포함하고 인간 STING의 CTT를 태즈메이니아 데빌 STING(huSTING R284G tazCTT)의 CTT로 대체한 인간 STING이었다. CXCL10의 다음으로 높은 발현은 GOF 돌연변이 C206Y(huSTING C206Y)를 포함하는 인간 STING 변이체 및 인간 STING GOF 돌연변이 R284G(tazSTING R284G)를 포함하는 태즈메이니아 데빌 STING 작제물에 의해 유도되었다. 인간 STING GOF 돌연변이체(huSTING C206Y 및 huSTING R284G)는 상응하는 뮤린 STING GOF 돌연변이체(각각 muSTING C205Y 및 muSTING R283G)보다 더 강력하였으며, 이는 1차 뮤린 수지상 세포에서 동일한 GOF 돌연변이를 포함하는 고양이 STING 돌연변이체(각각 catSTING C205Y 및 catSTING R283G)보다 훨씬 덜 강력하였다.

작제물	muCXCL10 (pg/mL)
비형질주입	11.48 ± 3.889
huSTING C206Y	861.0 ± 58.48
huSTING R284G	769.7 ± 95.16
muSTING C205Y	194 ± 27.15
muSTING R283G	230.1 ± 1.018
huSTING C206Y tazCTT	366.6 ± 42.61
huSTING R284G tazCTT	1326 ± 137.9
tazSTING C206Y	808.8 ± 95.78
tazSTING R284G	831.3 ± 30.15
catSTING C205Y	480.7 ± 24.94
catSTING R283G	376.2 ± 6.682

[1256]

[1257] 이 데이터는 태즈메이니아 데빌과 같은 다른 종에서 얻은 STING 단백질이 항시적 GOF 인간 STING 돌연변이와 결합되어 강력한 T-세포 모집 케모카인을 이끌어낼 수 있음을 보여준다.

[1258] **STING GOF 하이브리드 변이체는 인간 단핵구에서 NF-κB에 대한 유형 I 인터페론의 활성 비율이 크게 향상됨을 보여준다**

[1259] 다른 종의 STING GOF 하이브리드 변이체를 사용하여 NF-κB 신호에 대한 STING 유도 유형 I 인터페론의 비율을 변경할 수 있음을 입증하기 위해 인간 단핵구 세포주에서 패널을 시험하였다. 패널에는 야생형 인간 STING(huSTING) 및 항시적 인간 GOF 돌연변이 C206Y 또는 R284G를 갖는 huSTING 돌연변이; 야생형 태즈메이니아 데빌 STING(tazSTING), 및 항시적 GOF 돌연변이 C206Y 또는 R284G를 갖는 tazSTING 돌연변이; 야생형 고양이 STING, 및 항시적 GOF 돌연변이 C205 또는 R283G를 갖는 catSTING 돌연변이체; 항시적 GOF 돌연변이 C205Y,

또는 R283G를 갖는 뮤린 STING 돌연변이체; 및 인간 STING의 CTT가 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 대체되고 야생형 인간 STING 또는 인간 GOF STING 돌연변이 C206Y 또는 R284G를 포함하는 변이체가 포함되었다. TRAF6 결합 도메인(잔기 377-379, DFS에 상응, 예를 들어, SEQ ID NO: 355 참조)에 결실이 있는 야생형 인간 STING 및 야생형 제브라피쉬 STING도 포함되었다.

[1260] 본 실험에서는 내인성 STING이 결여되고 내인성 IFN-β 프로모터의 제어 하에 있는 분비형 루시페라아제인 Lucia™ 루시퍼라제를 발현하도록 변형된 THP1-Dual™ KO STING 세포를 사용하였다. 그 후에, 항시적으로 활성인 STING GOF 돌연변이를 확인하고 루시페라제 활성의 IFN-β 프로모터 유도 발현을 측정하여 순위를 매겼다. 이 세포는 또한 내인성 NF-κB 프로모터의 제어 하에 있는 분비된 배아 알칼리성 인산분해효소(SEAP)를 발현하며, 여기서 NF-κB의 인코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여 SEAP ORF로 대체되었다. STING GOF 돌연변이에 의해 유도된 NF-κB 활성은 세포 상층액에서 SEAP 생산을 모니터링하여 평가할 수 있다.

[1261] 이 실험을 위해 제조업체의 설명서에 따라 Viromer® RED를 사용하여 THP1-Dual™ KO STING 세포를 형질주입하였다. 간단히 말해서, STING GOF 돌연변이 패널의 플라스미드 DNA 200ng 및 형질주입되지 않은 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고 Viromer® RED 0.08 μL와 혼합하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 DNA/Viromer® RED 복합체를 형성한다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 천천히 첨가하고 (2벌 중복으로) 플레이트를 CO2 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 또한, 야생형 STING 변이체는 임상 화합물 ADU-S100의 유사체인 STING 작용제 3'5' RpRp c-디-AMP(CDN, InvivoGen)의 유무에 관계없이 처리되었으며, 이는 10 μg/mL에서 24시간 배양하였다. 상층액을 48시간에 수합하고 제조업체의 프로토콜에 따라 NF-κB-SEAP 및 IFN-Lucia 리포터 신호에 대해 분석하였다. 간단히 말해서, 10 μL의 세포 배양 상층액을 50 μL QUANTI-Blue™ 시약(InvivoGen)(SEAP 측정에 사용됨)에 첨가하였다. NF-κB 활성화는 650 nm의 흡광도(Abs) 파장에서 SpectraMax® M3 분광 광도계(Molecular Devices)에서 NF-κB 유도 SEAP 활성을 측정하여 결정되었다. IFN-Lucia에서 유형 I 인터페론 활성을 측정하기 위해 SpectraMax® M3 광도계를 사용하여 정량화되고 상대 광도 단위(RLU)로 표시된 광 신호를 생성하는 루시페라제 반응을 위한 코엘렌테라진 기질을 포함하는 50 μL QUANTI-Luc™에 10 μL의 세포 배양 상층액을 첨가하였다.

[1262] 아래 표와 같이 인간 STING의 CTT가 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 대체되고 인간 STING GOF 돌연변이 R284G(huSTING R284G tazCTT)를 함유한 변이체, 뿐만 아니라 CDN STING 작용제를 사용한 야생형 제브라피시 STING(zfSTING WT + CDN)으로부터 가장 높은 유형 I IFN 반응이 관찰되었다. 그러나, 매우 높은 NF-κB 신호전달을 갖는 야생형 제브라피쉬 STING과 달리, huSTING R284G tazCTT 변이체는 훨씬 더 낮은 NF-κB 신호전달 활성과 함께 높은 유형 I IFN 신호전달을 가졌다. 더 낮은 NF-κB 신호전달에 대한 더 높은 유형 I IFN의 가장 좋은 비율은 인간 STING GOF 돌연변이 R284G(tazSTING R284G)를 포함하는 태즈메이니아 데빌 STING 변이체에서 발견되었다.

STING 변이체	ISRE-루시아™ (RLU)	± SD	NF-κB-SEAP (Abs)	± SD
비형질주입	47.96	33.91	0.065	0.007
huSTING WT + CDN	170.8	38.15	0.100	0.014
huSTING WT delTRAF6 + CDN	164.8	8.48	0.120	0.014
huSTING WT tazCTT + CDN	31.47	10.59	0.060	0.000
tazSTING WT + CDN	143.9	4.24	0.090	0.014
zfSTING WT + CDN	310.2	23.31	0.690	0.028
CMV catSTING WT WPRE + CDN	202.3	6.36	0.125	0.007
huSTING C206Y	175.3	36.03	0.105	0.007
huSTING R284G	143.9	29.67	0.100	0.000
huSTING C206Y tazCTT	137.9	21.19	0.095	0.007
huSTING R284G tazCTT	301.2	61.46	0.250	0.127
tazSTING C206Y	199.3	2.12	0.120	0.000
tazSTING R284G	217.3	19.08	0.105	0.007
muSTING C205Y	43.46	2.12	0.070	0.000
muSTING R283G	32.97	4.24	0.070	0.000
catSTING C205Y	202.3	23.31	0.135	0.007
catSTING R283G	157.4	10.60	0.120	0.000

SD = 표준 편차

[1263]

[1264] 이 데이터는 인간 단핵구에서 면역억제성 NF-κB 활성을 최소화하면서 유익한 유형 I 인터페론 활성을 향상시키기 위해 태즈메이니아 데빌의 STING 단백질과 같은 비인간 STING 단백질을 사용하고 인간 항시적 기능-획득 STING 돌연변이와 결합하는 것을 추가로 보여준다.

[1265] **실시예 18**

[1266] ***lppA* 및 *lppB* 유전자의 결실에 의한 *에스. 티피무리움* 지질단백질 넉아웃**

[1267] ΔasdΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD 유전자 결실을 함유하는 약독화된 생 *에스. 티피무리움* YS1646 균주는 막 표면 지질단백질을 제거하기 위해 *lppA*(SEQ ID NO: 387) 및 *lppB*(SEQ ID NO: 388)를 결실시키도록 조작되었다. 이는 면역억제성 사이토카인을 감소시키고 항종양 적응 면역력을 향상시키는 전염증성 TLR2 활성화를 감소시킨다. 하기에 나타낸 바와 같이, 이는 또한 종양에서 플라스미드 전달 및 인코딩된 단백질 발현을 향상시킨다.

[1268] **스트레인 조작 및 특성화**

[1269] ***lppA* 유전자의 결실**

[1270] *lppA* 유전자는 Datsenko 및 Wanner(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6640-6645 (2000))의 방법의 변형을 사용하여 YS1646ΔasdΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD 균주의 염색체에서 결실되었다. lppA 유전자를 플랭킹하는 각각 231개 및 200개 염기의 좌측 및 우측 서열을 함유하는 합성 lppA 유전자 상동성 아암 서열을 합성하고 pSL0148(SEQ ID NO: 231)이라고 하는 플라스미드로 클로닝하였다. lppA 유전자에 대한 서열은 SEQ ID NO: 387에 제시되어 있고; PCR 증폭을 위한 적절한 프라이머는 유전자 서열을 사용하여 설계되었다. 그 후에, cre/loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 플라스미드 pSL0148에 클로닝하고 lppA 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 lppA-1 및 lppA-2로 PCR 증폭하고 겔 정제한 다음 온도에 민감한 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 운반하는 YS1646ΔasdΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD에 전기천공법에 의해 도입하였다. 전기천공된 세포를 SOC + DAP 배지에서 회수하고, 카나마이신(20 μg/mL) 및 디아미노피멜산(DAP, 50 μg/mL)이 보충된 LB 한천 플레이트에 평판배양하였다. 프라이머 lppA-3 및 lppA-4를 사용하여 PCR에 의해 넉아웃 단편의 삽입에 대해 콜로니를 선택하고 스크리닝하였다. 그 후에, pKD46은 선택된 카나마이신 내성 균주를 42℃에서 배양하고 앰피실린 내성 손실을 스크리닝하여 경화되었다. 그 후에, 카나마이신 내성 마커는 Cre 재조합효소(pJW168)를 발현하는 온도 민감성 플라스미드의 전기천공에 의해 경화되었고, Amp^R 콜로니는 30℃에서 선택되었다. pJW168은 이후에 42℃에서 배양물을 성장시킴으로써 제거되었다. 선택된 lppA 넉아웃 클론은 방해 부위(lppA-3 및 lppA-4)을 플랭킹하는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 카나마이신 마커의 손실에 대해 시험하고 전기영동 이동성의 평가를 아가로스 겔에서 수행하였다. 균주 YS1646의 이 돌연변이 유도체는 YS1646ΔasdΔFLG/ΔpagP/ΔansB/Δ

csgD/ΔlppA로 지정되었다.

[1271] ***lppB* 유전자의 결실**

[1272] 그 후에, 상기 기재된 방법의 변형을 사용하여 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppA 균주에서 *lppB* 유전자를 결실시켰다. 각각 lppB 유전자를 플랭킹하는 224개 및 231개 염기의 좌측 및 우측 서열을 함유하는 합성 lppB 유전자 상동성 아암 서열을 합성하고 pSL0148(SEQ ID NO: 231)이라고 하는 플라스미드로 클로닝하였다. lppB 유전자에 대한 서열은 SEQ ID NO: 388에 제시되어 있고; PCR 증폭을 위한 적절한 프라이머는 유전자 서열을 사용하여 설계되었다. 그 후에, cre/loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 플라스미드 pSL0148에 클로닝하고, lppB 유전자 넉아웃 카세트를 프라이머 lppB-5 및 lppB-6으로 PCR 증폭하고, 겔 정제하고, 온도에 민감한 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 운반하는 균주 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppA에 전기천공법에 의해 도입하였다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자는 상기 기재된 바와 같이 Cre-매개 재조합에 의해 경화되었고, 온도 민감성 플라스미드는 비허용 온도에서 성장에 의해 경화되었다. lppA 및 lppB 유전자 넉아웃 서열은 각각 lppA-3 및 lppA-4 및 lppB-7 및 lppB-8로 명명된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었고, DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. 균주 YS1646의 이 돌연변이 유도체는 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB로 지정되거나 YS1646ΔlppAB로 별명을 붙였다.

[1273] **조작된 *에스. 티피무리움* 지질단백질 넉아웃 균주의 시험관내 특성화**

[1274] lppA 및 lppB가 결실된 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB 균주를 LB에서 밤새 배양하여 성장에 대해 평가하였다. 37℃에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)를 사용하여 OD600을 15분마다 판독하여 성장을 측정하였다. 결과는 균주 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB가 모 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD 균주에 필적하는 성장률로 LB에서 복제할 수 있음을 입증하였다. 이 데이터는 지질단백질의 제거가 시험관 내 *에스. 티피무리움*의 적합성을 감소시키지 않는다는 것을 보여준다.

[1275] **지질단백질 제거는 전신 투여 후 종양으로의 플라스미드 전달을 향상시킨다**

[1276] TLR2가 혈관 내피 세포에서 발현되고 TLR2의 활성화가 혈관 투과성을 향상시킴에 따라, 종양 콜로니화에 대한 Δ*lppAB* 변형의 효과 및 TLR2 작용제의 후속 감소가 평가되었다. 페이로드 표현에 대한 영향도 평가되었다. 하기에 나타낸 바와 같이, 종양의 콜로니화는 다소 감소된 반면, 플라스미드 전달 및 인코딩된 유전자 발현은 전신 투여 후 유의하게 증가하였다.

[1277] 삼중 음성 유방암의 쥐 모델에서 지질단백질 넉아웃 균주의 영향을 입증하기 위해 6-8주령의 암컷 BALB/c 마우스(군당 4마리)에 EMT6 세포가 있는 4번째 유선 지방 패드에 동소 접종하였다(100 μL PBS에서 $5x10^5$ 세포). 10일 동안 확립된 옆구리 종양이 있는 마우스에 1 $x10^7$ CFU의 단일 용량의 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB 균주 또는 모 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD 균주를 IV 주사하였으며, 각각은 CMV 프로모터의 제어 하에 분비되는(secNanoLuc®) 루시퍼라제 단백질(나노루시퍼라제® 루시퍼라제, 또는 NanoLuc®, Promega)을 인코딩하는 플라스미드를 함유한다. IV 투여 후 7일째에, 마우스를 안락사시키고 종양을 균질화하고 LB 플레이트에 평판배양하여 종양 조직 그램당 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 계산하였다. 모 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD 균주는 종양 조직 그램당 평균 3.3 x106 CFU로 종양을 콜로니화한 반면, 지질단백질이 제거된 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/Δlpp 균주는 1.18 x 106 CFUs/g 종양 조직의 2배 평균 감소로 종양을 콜로니화하였다.

[1278] 종양으로의 플라스미드 전달과 이종성 유전자 발현 및 단백질 분비를 측정하기 위해 secNanoLuc®의 활성을 측정하였다. 이를 위해 NanoGlo® 검출 시약(Promega)을 사용하여 균질화된 종양을 루시퍼라제 활성에 대해 평가하고 SpectraMax® M3 분광 광도계/루미노미터(Molecular Devices)에서 판독하였다. 모 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD 균주는 4482.6의 평균 발광 상대 광 단위(RLU)를 유도한 반면, YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB 균주는 3배, 96.3배에 가까운 RLU를 유도하였다. 이러한 데이터는 종양 콜로니화를 개선하고 페이로드 발현을 향상시키는 지질단백질 제거 균주의 능력을 실증한다.

[1279] 이러한 데이터는 지질단백질의 결실이 IV 투여 후 종양 콜로니화를 다소 감소시키는 반면, 종양에서 플라스미드 전달 및 페이로드 발현을 상당히 향상시킨다는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 이러한 유전자의 결실이 콜로니화를 감소시킬 것이라는 당업계의 예상과 달리, 지질단백질 결실이 종양 미세환경 및 종양에서 플라스미드 전달 및 단백질 발현을 향상시킨다는 것을 실증한다.

[1280] **실시예 19**

[1281] **살모넬라 완전 *purI* 클린 결실 유전자 넉아웃 균주 조작 및 특징화**

[1282] YS1646 균주(VNP20009)의 purI 유전자는 결실되지 않았으며; 이는 트랜스포존(Tn10) 삽입에 의해 방해를 받아 16.6 kbp(킬로 염기쌍) 게놈 역전 사건을 초래하였으며, 이에 의해 2개의 삽입 서열(IS) 요소를 게놈 내로 후속적으로 혼입하였고, purI(purM) 유전자 내에 하나, 그리고 다른 하나는 acrD 유전자의 3'-단부에 의해 바로 플랭킹된 유전자간 영역에서 16.6 kbp 업스트림에 혼입하였다. 두 IS 요소 사이의 영역은 반전되며 yffB, DC51_2568, upp, uraA, yfgE, yfgD, DC51_2573, perM, purC 등을 포함한 18개의 유전자를 포함한다. 유전자간 영역의 삽입 서열 요소는 완전히 기능적인 트랜스포사제를 인코딩하고 잠재적인 유전적 안정성 문제를 나타낸다(예를 들어, Broadway 등 (2014) J. Biotechnology 192:177-178 참조). 인간 요법으로서 균주의 개발을 위해 이러한 요소를 균주로부터 제거하였다. 염색체 재결합에 의해 방해된 purI 유전자의 완전한 유전 서열의 존재는 야생형 유전자로의 복귀 가능성을 열어 둔다. 치료 균주에서 이러한 트랜스포존의 존재는 가능한 유전적 안정성 염려를 제시한다.

[1283] 균주 YS1646의 msbB 유전자도 완전히 결실되지 않았지만 유전적으로 조작된 511bp 결실(972bp 유전자 중)에 의해 방해되어 pykA 유전자(피루베이트 키나제 인코딩)가 확장되어 마지막 5개 아미노산이 대체되었다. 13개의 새로운 코돈을 갖는 코돈(예를 들어, Broadway 등 (2014) J. Biotechnology 192:177-178 참조).

[1284] 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*를 *purI* 유전자의 나머지 부분 및 균주 YS1646에 존재하는 2개의 트랜스포존-연관 삽입 서열 요소를 결실시키도록 변형시켰다. 아래에서 *purI*의 완전 넉아웃과 함께, 생성된 박테리아 세포는, 부모 YS1646 균주에서와 같이 유전자가 방해에 의해 비활성화된 세포보다 더 높은 생존력을 갖는 것으로 제시된다.

[1285] **A. *purI* 유전자 단편 및 트랜스포존-연관 삽입 서열 요소의 결실**

[1286] yffB와 purN 유전자 사이에 위치하고 하기를 포함하는 제1 영역: 1) Broadway et.al(2014)(GenBank 기탁 번호 CP007804 및 CP008745 참조)로부터 입수된 서열 내 DC51_2586으로 표기된 1,209 bp 트랜스포존 삽입 서열 요소; 및 2) 나머지 891 bp purI 유전자 단편(본원에서 큰 purI 유전자 단편으로 지칭됨) 중 740 bp를 Datsenko 및 Wanner의 방법의 변형을 사용하여 결실을 위해 표적화하였다(Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 97:6640-6645 (2000)). 891 bp(대형) purI 유전자 단편의 작은 151 bp 부분은 인접한 다운스트림 유전자인 purN(인코딩 포스포리보실글리신아미드 포르밀트랜스퍼라제)에 영향을 미치는 것을 피하기 위해 손상되지 않은 채로 남겨졌다. DC51_2586 삽입 서열 요소 및 *purI* 유전자 단편의 좌측 및 우측 영역에 각각 284 및 262bp의 상동성을 함유하는 플라스미드 pSL0165를 DH5-알파 적격 세포(Thermo Fisher Scientific)로 형질전환시켰다. loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 이 플라스미드에 클로닝하고, 생성된 벡터를 pSL0174로 지정하였다. 그 후에, DC51_2586 삽입 서열 요소 및 큰 *purI* 유전자 단편 넉아웃 카세트를 프라이머 purm-1 및 purm-2(각각 SEQ ID NO: 419 및 420; 아래 표 2 참조)를 사용하여 PCR 증폭하고, 겔 정제하고, 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 운반하는 균주 YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD에 전기천공법에 의해 도입하였다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자를 상기 기재된 바와 같이 Cre-매개 재조합에 의해 경화시켰고, 온도-민감성 플라스미드를 비허용 온도에서의 성장에 의해 경화시켰다. DC51_2586 삽입 서열 요소 및 큰 *purI* 유전자 단편 넉아웃 서열을 프라이머 purm-3 및 purm-4(각각 SEQ ID NO: 421 및 422; 표 2 참조)를 사용한 PCR로 확인하고, DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다. 모 균주 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*의 생성된 돌연변이 유도체를 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*purI*(크고 깔끔)로 지정하였다.

[1287] *acrD*와 DC51_2568 유전자 사이에 위치하며 하기를 포함하는 제2 영역: 1) Broadway et. al(2014)(GenBank 기탁 번호 CP007804 및 CP008745 참조)에서 입수한 서열 내 DC51_2566으로 표기된 1,209 bp 트랜스포존 삽입 서열 요소; 및 2) 나머지 231 bp purI 유전자 단편(본원에서 작은 purI 유전자 단편으로 지칭됨)을 Datsenko 및 Wanner의 방법의 변형을 사용하여 결실을 위해 표적화하였다(참조, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6640-6645(2000)). DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 purI 유전자 단편의 좌측 및 우측 영역에 각각 241 및 265 bp의 상동성을 함유하는 플라스미드 pSL0210을 DH5-알파 적격 세포(Thermo Fisher Scientific)로 형질전환시켰다. loxP 부위에 의해 플랭킹된 카나마이신 유전자 카세트를 이 플라스미드에 클로닝하고 생성된 벡터를 pSL0212로 지정하였다. DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 *purI* 유전자 단편 넉아웃 카세트를 프라이머 acrd-1 및 purm-5(각각 SEQ ID NO: 425 및 423, 표 2 참조)를 사용하여 PCR 증폭하고, 겔 정제하고, 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pKD46을 운반하는 균주 YS1646ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgDΔpurI(크고 깔끔)에 전기천공법에 의해 도입하였다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자를 상기 기재된 바와 같이 Cre-매개 재조

합에 의해 경화시켰고, 온도-민감성 플라스미드를 비허용 온도에서의 성장에 의해 경화시켰다. DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 *purI* 유전자 단편 넉아웃 서열을 프라이머 purm-6 및 acrd-3(각각 SEQ ID NO: 424 및 426; 표 2 참조)을 사용하는 PCR에 의해 확인하고, DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 모 균주 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*purI*(크고 깔끔)의 생성된 돌연변이 유도체는 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*purI*(전체 깔끔), 또는 대안적으로 YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI*로 지정되었다.

표 2. 프라이머 서열 정보

프라이머	프라이머 서열	프라이머 설명	SEQ ID NO.
purm-1	ccagatgtggcttgtttatacttcgc	DC51_2586 삽입 서열 요소 및 큰 *purI* (740 bp) 단편 유전자 KO 카세트를 증폭시키기 위한 Fwd 프라이머	419
purm-2	ccttattgctgaatactgccctgag	DC51_2586 삽입 서열 요소 및 큰 *purI* (740 bp) 유전자 단편 KO 카세트를 증폭시키기 위한 Rev 프라이머	420
purm-3	cgtgtcgcaattcttaatgccatag	DC51_2586 삽입 서열 요소 및 큰 *purI* (740 bp) 유전자 단편 KO 를 체크하기 위한 Fwd 프라이머	421
purm-4	caaacatcggactcagaatacgc	DC51_2586 삽입 서열 요소 및 큰 *purI* (740 bp) 유전자 단편 KO 를 체크하기 위한 Rev 프라이머	422
purm-5	caggcgataaaggctaacaaccg	DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 *purI* (231 bp) 유전자 단편 KO 카세트를 증폭시키기 위한 Rev 프라이머	423
purm-6	ttgacctggatcaaccaaaagcg	DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 *purI* (231 bp) 유전자 단편 KO 를 체크하기 위한 Rev 프라이머	424
acrd-1	cctgcgaccgatactgatgac	DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 *purI* (231 bp) 유전자 단편 KO 카세트를 증폭시키기 위한 Fwd 프라이머	425
acrd-3	gctactcgctacctggatgc	DC51_2566 삽입 서열 요소 및 작은 *purI* (231 bp) 유전자 KO 를 체크하기 위한 Fwd 프라이머	426

Fwd= 포워드; Rev = 리버스; KO = 넉아웃

[1288]

플라스미드 정보

유전자 서열	합성 DNA 벡터	카나마이신 클로닝 후의 벡터 명칭	상동성 아암 길이	
			좌측	우측
purI 큰 (740 bp) 단편	pSL0165	pSL0174	284 bp	262 bp
purI 작은 (231 bp) 단편	pSL0210	pSL0212	241 bp	265 bp

[1289]

[1290] **B. 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*는 증강된 주사 스탁 세포 생존력을 보여준다**

[1291] 박테리아의 시험관내 적합도에 미치는 잔여 *purI* 유전자 서열 단편 및 트랜스포존-연관 삽입 서열 요소의 결실의 효과를 평가하기 위해, 완전 *purI 유전자* 결실(F-△*purI*)을 갖고 갖지 않고 동일한 플라스미드를 운반하는 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*의 세포 생존력을 비교하였다.

[1292] 냉동된 주사 스탁에 대한 배양물 가공 후 생존 가능한 CFU를 직접적으로 비교함으로써 플라스미드 ADN-657(pATI1.76 CMV muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA), 또는 플라스미드 ADN-750(pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA)을 함유하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*의 균주의 세포 생존력 및 동일한 플라스미드(ADN-657 및 ADN-750)를 발현하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*의 균주의 세포 생존력을 평가하였다. 플라스미드 ADN-657은 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc 및 변형된 인간 STING 키메라를 인코딩하고, 이때 인간 STING의 CTT를 태즈메니아 데빌 STING 및 GOF 돌연변이 N154S/R284G를 갖는 CTT(huSTING N154S/R284G tazCTT)로 대체하였다. 2개의 페이로드는 CMV 프로모터의 제어 하에 T2A 펩타이드를 포함하는 이시스트론성(bicistronic) 작제물로부터 발현된다. 작제물은 또한 B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE), 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 서열(bGHpA)을 포함한다. 플라스미드 ADN-750은 인간 IL-15Rα-IL-15sc 및 동일한 변형된 인간 STING 키메라를 인코딩하며, 여기서 2개의 페이로드의 발현은 CMV 프로모터의 제어 하에 있고, 단일 프로모터 시스템은 2개의 페이로드를 모두 인코딩하는 핵산의 업스트림에 놓인 혈관 내피 성장 인자 및 유형 1 콜라겐 유도 단백질(VCIP; SEQ ID NO: 434)로도 알려진 내인성 인간 IRES(내부 리보솜 진입 부위), 뿐만 아니라 2개의 ORF 사이에 놓인 T2A 펩타이드 서열을 사용하여 달성된다.

[1293] 이 실험을 위해, 100 μl의, 동등한 OD_{600nm} 광학 밀도(OD) 값의 밤새 정지기 배양물을 사용하여 환기 캡이 있는 250 ml 배플 진탕기 플라스크에서 25 ml의 4XYT 배지에 접종하였고, 배양물을 37℃에서 진탕하면서(225 RPM에서) 대략 6시간 동안 인큐베이션하였다. 배양물을 동등한 OD_{600nm} 값에서 정지기에서 수합하고, 2회 세척하고, OD_{600nm} = 2로 조정하고, 분취하고, -80℃에서 냉동시켰다. 이튿날, 각각의 균주의 2개 분취물을 해동시키고, OD_{600nm} 값을 측정하고, 균주를 한천 플레이트 상에 평판배양하여, 역가 및 생존력을 결정하였다. 생존력 %를 CFUs/ml에 대한 OD_{600nm}의 비로부터 결정하였다.

[1294] 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*-(ADN-657) 주사 스탁은 77% 생존 가능한 것으로 결정된 한편, 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-(ADN-657) 주사 스탁은 62% 생존 가능한 것으로 결정되었다. 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*-(ADN-750) 주사 스탁은 72% 생존 가능한 것으로 결정된 한편, 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-(ADN-750) 주사 스탁은 63% 생존 가능한 것으로 결정되었다.

[1295] 이러한 데이터는 부모 균주, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*와 비교하여 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*에 대해 유사한 또는 증강된 적합도 프로파일을 실증한다. 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*는 냉동된 주사 스탁 제조 후 향상된 생존력을 나타내었으며, 이는 게놈 결실이 잠재적인 유전적 불안정성 문제를 줄일 뿐만 아니라 증가된 세포 생존력으로 나타난 바와 같이 대사 이익을 제공한다.

[1296] **C. 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD* 부모 균주와 비교하여 브로쓰 배지에서 유사한 성장 특징을 나타낸다**

[1297] 박테리아 균주의 시험관내 적합도에 미치는 잔여 *purI* 유전자 서열 단편 및 트랜스포존-연관 삽입 서열 요소의 결실의 효과를 평가하기 위해, 플라스미드 ADN-657(pATI1.76 CMV muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA) 또는 플라스미드 ADN-750(pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA)을 발현하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*의 균주와 동일한 플라스미드(ADN-657 및 ADN-750)를 발현하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*의 균주 사이에서 브로쓰 배지 성장을 비교하였다. 냉동된 주사 스탁을 실온에서 해동시키고, PBS에서 희석시킴으로써 $1x10^7$ CFU/mL로 정규화하였다. 10 μL의 정규화된 시료를 사용하여 300 μL의 LB 배지($1x10^5$ CFU/웰)을 깨끗한 편평-바닥 96-웰 플레이트에 기술적 4벌 중복으로 접종하였다. 플레이트를 37℃에서에서 진탕하면서 인큐베이션하고, OD_{600nm} 값을 16시간의 경과에 걸쳐 15분 간격으로 모니터링하였다. OD_{600nm} 값을 플롯화하여 성장 곡선을 작제하고, 성장의 로그기의 기울기를 계산하고 이를 사용하여 각각의 균주에 대한 배가 시간(doubling time)을 결정하였다.

[1298] 각각의 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*-(ADN-657), YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-(ADN-657), YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*-(ADN-750) 및 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*(ADN-750)는 대등할 만한 성장 프로파일을 생성하였고, 정지기에서 유사한 세포 밀도에 도달하였다. 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*-(ADN-657)은 77분의 배가 시간을 가지며, 균

주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-(ADN-657)는 62분의 배가 시간을 갖고, 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*-(ADN-750)은 72분의 배가 시간을 가지며, 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-(ADN-750)은 63분의 배가 시간을 가졌다. 이러한 데이터는 부모 균주, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*와 비교하여 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*에 대해 유사한 적합도 프로파일을 실증한다. 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*는 브로쓰 배지에서 약간 증가된 배가 시간을 나타내었으나, 부모 균주와 비교하여 유사한 성장 곡선 프로파일 및 정지기 세포 밀도를 생성하였다.

[1299] **실시예 20**

[1300] **유전적으로 변형된 균주는 전체 인간 혈액 및 1차 인간 대식세포에서 염증을 감소시킨다**

[1301] 면역자극성 박테리아 균주의 상이한 변이체의 투여로부터 비롯된 염증성 프로파일을 평가하기 위해, 각각의 플라스미드(루시퍼라제 나노루시퍼라제®(Promega)를 인코딩하는 CMV NanoLuc®)를 운반하는 균주 ATCC # 14028(야생형(WT) *에스. 티피무리움*), YS1646, YS1646△*asd*, YS1646△*asd*/△FLG, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*/F-△*purI*, 및 *이. 콜라이* 균주 NEB 5-알파를 37℃에서 2시간 동안 인간 혈액과 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션을 96-웰 포맷에서 200 μl의 혈액 및 $5x10^3$ CFU의 박테리아로 수행하였다. 감염-후 2시간째에, 혈액을 300 상대 원심력(rcf)으로 5분 동안 원심분리하고, 혈청을 인간 항바이러스 사이토카인 비드 어레이 분석(BioLegend)에 의해 제조업체의 설명서에 따라 사이토카인 프로파일 분석을 위해 단리하였다.

[1302] 인간 혈액으로부터 방출되고 다양한 균주와의 인큐베이션 후 사이토카인의 수준 분석은, 균주 YS1646과의 인큐베이션이 WT 균주 ATCC 14028과의 인큐베이션과 비교하여 전염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF-α의 감소된 수준을 초래하였음을 보여주었다. 추가의 게놈 변형은 인간 혈액으로부터 방출된 전염증성 사이토카인의 수준을 추가로 감소시켰다.

균주	사이토카인 수준			
	IL-6		TNF-α	
	평균 (pg/ml)	STDEV	평균 (pg/ml)	STDEV
비감염 대조군	18.8	± 1.1	69.2	± 2.9
야생형 *에스. 티피무리움* 균주 ATCC 14028 (CMV NanoLuc®)	155.1	± 32.7	464.3	± 77.9
YS1646 (CMV NanoLuc®)	48.1	± 20.4	105.0	± 24.4
YS1646Δ*asd* (CMV NanoLuc®)	19.3	± 1.2	68.4	± 6.1
YS1646Δ*asd*/ΔFLG (CMV NanoLuc®)	23.7	± 4.4	78.3	± 6.0
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP* (CMV NanoLuc®)	17.1	± 5.7	57.8	± 19.9
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* (CMV NanoLuc®)	21.1	± 7.6	74.2	± 33.4
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI* (CMV NanoLuc®)	21.0	± 1.3	75.1	± 4.9
이. 콜라이 NEB 5-알파 (CMV NanoLuc®)	152.9	± 24.1	519.0	± 236.5

STDEV = 표준 편차

[1303]

[1304] 박테리아, 예컨대 *에스. 티피무리움*에서 게놈 변형이 1차 인간 골수성 세포의 감염 동안 염증에 어떤 영향을 미치는지 결정하기 위해, 인간 M2 대식세포의 박토펙션을 수행하였다. 1차 인간 단핵구를 100 ng/ml 인간 대식세포 콜로니-자극 인자(M-CSF)를 함유하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지(StemCell Technologies)에서 5일 동안 분화시켰다. 제6일에, 세포에 150 ng/ml M-CSF 및 60 ng/ml huIL-4를 함유하는 추가의 배지를 48시간 동안 보충하여, M2 대식세포를 생성하였다. 그 후에, 세포를 정지기 박테리아 균주(상기 기재된 균주)로 감염시키고, 이를 4XYT 배지에서 37℃에서 밤새 10의 MOI로 성장시켰다. 세포에 박테리아를 접종하고, 500 rcf에서 5분 동안 원심분리하고, 뒤이어 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를 DPBS로 2회 세척한 다음, 신선한 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지에서 100 μg/ml 겐타마이신과 함께 인큐베이션하였다. 감염후 0시간, 2시간, 6시간, 24시간 및 48시간째에 상층액을 수합하였다. 사이토카인 측정을 MESO 스케일 분석에 의해 제조업체의 설명서에 따라 수행하였다.

[1305] 아래 표에 요약된 결과는, 감염후 24시간째에 균주 YS1646, YS1646△*asd*, 및 YS1646△*asd*/△FLG로 감염된 대식세포가 최고 수준의 IL-6을 방출하였고, WT 박테리아(균주 ATCC 14028)는 더 적은 IL-6을 유도하였음을 보여준

다. 성공적인 게놈 변형은 저하된 수준의 IL-6 분비를 초래하였고, 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*csgD* 및 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*는 최저 수준의 IL-6을 유도하였다. 유사한 경향은 TNF-α로 관찰되었다.

균주	사이토카인 수준, 24 시간			
	IL-6		TNF-α	
	평균 (pg/ml)	범위 (pg/ml)	평균 (pg/ml)	범위 (pg/ml)
비감염 대조군	1.1	-	1.23	-
야생형 *에스. 티피무리움 균주* ATCC 14028 (CMV NanoLuc®)	10450.7	285.0	2895.508	230.262
YS1646 (CMV NanoLuc®)	13653.2	332.3	5282.976	71.708
YS1646Δ*asd* (CMV NanoLuc®)	14516.3	693.3	5100.7465	793.867
YS1646Δ*asd*/ΔFLG (CMV NanoLuc®)	13767.5	1540.7	3572.248	150.534
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP* (CMV NanoLuc®)	6985.6	650.2	758.4872	136.6448
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*csgD* (CMV NanoLuc®)	6746.1	622.0	1431.149	367.154
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* (CMV NanoLuc®)	6584.1	1389.7	502.1081	44.983

[1306]

[1307] **실시예 21**

[1308] ***csgD-결실* 균주는 인간 혈관 내피 세포에서 혈관 누출을 유도한다**

[1309] 혈관 누출을 촉진하는 능력은 종양 혈관구조 내로의 박테리아 진입을 용이하게 하고, 더 큰 종양 콜로니화를 촉진하는 데 유리한 특징이다. 이 실시예에서 △*csgD* 균주는 이러한 특징을 소유하는 것으로 제시된다.

[1310] 부모 균주 YS1646을 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 내재성 면역 감지를 활성화시키는 능력, 및 내피 단층 투과성에서의 후속적인 증가를 자극시키는 능력에 대해 유도체 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP* 및 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*를 비교하였다. 이를 *시험관내* 혈관 투과성 검정 키트(Millipore, Catalog No. ECM642)를 사용하여 평가하였다. 각각이 분비된 나노루시퍼라제® (EF-1α secNanoLuc®)를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP* 및 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*의 균주를 사용하였다. 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)를 96-웰 플레이트 챔버에서 제조업체의 설명서에 따라 반투과성 콜라겐-코팅된 막 삽입물 내로 $5x10^5$ 세포/웰의 농도로 시딩하였다. 내피 단층 형성이 확인되고 막 공극을 효율적으로 가리는 것으로 결정될 때까지(시딩후 96시간째) 합류도(confluency)를 매일 모니터링하였다.

[1311] 박테리아 균주를 3 ml의 4XYT 배지(TEKNOVA, Catalog No. 2Y1085)에서 환기 캡 50 mL 코니칼 바이얼에서 37℃에서 밤새 정지기까지 진탕하면서 성장시키고, 이튿날 펠렛화하고 PBS에 재현탁시킴으로써 제조하였다. 박테리아 시료를 OD_{600nm}에 의해 $2.5x10^8$ CFU/mL의 농도로 정규화하고, HUVEC 삽입물 웰에 100 μL 부피로 첨가하여, 50의 MOI를 달성하였다. 플레이트를 500 rcf에서 5분 동안 회전시켜, CFU와 HUVEC의 연계를 싱크로나이즈한 다음, 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 겐타마이신을 삽입물 웰에 200 μg/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 박토펙션-후 24시간째에, 삽입물 내 배지를 수집하고(사이토카인 분석을 위해 비축하고), 75 μL의 플루오레세인 이소티오시아네이트-덱스트란(FITC-덱스트란; 1:40 희석에서)을 첨가하고, 혼합물을 암실, 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 수용기 트레이로부터의 배지를 수집하고, 분광광도계 상에서 485 nm의 여기 파장 및 535 nm의 흡광도 파장에서 분석하고, 1:40 FITC-덱스트란 용액을 양성 대조군으로서 직접적으로 진행시켰다.

[1312] 박토펙션-후 24시간째에, 그리고 FITC-덱스트란 용액과의 인큐베이션 후, 조작된, 약독화된 *에스. 티피무리움* 균주(즉, 배지 단독)로 처리되지 않은 웰은 매우 낮은 형광 값(35)을 생성하였고, 이는 합류도 및 투과성의 교란이 거의 없음을 나타낸다. 부모 YS1646-처리 웰은 가장 많은 양의 FITC-덱스트란이 막을 통과하도록 허용하였으며(형광 = 155), 이는 가장 강한 내재성 면역 자극 및 혈관 투과성의 증가를 나타내고, 한편 조작된, 약독화된 *에스. 티피무리움* 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP* 및 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*는 FITC-덱스트란이 거의 통과하지 않게 하였으나(각각 형광 = 84 및 91), 여전히 혈관 투과성을 촉진하는 능력을 유지하고 있었다.

[1313] 이러한 효과가 HUVEC으로부터 방출되는 사이토카인, 특히 IL-6에 의존하였는지의 여부를 시험하기 위해, 인간 항바이러스 사이토카인 비드 어레이 분석(BioLegend)을 감염후 6시간째에 HUVEC 상층액 상에서 제조업체의 설명서에 따라 수행하였다. 부모 YS1646 균주로 감염된 HUVEC은 감염되지 않은 대조군(27.19 pg/mL)과 비교하여 매우 높은 IL-6 수준(1769.2 pg/mL)을 나타내었다. YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP* 균주는 더 낮은 수준의 IL-6(543.3 pg/mL)를 유도하였고, 가장 적은 양의 IL-6은 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD* 균주(272.8 pg/mL)로 관찰되었다. 따라서, 혈관 누출을 유도하는 더 낮은 수준의 전염증성 사이토카인을 생산함에도 불구하고, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD* 균주는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP* 균주보다 더 높은 수준의 누출을 실증하였다. 그러므로, 혈관 누출을 촉진하는 능력은 종양 혈관구조 내로의 박테리아 진입을 용이하게 하고 더 큰 종양 콜로니화를 가능하게 하기 위한 중요한 특징이다. 본원에 기재되고 제공된 균주는 이러한 특징을 소유한다.

[1314] **실시예 22**

[1315] **STING 기능-획득 변이체는 1차 인간 M2 대식세포에서 IL-6에 대한 CXCL10(IP-10)의 증가된 비율 및 IL-6에 대한 IFN-β의 증가된 비율을 실증한다**

[1316] 인간 M2 대식세포에서 다운스트림 사이토카인 신호전달에 미치는 다양한 STING 기능-획득(GOF) 돌연변이체(GOF 돌연변이를 갖는 키메라 STING 단백질 포함)의 효과를 결정하기 위해, GOF 돌연변이체를 상기 실시예 8에 기재된 pATI-1.75(pATI1.75로도 지칭됨) 벡터 내로 클로닝한 다음, 이를 발현을 위해 인간 M2 대식세포 내로 형질주입하고, 세포 상층액을 분비된(발현된) 사이토카인에 대해 검정하였다.

[1317] 건강한 인간 공여자로부터 단리된 냉동된 인간 단핵구를 완전 배지(RPMI-1640 + 10% FBS)에서 해동시키고, 실온에서 600 x g에서 10분 동안 원심분리에 의해 세척하였다. 단핵구를 100 ng/mL의 인간 M-CSF + 20 ng/mL의 인간 IL-4 + 20 ng/mL의 인간 IL-10을 함유하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지(StemCell Technologies)에 재현탁시켰다. 그 후에, 단핵구(웰당 8e5 내지 1e6 세포)를 24-웰 플레이트에 75 μL의 최종 부피로 시딩하였다. 3일 후에, 750 μL의, 100 ng/mL 인간 M-CSF + 20 ng/mL 인간 IL-4 + 20 ng/mL 인간 IL-10을 함유하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지(StemCell Technologies)를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 4일 이상 동안 인큐베이션하였다. 제7일에, Viromer® RED mRNA 및 플라스미드 형질주입 시약(Lipocalyx GmbH)을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 세포를 형질주입하였다. STING GOF 돌연변이체 패널, 뿐만 아니라 감염되지 않은 대조군으로부터의 500 ng의 플라스미드 DNA를 제공된 완충액에 희석시키고, Viromer® RED 형질주입 시약과 혼합하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여, DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되게 하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 24-웰 플레이트의 각각의 웰에(3벌 중복으로) 서서히 첨가하고, 플레이트를 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 48시간의 인큐베이션 후 상층액을 수합하고, 유세포분석-기초 인간 항바이러스 사이토카인 비드 어레이(BioLegend)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 인간 CXCL10(IP-10) 및 IL-6에 대해 검정하였다. 3개 측정의 평균을 계산하고, IP-10 농도를 IL-6 농도로 나누어서 IL-6에 대한 IP-10의 비율을 계산하였다.

[1318] 아래 표에 요약된 결과는, IL-6에 대한 IP-10의 가장 높은 비율을 초래한 STING 변이체가 huSTING N154S/R284G tazCTT 변이체(즉, CTT를 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 대체하고 변형된 인간 STING 및 GOF 돌연변이 N154S/R284G를 함유하는 키메라 STING 단백질)였음을 보여준다. 인간 STING의 CTT를 태즈메이니아 데빌 STING의 CTT로 대체한 STING 변이체(huSTING tazCTT)는 동일한 돌연변이를 갖는 상응하는 완전 인간 STING 변이체보다 IL-6에 대한 IP-10의 더 높은 비율을 나타내었고, 그러므로, 향상된 항종양 반응을 실증하였다.

STING 변이체를 인코딩하는 플라스미드에 의한 M2 대식세포의 형질주입 후 IL-6 단백질에 대한 IP-10 발현 비율

STING 변이체	IL-6 에 대한 IP-10 의 평균 발현 비율	표준 편차
비형질주입	0.6108	± 0.0960
huSTING N154S	3.174	± 0.2006
huSTING R284G	3.938	± 0.6123
huSTING N154S/R284G	3.832	± 0.1185
huSTING tazCTT N154S	4.400	± 0.1957
huSTING tazCTT R284G	4.497	±0.1631
huSTING tazCTT N154S /R284G	5.253	± 0.1695

[1319]

[1320] 다양한 STING 변이체의 발현 후 인간 M2 대식세포에서 IL-6 유전자 발현에 대한 IFN-β의 비율을 평가하였다. 건강한 인간 공여자로부터 단리된 냉동된 인간 단핵구를 완전 배지(RPMI-1640 + 10% FBS)에서 해동시키고, 실온에서 600 x g에서 10분 동안 원심분리에 의해 세척하였다. 단핵구를, 200 ng/mL 인간 M-CSF + 20 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 RPMI-1640 + 1X 비필수 아미노산(NEAA) + 5% 인간 AB 혈청에 재현탁시켰다. 그 후에, 단핵구(웰당 8e5 내지 1e6 세포)를 24-웰 플레이트에 75 μL의 최종 부피로 시딩하였다. 3일 후에, 750 μL의, 5% 인간 AB 혈청 + NEAA와 함께 200 ng/mL 인간 M-CSF + 20 ng/mL 인간 IL-4를 함유하는 RPMI를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 4일 이상 동안 인큐베이션하였다. 제7일에, Viromer® RED 형질주입 시약을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 세포를 형질주입하였다. 변형된 키메라 STING 단백질을 포함한 STING GOF 돌연변이체 패널, 뿐만 아니라 감염되지 않은 대조군으로부터의 500 ng의 플라스미드 DNA를 제공된 완충액에 희석시키고, Viromer® RED 형질주입 시약과 혼합하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여, DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되게 하였다. 양성 대조군으로서, 임상 화합물 ADU-S100의 유사체인 STING 작용제 3'5' RpRp c-디(di)-AMP(InvivoGen)를 세포에 10 μg/mL의 농도로 첨가하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 24-웰 플레이트의 각각의 웰에(3벌 중복으로) 서서히 첨가하고, 플레이트를 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션하였다.

[1321] 형질주입-후 48시간째에 qPCR을 위해 세포를 수합하고, 베타-머캅토에탄올(Qiagen)과 함께 350 μL의 완충액 RLT 용해 완충액으로 용해시켰다. Qiagen RNeasy® Plus Mini 키트를 하기 변형으로 사용하여 RNA 추출을 수행하였다. RNase-Free DNase 키트(Qiagen)를 사용하는 게놈 DNA 무효화 단계를 키트에 포함시켜, 게놈 DNA를 총 RNA로부터 제거하였다. NanoDrop™ One^C UV-Vis 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 총 RNA 농도를 측정하였다. 각각의 시료의 순도를 또한 A_{260}/A_{230} 흡광도 비율로부터 평가하였다. 역전사를 수행할 때까지 RNA를 냉동-해동 없이 -80℃에 보관하였다.

[1322] 20 μL 반응에서 RT-qPCR(Bio-Rad)을 위해 CFX96™ 실시간 시스템(Bio-Rad) 및 iScript™ 역전사 Supermix를 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 0.5-1 μg의 주형 RNA로부터 cDNA의 합성을 수행하였다. qPCR을 CFX96™ 실시간 시스템(Bio-Rad)으로 수행하였다. 인간 IFNβ1(huIFNβ1; 검정 ID: qHsaCEP0054112; Bio-Rad) 및 huIL-6(검정 ID: qHsaCEP0051939; Bio-Rad)을 위한 프라이머를 qPCR에 사용하였다. SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, 또는 iQ™ Multiplex Powermix(Bio-Rad)를 사용하여 qPCR 반응(20 μL)을 프로토콜에 따라 실시하였다. Bio-Rad CFX96™ 실시간 시스템 상에서의 표준 열순환 프로그램은 95℃에서 150초 동안의 변성 단계, 뒤이어 95℃에서 15초 동안의 39개 주기, 및 60℃에서 55초 동안을 포함하였다. 액틴 기준 mRNA(Bio-Rad, 검정 ID: qHsaCEP0036280)를 사용하여 표적 mRNA의 정량화를 정규화하였다. $\triangle C_q$를 표적(huIFNβ 또는 huIL-6)과 기준(액틴) 유전자 사이의 차이로서 계산하였다. 치료(형질주입)의 $\triangle C_q$ 값을 비치료(즉, 비형질주입) 대조군의 $\triangle C_q$ 값으로 정규화함으로써 $\triangle\triangle C_q$를 수득하였다. IL-6 $\triangle\triangle C_q$에 대한 IFNβ $\triangle\triangle C_q$의 비율을 아래 표에 제시한다.

[1323] 아래 표에 요약된 결과는, 스크리닝된 모든 STING GOF 돌연변이체 중에서, huSTING N154S/R284G tazCTT 변이체가 전염증성 IL-6 발현에 대한 면역자극성 IFN-β의 최고 비율을 초래함을 보여준다. 추가로, 인간 STING의 CTT를 태즈메니아 데빌 STING의 CTT(예를 들어 huSTING tazCTT)로 대체한 키메라 STING 작제물은 일반적으로 동일한 GOF 돌연변이(들)를 포함하는 상응하는 완전 인간 STING 작제물보다 IL-6 발현에 대한 IFN-β의 최고 비율을 유도하였다.

[1324] IFN-β의 증가된 발현은 증가된 IRF3/유형 I IFN 신호전달을 나타내며, 이는 면역자극성이고 유익하고, 한편 저하된 IL-6 발현은 감소된 NF-κB 신호전달을 나타내고, 이는 전염증성이며 항종양 반응에 기여하지 않는다. IL-6 발현에 대한 IFN-β의 더 높은 비율은 증가된 항종양/항바이러스 유형 반응 및 저하된 전염증성 반응을 나타낸다. 그러므로, STING 단백질에서 CTT의 대체, 뿐만 아니라 기능-획득 돌연변이는 STING 단백질, 그러므로 면역자극성 박테리아의 항종양 활성을 증가시킨다.

STING 변이체에 의한 M2 대식세포의 형질주입 후 IL-6 유전자에 대한 IFN-β의 발현 비율

STING 변이체	IL-6 유전자에 대한 IFN-β의 평균 발현 비율	표준 편차
비형질주입 대조군	1.00	0.00
STING 작용제 (3'5' RpRp c-디-AMP)	4.00	± 4.24
NanoLuc® 플라스미드 대조군	16.00	± 2.83
huSTING WT	33.00	± 27.84
huSTING V147L	7.00	± 3.46
huSTING N154S	16.33	± 11.24
huSTING V155M	14.00	± 4.58
huSTING C206Y	19.00	± 2.65
huSTING R281Q	21.33	± 18.61
huSTING R284S	6.33	± 4.93
huSTING R284H	6.33	± 2.52
huSTING R284M	7.33	± 0.58
huSTING R284G	9.67	± 2.52
huSTING V155M/C206Y	10.67	± 1.53
huSTING N154S/C206Y	11.00	± 6.56
huSTING C206Y/R284G	11.00	± 8.19
huSTING V155M/R284G	10.67	± 4.93
huSTING N154S/R284G	48.00	± 10.39
huSTING WT tazCTT	16.67	± 10.41
huSTING V147L tazCTT	23.00	± 1.00
huSTING N154S tazCTT	19.00	± 6.08
huSTING V155M tazCTT	22.67	± 4.16
huSTING C206Y tazCTT	14.67	± 7.51
huSTING R281Q tazCTT	10.67	± 3.51
huSTING R284S tazCTT	23.00	± 8.89
huSTING R284H tazCTT	31.33	± 13.43
huSTING R284M tazCTT	43.00	± 14.93
huSTING R284G tazCTT	38.33	± 12.01
huSTING V155M/C206Y tazCTT	31.00	± 15.72
huSTING N154S/C206Y tazCTT	26.67	± 11.59
huSTING C206Y/R284G tazCTT	40.67	± 14.01
huSTING V155M/R284G tazCTT	31.33	± 10.60
huSTING N154S/R284G tazCTT	108.33	± 50.90

[1325]

[1326] **실시예 23**

[1327] **IL-15 수용체-α 및 IL-15 단일-사슬 융합 단백질의 설계**

[1328] 인간 단백질 또는 마우스 단백질을 함유하는 융합 단백질을 제조하였다. 마우스 단백질은 마우스 모델에 사용하기 위한 것이다; 인간 단백질은 인간 치료제에서 사용될 면역자극성 박테리아에서 인코딩하기 위한 것이다.

[1329] 인간 IL-15 단일-사슬(sc)에 융합된 인간 IL-15 수용체-α(IL-15Rα)를 하기와 같이 설계하였다. IL-15-Rα의 리더 서열 및 스시(sushi) 도메인에 상응하는 인간 IL-15Rα(SEQ ID NO: 401)의 아미노산 잔기 1-108(+ IL-15Rα의 추가의 13개 아미노산 잔기; 예를 들어, Bouchaud *et al.* (2008) *J. Mol. Biol.* 382(1):1-12)을, 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser의 4개 반복부(즉, $(GGGGS)_4$)를 갖는 Gly-Ser 링커와 인프레임으로 첨가하였다. 리더 서열 또는 프로펩타이드가 없는 완전 성숙 인간 IL-15sc에 상응하고 SEQ ID NO: 403의 아미노산 잔기 48-162에 상응하는 폴리펩타이드 서열을 링커 다음에 첨가하였다. 생성된 인간 IL-15α-IL-15sc 융합 단백질(SEQ ID NO: 404)의 서열은 하기와 같으며:

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYS
RERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAP
PSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE
SDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTE
SGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS.

[1330]

[1331] 여기서, 인간 IL-15Rα의 잔기 1-108에 상응하는 잔기는 밑줄 표시되어 있으며; Gly-Ser 링커는 볼드체로 표시되어 있고; 인간 IL-15의 잔기 48-162에 상응하는 잔기는 이중 밑줄 표시되어 있다.

[1332] 유사하게는, 뮤린 IL-15 수용체-α(IL-15Rα) 단백질의 일부를 뮤린 IL-15 단일-사슬(sc) 단백질의 일부에 융합시킴으로써 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc 융합 단백질(SEQ ID NO: 407)을 제조하였다. IL-15-Rα의 리더 서열 및 스시 도메인을 포함하는 뮤린 IL-15Rα(SEQ ID NO: 405)의 아미노산 잔기 1-132를 $(GGGGS)_4$ 링커와 인프레임으로 첨가하였다. 리더 서열 또는 프로펩타이드가 없는 완전 성숙 뮤린 IL-15sc에 상응하고 SEQ ID NO: 406의 아미노산 잔기 49-162에 상응하는 폴리펩타이드 서열을 링커 다음에 첨가하였다. 마우스 모델 실험에 사용된 생성된 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc 융합 단백질(SEQ ID NO: 407)의 서열은 하기와 같으며:

[1333] MASPQLRGYGVQAIPVLLLLLLLLLLPLRVTPGTTCPPPVSIEHADIRVKNYSV
NSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAHYSP
VPTVVTPKVTSQPESPSPSAKEPEA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**NWIDVR
YDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLELQVILHEYSNMTLN
ETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS.

[1334] 여기서, 뮤린 IL-15Rα의 잔기 1-132에 상응하는 잔기는 밑줄 표시되어 있으며; Gly-Ser 링커는 볼드체로 표시되어 있고; 뮤린 IL-15의 잔기 49-162에 상응하는 잔기는 이중 밑줄 표시되어 있다.

[1335] **실시예 24**

[1336] **IL-15Rα-IL-15sc는 결장직장 암종의 마우스 모델에서 종양 재시도로부터 치유 효과 및 보호를 유도한다**

[1337] 이 실시예는 IL-15Rα-IL15sc 융합 단백질(본원에서 IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, IL-15/IL-15Rα 사슬 복합체, 및 IL-15/IL-15Rα로도 지칭됨)을 인코딩하는 면역자극성 박테리아가 항종양 효능을 단독요법으로서 유도함을 실증한다. 이를 실증하기 위해, 뮤린 IL-15Rα-IL15sc(muIL-15Rα-IL15sc)를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 *에스. 티피무리움* 균주를 제조하였다. muIL-15Rα-IL15sc를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD* 균주(즉, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-muIL-15Rα-IL15sc; 마우스 IL-15Rα-IL15sc를 마우스 모델에서 수행된 실험에 사용하였음)를 피하(SC) 옆구리(flank) MC38 결장직장 선암종 모델에서 안전성 및 효능에 대해 PBS 대조군과 비교하였다. 이 연구를 위해, 6 내지 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스(군당 5 마리의 마우스)의 우측 옆구리에 MC38 세포(100 μL PBS 중 $5x10^5$ 세포)를 SC 접종하였다. 확립된 옆구리 종양을 보유한 마우스에게 $2x10^7$ CFU의 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-muIL-15Rα-IL15sc 균주, 또는 PBS 비히클 대조군을 제8일에 정맥내(IV) 주사하였다. 종양 측정 및 체중을 매주 2회 기록하였다.

[1338] 결과는, YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-muIL-15Rα-IL15sc 균주가 단일 IV 주사 후 50% 치유(4/8 vs. PBS의 경우 0/8, $p = 0.005$, 제21일)를 실증하였음을 보여주었다. 종양 이식-후 66일째에(IV 투약-후 제57일), 치유된 마우스(N=4)의 반대쪽 옆구리 상에 $5x10^5$ MC38 세포를 재이식하고, 종양 성장을 미접촉, 연령-매칭된 마우스(N=5)와 비교하였다. 재이식-후 제30일까지, 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-muIL-15Rα-IL15sc로 치유된 군 내의 모든 마우스는 종양이 없는 채로 있었고, 반면 미접촉 군 내의 모든 마우스는 최대 종양 부피에 도달하였다. 이러한 데이터는 면역자극성 박테리아, 예컨대 균주 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*-muIL-15Rα-IL15sc를 통한 IL-15Rα-IL15sc 융합 단백질의 전달의 강력한 치유 효과를 실증하고, 결장직장 암종의 모델에서 지속적인 보호 면역 기억의 유도를 실증한다.

[1339] **실시예 25**

[1340] **항-CTLA-4 scFv-Fc는 항-CTLA-4 scFv와 비교하여 CD80/CTLA-4 및 CD86/CTLA-4 상호작용의 우수한 차단을 실증한다**

[1341] 인간 CTLA-4에 특이적인 scFv-Fc(각각 핵산 및 단백질 서열에 대해 SEQ ID NO: 427 및 428 참조)를 이필리무맙의 아미노산 서열을 사용하여 설계하였다. 이필리무맙은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 완전 인간 IgG1κ 단일클론 항체(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2002/0086014 및 미국 특허 번호 6,984,720에서 10D1로 표기된 항체 참조)로, CD80(B7.1 또는 B7-1이라고도 함) 및 CD86(B7.2 또는 B7-2라고도 함)과의 상호작용을 저해하는 CTLA-4의 면역을 차단한다.

[1342] 이필리무맙 scFv 항체 단편(SEQ ID NO: 429 참조)을 생성하기 위해, 이필리무맙의 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄

(VH)를 20개 아미노산 길이의 글리신-세린(GS) 링커((GGGGS)4)로 연결하였다. scFv-Fc 항체 단편(SEQ ID NO: 428 참조)을 생성하기 위해, 이필리무맙 scFv의 가변 중쇄를 힌지 영역의 유리 시스테인의 세린으로의 돌연변이를 함유하는 인간 IgG1 Fc에 연결하였다(SEQ ID NO: 428에서 위치 272). 리더 서열(METPAQLLFLLLLWLPDTTG; SEQ ID NO: 428의 잔기 1-20에 상응함)은 인간 면역글로불린 카파 가변 3-20(IGKV3-20) 단백질의 서열로부터 유래되었다. 서열은 GenScrip GenSmart™ 코돈 최적화 도구를 사용하여 코돈 최적화되었다.

[1343] 항-CTLA-4 scFv-Fc의 중화 능력은, CTLA-4와 이의 리간드인 CD80과 CD86 사이의 상호작용을 차단하는 각각의 항체 단편의 능력을 측정하기 위해 경쟁 ELISA를 사용하여 항-CTLA-4 scFv(인간 IgG1 Fc 부분 결여)의 중화 능력과 비교하였다. HEK293T-세포는 적절한 시약:DNA 비율에서 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)을 사용하여 항-CTLA-4 scFv-Fc 또는 항-CTLA-4 scFv 항체 단편 작제물을 인코딩하는 3 마이크로그램의 DNA로 형질주입하였다. 형질주입 48시간 후, HEK293T 무세포 배양 상층액을 수합하고, 여과하고, 항-CTLA-4 항체 단편의 차단 활성을 평가하기 위해 경쟁 ELISA에 사용하였다.

[1344] 경쟁 ELISA의 경우, 마우스 CD80 또는 CD86 재조합 단백질(R&D Systems)을 100 ng/mL 농도의 고단백질 결합 96 웰 플레이트에서 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 1회 세척하고, 웰을 실온에서 1시간 동안 ELISA 차단 완충액으로 차단하였다. 그 다음, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 1회 세척하였다. 각각의 항-CTLA-4 항체 단편을 함유하는 HEK293T-세포 배양 상층액을 10 ng/mL의 재조합 뮤린 CTLA-4-인간 IgG1 Fc 키메라(R&D Systems)와 혼합하고, 웰에 첨가하고 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후에, PBS 0.05% Tween-20으로 웰을 3회 세척하고, HRP(호스래디쉬 퍼옥시다제)가 결합된 항-인간 IgG1 항체를 웰(Jackson ImmunoResearch)에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고, 검출 시약(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), Thermo Fisher Scientific)을 웰에 첨가하였다. 효소 반응을 황산(BioLegend)으로 중단하고 450 nm에서 광학 밀도를 판독하였다.

[1345] 경쟁 ELISA의 결과는 아래 표에 요약되어 있다. 항-CTLA-4 scFv-Fc는 CD86에 대한 CTLA-4의 결합을 75.5%만큼 차단하였고, CD80에 대한 CTLA-4의 결합을 40.6% 차단한 반면, 항-CTLA-4 scFv는 CD86에 대한 CTLA-4의 결합을 32.5%만큼 차단하고, CD80에 대한 CTLA-4의 결합을 7%만큼 차단하였다. 두 항체 단편 모두에서 더 높은 정도의 CD86/CTLA-4 차단 활성(CD80/CTLA-4 차단 활성과 비교하여)이 관찰되었고, 항 CTLA-4 scFv와 비교하여 항-CTLA-4 scFv-Fc에서 보다 우수한 중화 활성이 관찰되었다.

경쟁적 ELISA 결과

[1346]

항-CTLA-4 항체 단편	CD86 차단 활성 %	CD80 차단 활성 %
항-CTLA-4 scFv	32.5	7.0
항-CTLA-4 scFv-Fc	75.5	40.6

[1347] 9D9 클론으로부터 유래된 항-뮤린 CTLA-4 scFv(SEQ ID NO: 430) 및 항-뮤린 CTLA-4 scFv-Fc(SEQ ID NO: 431)를 또한 상응하는 인간 항-CTLA-4 항체 단편에 대해 상기 논의된 바와 같이 제조하였다. scFv는 IgK 리더 마우스 서열, 및 $(Gly_4Ser)_3$ 링커를 통해 연결된 클론 9D9로부터의 V_L 도메인과 V_H 도메인을 함유한다. scFv-Fc는 또한 V_H 도메인에 연결된 마우스 IgG2a Fc를 함유한다.

[1348] 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 중에는 플라스미드 상에 항-CTLA-4 scFv 항체 단편 및 항-CTLA-4 scFv-Fc 항체 단편을 포함하는 항-CTLA-4 항체 및 이의 단편을 인코딩하는 것이 포함된다. 본원에 제공된 바와 같이, 뿐만 아니라 다른 치료제를 인코딩하는 핵산 분자와의 조합을 포함한다.

[1349] **실시예 26**

[1350] **인코딩된 치료 생성물의 높은 수준의 멀티플렉스 발현을 위한 최적화된 발현 카세트**

[1351] 내부 리보솜 진입 부위(IRES)로도 알려진 요소는 5' mRNA 캡의 모방을 통해 mRNA의 리보솜 결합 및 안정화를 증강시킴으로써 단백질 번역을 촉진할 수 있다. 바이러스 및 포유류 세포로부터의 IRES 요소는 잘 알려져 있다. 이 중에서, 혈관 내피 성장 인자 및 유형 1 콜라겐 유도 단백질(VCIP)로도 알려진 내인성 인간 IRES는 반딧불이 및 레닐라(*Renilla*) 루시퍼라제를 인코딩하는 이시스트론성 벡터로부터의 발현을 증강시키는 것으로 실증되었고, 여기서, 다운스트림 유전자(즉, VCIP IRES 후에 인코딩됨)인 레닐라 루시퍼라제는 제2 프로모터에 필요성 없이 *시험관내에서* 그리고 *생체내에서* 발현되었다(예를 들어, Licursi *et al.* (2011) Gene Therapy

18(6):631-636).

[1352] 이시스트론성 및 다시스트론성(polycistronic) 작제물이 2A 펩타이드를 함유하는 인간 또는 마우스 IL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT, 또는 인간 또는 마우스 IL-15Rα-IL-15sc, huSTING N154S/R284G tazCTT, 및 항-CTLA-4 scFv-Fc의 조합을 함유하는 플라스미드를 단일 발현인자 대조군에 대한 각각의 인코딩된 페이로드/생성물의 발현에 대해 시험하였다. 추가로, VCIP IRES를 함유하는 조합 작제물을 또한 시험하였다.

[1353] HEK293T STING Null Cells(293-Dual™ Null Cells; InvivoGen)를 사용하였고,이는 내인성 STING을 함유하지 않고, 내인성 IFN-자극 반응 요소(ISRE) 프로모터의 제어 하에 놓인 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP)를 발현하며, 여기서 ISRE의 코딩 서열을 녹인(knock-in) 기술을 사용하여 SEAP ORF에 의해 대체한다. 그러므로, 유형 I IFN 유도 SEAP 생산을 모니터링함으로써 STING 활성을 평가할 수 있다. 293-Dual™ Null Cells는 또한 내인성 IFN-β 프로모터의 제어 하에 놓인 Lucia™ 루시퍼라제, 분비된 루시퍼라제를 발현한다; IFN-β의 코딩 서열을 녹인 기술을 사용하여 Lucia™ 루시퍼라제 ORF로 대체하였다. 이는 IFN-β의 발현을 모니터링함으로써 STING 활성의 평가를 가능하게 한다. 이러한 세포를 사용하여, Lucia™ 루시퍼라제의 ISRE-유도 SEAP 생산 및/또는 IFN-β-의존적 발현을 모니터링함으로써 STING 활성을 평가할 수 있다. 2개의 리포터 단백질인 SEAP 및 Lucia™ 루시퍼라제를 세포 상층액에서 표준 검정 및 검출 시약, 예컨대 QUANTI-Blue™ 및 QUANTI-Luc™ 검출 시약(InvivoGen)을 각각 사용하여 측정할 수 있다.

[1354] 세포를 폴리-L-라이신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 웰당 200,000 세포로 시딩하였고, 37℃에서 5% CO_2 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하여, 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날, 300 ng의 각각의 플라스미드 DNA, 및 40 ng의 CMV-GFP 벡터(즉, CMV 프로모터의 제어 하에 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 벡터)를 무혈청 배지에 희석시키고, FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였고, 이때 비형질주입 웰은 음성 대조군으로서 역할을 하였다(2벌 중복으로). 형질주입-후 48시간째에 각각의 시료로부터 세포 배양 상층액을 수집하였다.

[1355] ISRE-SEAP 및 IFN-β-Lucia™ 리포터 시스템을 사용하여 huSTING N154S/R284G tazCTT 변이체의 STING 활성을 평가하였다. 세포 상층액 내 유형 I IFN-자극 SEAP 생산을 모니터링함으로써 유형 I 인터페론(IFN) 활성(STING에 의해 유도됨)을 평가하였다. 20 μL의 세포 배양 상층액을 180 μL의 QUANTI-Blue™ 시약(InvivoGen)에 첨가하였고, 이는 SEAP를 측정하는 데 사용된다. SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices) 상에서 650 nm의 흡광도 파장에서 ISRE-유도 SEAP 활성을 측정함으로써 유형 I 인터페론 활성화를 결정하였다. 세포 상층액에서 유형 I IFN-자극 Lucia™ 루시퍼라제 생산을 모니터링함으로써 유형 I 인터페론(IFN) 활성(STING에 의해 유도됨)을 또한 평가하였다. 20 μL의 세포 배양 상층액을 50 μL의 QUANTI-Luc™ 시약(InvivoGen)에 첨가하였고, 이는 Lucia™ 루시퍼라제 활성을 측정하는 데 사용된다. 발광 설정에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices) 상에서 IFNβ-유도 Lucia™ 루시퍼라제 활성을 측정함으로써 유형 I 인터페론 활성화를 결정하였다.

[1356] 세포 배양 상층액을 또한 인간 또는 마우스 IL-15Rα-IL-15sc(실시예 23)의 발현, 및 인간 또는 마우스 항-CTLA-4 scFv-Fc(실시예 25 참조)의 발현에 대해 평가하였다. muIL-15Rα-IL-15sc 작제물의 경우, 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc ELISA(R&D)를 키트 설명서에 따라 사용하였다. huIL-15Rα-IL-15sc 작제물의 경우, 인간 IL-15Rα-IL-15sc ELISA(R&D)를 키트 설명서에 따라 사용하였다. 인간 및 마우스 CTLA-4-Fc(R&D Systems)와 함께 직접적인 ELISA를, 항-인간 CTLA-4 scFv-Fc 및 항-뮤린 CTLA-4 scFv-Fc를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 세포의 세포 배양 상층액 상에서 수행하여, 이러한 단백질의 발현 수준을 측정하였다.

[1357] GFP 생산을 유세포분석법에 의해 검출하고, 형질주입을 서로에 대해 정규화하는 데 사용하였다. 형질주입-후 48시간째에, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 DAPI(사멸/생존 염색)와 함께 PBS + 2% FBS에 재현탁시켰다. 유세포분석 데이터를 ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 획득하고, FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1358] 아래 표에 제시된 바와 같이, huSTING N154S/R284G tazCTT 변이체를 함유하는 모든 작제물은 ISRE-SEAP 리포터 활성 및 IFNβ-Lucia™ 루시퍼라제 리포터 활성을 나타내었다. muIL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합의 발현을 위해 VCIP IRES 및 T2A 펩타이드를 함유하는 2.1 CMV VCIP muIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT로 표기된 작제물은 GFP 공동형질주입에 의해 정규화되었을 때 가장 높은 발현 수준의 muIL-15Rα-IL-15sc를 초래한다. 유사하게는, huIL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합의

발현을 위해 VCIP IRES 및 T2A 펩타이드를 함유하는 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT로 표기된 작제물은 GFP 공동형질주입에 의해 정규화되었을 때 가장 높은 발현 수준의 huIL-15Rα-IL-15sc를 초래한다. 1.76 CMV mu 항-CTLA-4 scFv-Fc로 표기된 작제물은 GFP 공동형질주입에 의해 정규화되었을 때 가장 높은 발현 수준의 뮤린 항-CTLA-4 scFv-Fc를 초래하고, 1.76 CMV hu 항-CTLA-4 scFv-Fc로 표기된 작제물은 가장 높은 발현 수준의 인간 항-CTLA-4 scFv-Fc를 초래한다.

HEK293T STING Null 세포에서 GFP 공동형질주입에 의해 정규화된, STING 활성, IL-15Rα-IL-15c 농도, 및 항-CTLA-4 scFv-Fc 농도의 측정

마우스								
작제물	ISRE-SEAP (Abs)		IFNβ-Lucia™ (RLUs)		muIL-15Rα-IL-15sc (Abs)		mu 항-CTLA-4 scFv-Fc (Abs)	
	평균	±SD	평균	±SD	평균	±SD	평균	±SD
비형질주입	0	0	0	0	0	0	0	0
1.76 CMV β-Actin	-1.71E-05	1.04E-05	-0.01597	0.6049	0	0	0.002325	0.0004565
1.76 CMV muIL-15Rα-IL-15sc	1.45E-07	4.79E-06	0.07555	0.3292	947.4	164.1	NA*	NA*
1.76 CMV huSTING N154S/R284G tazCTT	4.07E-02	4.29E-03	18.25	1.27	NA	NA	NA*	NA*
1.76 CMV muIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT	3.79E-02	2.19E-04	28.47	1.523	996.8	364.6	NA*	NA*
2.1 CMV VCIP muIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT	4.73E-02	7.60E-03	7.145	0.8812	1636	287.9	NA*	NA*
1.76 CMV mu 항-CTLA-4 scFv-Fc	-1.54E-06	1.81E-05	-0.6844	0.1614	NA*	NA*	0.03733	0.003862

[1359]

1.76 CMV mu 항-CTLA-4 scFv-Fc T2A muIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING tazCTT N154S/R284G tazCTT	3.51E-02	1.85E-04	3.225	0.2805	599.6	190.4	0.01676	0.00193
2.1 CMV VCIP mu 항-CTLA-4 scFv-Fc T2A muIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT	3.62E-02	1.26E-03	4.836	0.5915	610.1	230.7	0.01461	0.002674
인간								
작제물	**ISRE-SEAP (Abs)**		**IFN β-Lucia™ (RLUs)**		**huIL-15Rα-IL-15sc (Abs)**		**hu 항-CTLA-4 scFv-Fc (Abs)**	
	평균	**±SD**	**평균**	**±SD**	**평균**	**±SD**	**평균**	**±SD**
비형질주입	0	0	0	0	0	0	0	0
1.76 CMV β-Actin	-1.71E-05	1.04E-05	-0.01597	0.6049	0	0	0.001643	0.00007734
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc	-1.18E-05	9.34E-06	0.03296	0.1661	2407	4.101	NA*	NA*
1.76 CMV huSTING N154S/R284G tazCTT	4.07E-02	4.29E-03	18.25	± 1.27	NA*	NA*	NA*	NA*
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT	4.27E-02	3.76E-03	10.5	0.7221	1439	869.4	NA*	NA*
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT	4.18E-02	4.63E-03	12.79	1.151	2758	235.1	NA*	NA*
1.76 CMV hu 항-CTLA-4 scFv-Fc	-8.73E-06	5.53E-06	-0.333	0.04487	NA*	NA*	0.06436	0.006539
1.76 CMV hu 항-CTLA-4 scFv-Fc T2A	3.80E-02	1.32E-03	6.962	0.01366	2071	557.5	0.02265	0.001188

[1360]

huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT								
2.1 CMV VCIP hu 항-CTLA-4 scFv-Fc T2A huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT	3.53E-02	3.25E-03	7.12	1.998	936.3	149.4	0.01687	0.0007017

SD = 표준 편차

*NA = 적용 불가능함

[1361]

[1362] **실시예 27**

[1363] **huIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합을 인코딩하는 발현 플라스미드**

[1364] huIL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT의 가장 높은 발현을 갖는 플라스미드(들)를 식별하기 위해, 상이한 2A 펩타이드(예를 들어, T2A 또는 P2A), 및/또는 상이한 전사후 조절 요소(예를 들어, HPRE 또는 WPRE), 및/또는 상이한 poly(A) 테일(예를 들어, 소 성장 호르몬 poly(A) (bGHpA) 또는 시미안 바이러스(simian virus) 40 poly(A) (SV40pA))과 함께 huIL-15Rα-IL-15sc 및/또는 huSTING N154S/R284G tazCTT를 인코딩하는 핵산 분자를 함유하고 그리고/또는 VCIP IRES를 함유하는 플라스미드를 클로닝하였다. 추가로, 일부 작제물에서, 제1 페이로드(즉, huIL-15Rα-IL-15sc)를 인코딩하는 핵산 다음에 그리고 2A 펩타이드를 인코딩하는 핵산 앞에서 RRKR 및 RAKR을 포함한 짧은 펩타이드 스페이서, 및 상이한 길이의 다른 스페이서를 인코딩하였다. RRKR 및 RAKR을 푸린(furin) 프로테아제 절단 부위에서 설계하고, 해당 위치에 배치하여 2A 펩타이드 서열의 적절한 가공을 용이하게 하였다. 플라스미드를 우선 HEK293T STING Null Cells(ISG/KI-IFNβ) 세포(InvivoGen)에서의 형질주입에 의한 발현 및 기능성에 대해 평가하였다.

[1365] 내인성 IFN-자극 반응 요소(ISRE) 프로모터의 제어 하에 놓인, 내인성 STING을 함유하지 않고 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP)를 발현하는 HEK293T STING Null Cells(293-Dual™ Null Cells(ISG-SEAP/KI-[IFN-β]Lucia; InvivoGen)를 사용하였으며, 여기서 ISRE의 코딩 서열을 녹인 기술을 사용하여 SEAP ORF로 대체한다. 상기 논의된 바와 같이, 293-Dual™ Null Cells는 또한 내인성 IFN-β 프로모터의 제어 하에 있는 분비된 루시퍼라제인 Lucia™ 루시퍼라제를 발현하며, 여기서 IFN-β의 코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여 Lucia™ 루시퍼라제 ORF로 대체되었다. 세포를 폴리-L-라이신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 웰당 200,000 세포로 시딩하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 인큐베이션하여, 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날, 300 ng의 각각의 플라스미드 DNA, 및 40 ng의 CMV-GFP 벡터를 무혈청 배지에 희석시키고 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였으며, 이때 비형질주입 웰은 음성 대조군으로서 역할을 하였다(2벌 중복으로). 형질주입-후 48시간째에 각각의 시료로부터 세포 배양 상층액을 분석을 위해 수집하였다.

[1366] huSTING N154S/R284G tazCTT 변형된 STING 단백질의 STING 활성을 HEK293T STING Null(ISG-SEAP/KI-[IFN-β]Lucia) 리포터 세포주(InvivoGen)로 평가하였다. 이러한 세포를 사용하여, 세포 상층액에서 유형 I IFN-자극 Lucia™ 루시퍼라제 생산을 모니터링함으로써 유형 I 인터페론(IFN) 활성(STING에 의해 유도됨)을 평가한다. IFNβ 유도를 IFNβ-Lucia 리포터로 측정한다. 20 μL의 세포 배양 상층액을 50 μL의 QUANTI-Luc™ 시약(InvivoGen)에 첨가하였고, 이를 Lucia™ 루시퍼라제 활성의 측정에 사용한다. 발광 설정에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices) 상에서 IFNβ-유도 Lucia™ 루시퍼라제 활성을 측정함으로써 유형 I 인터페론 활성화를 결정하였다. 세포 배양 상층액을 또한 ELISA(R&D)에 의해 키트 설명서에 따라 인간 IL-15Rα-IL-15sc의 발현에 대해 평가하였다.

[1367] GFP를 유세포분석에 의해 검출하였고, GFP의 발현 수준(형광에 의해 측정됨)을 사용하여, 형질주입을 서로에 대해 정규화하였다. 형질주입-후 48시간째에, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 DAPI(사멸/생존 염색)와 함께 PBS + 2% FBS에 재현탁시켰다. 유세포분석 데이터를 ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 획득하고, FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1368] 아래 2개의 표에 제시된 바와 같이, 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기된 플라스미드 작제물은 IFNβ-Lucia™ 리포터로부터 가장 높은 정규화된 발광 값(아래 첫번째 표), 및 또한 ELISA에 의해 결정된 바와 같이 발현된 huIL-15Rα-IL-15sc의 가장 높은 정규화된 농도(아래 두번째 표)를 초래하였다.

[1369] 아래 첫번째 표에 제시된 바와 같이, huIL-15Rα-IL-15sc 단독을 인코딩하는 작제물(그리고 STING 변이체 없음)은 예상된 바와 같이 STING-유도 유형 I IFN 활성을 나타내지 않는다. huSTING N154S/R284G tazCTT만 인코딩하는 작제물은 높은 수준의 STING-유도 유형 I IFN 활성을 나타낸다. 페이로드를 둘 다 인코딩하는 작제물의 경우, P2A 펩타이드와 WPRE의 조합은 T2A 및 P2A와 HPRE의 조합 또는 T2A와 WPRE의 조합보다 더 높은 수준의 STING 활성(즉, 더 높은 수준의 STING의 발현)을 초래한다. 추가로, 더 높은 수준의 STING 활성은 SV40 poly(A) 테일보다 bGH poly(A) 테일을 함유하는 작제물로 관찰되었다. 짧은 펩타이드 스페이서, 예컨대 RAKR 또는 RRKR의 첨가는 이러한 스페이서를 함유하지 않는 동일한 작제물과 비교하여 STING 활성 수준을 약간 증가시킨다. 특정한 작제물, 예컨대 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA; 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA; 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA; 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING

N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA; 및 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc RAKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기된 것에서, VCIP IRES의 첨가는 VCIP IRES를 함유하지 않는 동일한 작제물과 비교하여 STING 활성 수준을 증가시킨다.

[1370] 아래 두번째 표에 제시된 바와 같이, huIL-15Rα-IL-15sc의 발현 수준은 SV40 poly(A) 테일보다 bGH poly(A) 테일을 함유하는 작제물로부터 더 높고, 일반적으로, WPRE를 함유하는 작제물은 HPRE를 함유하는 동일한 작제물보다 더 높은 수준의 huIL-15Rα-IL-15sc를 초래한다. CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA를 인코딩하는 작제물에서 huIL-15Rα-IL-15sc를 인코딩하는 핵산 서열 다음의 RAKR 짧은 펩타이드 스페이서의 첨가는 huIL-15Rα-IL-15sc의 발현 수준을 증가시켰다. 2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA로 표기된 것을 제외한 모든 작제물에서, 작제물의 업스트림에서 VCIP IRES(2A 펩타이드에 더하여)의 첨가는 huIL-15Rα-IL-15sc의 유의하게 증가된 발현을 초래한다. 예를 들어 1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기된 작제물에서 2A 펩타이드로부터 VCIP IRES로의 대체는 유사한 발현 수준의 huIL-15Rα-IL-15sc를 초래한다. 2A 펩타이드로부터 VCIP IRES로의 대체, 및 예를 들어, 1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc 더 긴 스페이서 VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기된 작제물에서 huIL-15Rα-IL-15sc를 인코딩하는 핵산과 VCIP IRES 사이에서 더 긴 스페이서의 첨가는 huIL-15Rα-IL-15sc의 유의하게 증가된 발현 수준을 초래한다. 작제물 내 스페이서 서열은 제1 ORF의 정지 코돈과 제2 ORF의 업스트림의 VCIP IRES 사이에 놓인 핵산 서열이다. 예를 들어 아래 표에서 "새로운 스페이서"로 표기된 스페이서는 서열 ACGTCTTCTCTTTTTAAAGGACCTCGTGAAATAAAAGTGC(SEQ ID NO: 408)를 갖고, 아래 표에서 "더 긴 스페이서"로 표기된 스페이서는 서열 TCCGAGCCAAGTAAGGAGGTCCCTCTCTCTCTCTCCCCCCACGTCTTCTCTTTTTAAAGGACCTCGTGAAATAAAAGTGC(SEQ ID NO: 409)를 갖는다.

[1371] 이러한 결과는, VCIP IRES의 첨가가 일반적으로 이시스트론성 작제물 상에서 인코딩된 제1 페이로드의 발현 수준을 증가시키고, 특정한 작제물에서 제2 페이로드의 발현 수준을 증가시킨다.

형질주입된 HEK293T STING Null 세포에서 IFNβ-Lucia™ 리포터로부터의 발광 수준에 의해 측정되고 GFP 공동형질주입에 의해 정규화된 바와 같은 STING-유도 유형 I IFN 활성

작제물	IFNβ-Lucia™ 리포터 발광 (RLUs)	
	평균	SD
비형질주입 대조군	0	0
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA	-0.7073	± 0.05241
1.76 CMV huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	7.455	± 0.7934
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	3.293	± 0.8576
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	3.758	± 0.1993
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	3.867	± 1.297
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	8.716	± 0.4241
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	0.9444	± 0.03282
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	0.4778	± 0.03872
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	0.4436	± 0.1342
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	0.483	± 0.07984

[1372]

작제물	IFNβ-Lucia™ 리포터 발광 (RLUs)	
	평균	SD
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc RAKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	3.621	± 0.5816
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc RRKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	4.938	± 0.6406
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	9.356	± 2.116
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	4.065	± 0.02317
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	4.648	± 1.199
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	4.666	± 0.8666
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	-0.2763	± 0.4616
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	0.2751	± 0.2559
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	0.8467	± 0.0387
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	0.3058	± 0.3335
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc RAKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	7.278	± 0.6898
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc RRKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	2.675	± 0.2714
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	0.5301	± 0.09792
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc New spacer* VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	0.869	± 0.04427
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc Longer spacer** VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1.241	± 0.03473

SD = 표준 편차

*새로운 스페이서 = ACGTCTTCTCTTTTTAAAGGACCTCGTGAAATAAAAGTGC

**더 긴 스페이서 =

TCCGAGCCAAGTAAGGAGGTCCCTCTCTCTCTCTCCCCCCACGTCTTCTCTTTTTAAAGGAC CTCGTGAAATAAAAGTGC

[1373]

형질주입된 HEK293T STING Null 세포에서 ELISA 에 의해 측정되고 GFP 공동형질주입에 의해 정규화된 바와 같은 발현된 huIL-15Rα-IL-15sc 의 농도

작제물	형광 (Abs)	
	평균	SD
비형질주입 대조군	0	0
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA	1619	± 18.53
1.76 CMV huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	12.04	± 35.09
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1586	± 88.91
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1906	± 35.82
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	2244	± 477
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	2056	± 71.49
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	40.33	± 9.336
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	268.9	± 10.53
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	324.5	± 51.87
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	397.7	± 42.62
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc RAKR-T2A huSTING tazCTT N154S/R284G HPRE bGHpA	1915	± 16.64
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc RRKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1093	± 3.221
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	2758	± 114.5
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	2457	± 1.527
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE bGHpA	3616	± 202.8
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING tazCTT N154S/R284G WPRE bGHpA	2327	± 199
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING tazCTT N154S/R284G HPRE SV40pA	397.5	± 148.8
2.1 CMVVCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE SV40pA	184.3	± 39.19
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	551	± 15.35
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT WPRE SV40pA	662.9	± 99.41

[1374]

작제물	형광 (Abs)	
	평균	SD
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc RAKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	2553	± 71.83
2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc RRKR-T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1919	± 332.6
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1507	± 97.77
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc New spacer* VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1385	± 28.04
1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc Longer spacer** VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	2648	± 178.2

*새로운 스페이서 = ACGTCTTCTCTTTTTAAAGGACCTCGTGAAATAAAAGTGC

**더 긴 스페이서 =

TCCGAGCCAAGTAAGGAGGTCCCTCTCTCTCTCTCCCCCCACGTCTTCTCTTTTTAAAGGAC CTCGTGAAATAAAAGTGC

[1375]

[1376] 상이한 huIL-15Rα-IL-15sc and huSTING N154S/R284G tazCTT 작제물에 의해 인간 M2 대식세포에서 유도된 다운스트림 IFN-β 신호전달의 차이를 결정하였다. huIL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT를 인코딩하는 핵산을, huIL-15Rα-IL-15sc 또는 huSTING N154S/R284G tazCTT 코딩 서열의 개시 코돈 앞에 놓인 VCIP IRES와 함께 그리고 없이 벡터 내로 클로닝하였다.

[1377] 건강한 인간 공여자로부터 단리된 냉동된 인간 단핵구를 완전 배지(RPMI-1640 + 10% FBS)에서 해동시키고, 실온에서 600xg에서 10분 동안 원심분리에 의해 세척하였다. 100 ng/mL 인간 M-CSF를 함유하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지(StemCell Technologies)에서 단핵구를 재현탁시켰다. 그 후에, 단핵구(웰당 5e5 세포)를 24-웰 플레이트에 500 μL의 최종 부피로 시딩하였다. 5일 후에, 250 μL의, 300 ng/mL 인간 M-CSF + 60 ng/mL 인간 IL-4 + 60 ng/mL 인간 IL-10을 함유하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지(StemCell Technologies)를 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 2일 더 인큐베이션하였다. 제7일에, 세포를 Viromer® RED mRNA 및 플라스미드 형질주입 시약을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 형질주입하였다. 750 ng의, 상이한 플라스미드 작제물 패널로부터의 플라스미드 DNA, 뿐만 아니라 "DNA 무함유" 대조군(secNanoLuc®를 인코딩함)을 제공된 완충액에 희석시키고, Viromer® RED 형질주입 시약과 혼합하고, 혼합물을 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여, DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되게 하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 24-웰 플레이트의 각각의 웰에(3벌 중복으로) 서서히 첨가하고, 플레이트를 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 세포 배양 상층액을 48시간 후에 수합하고, 인간 사이토카인 패널 U-Plex 검정(Meso Scale Discovery)을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 IFN-β에 대해 검정하였다. 3개 측정의 평균을 계산하고, DNA 무함유 대조군으로부터의 배경 신호를 차감하여, 순수한(net) IFN-β 발현 수준을 계산하였다.

[1378] 아래 표에 요약된 결과는 huIL-15Rα-IL-15sc 단독을 인코딩하는(STING 없음) 작제물이 형질주입된 인간 M2 대식세포에서 임의의 IFN-β 발현을 유도하지 않음을 보여준다. 형질주입된 인간 M2 대식세포에서 가장 높은 수준의 IFN-β 발현을 초래한 작제물은 pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기된 작제물이다. 이러한 작제물(pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기됨)은 pATI1.76 백본을 갖고 VCIP IRES를 전혀 갖지 않거나 huIL-15Rα-IL-15sc의 ORF와 huSTING N154S/R284G tazCTT(즉, 여기서 VCIP IRES는 2A 서열을 대체함) 사이에서 VCIP IRES를 갖는 작제물보다 더 높은 수준의 IFN-β 발현을 초래한다. pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA로 표기된 작제물은 T2A 서열 대신에 P2A 서열을 함유하는 상응하는 작제물과 비교하여 더 높은 IFN-β 신호를 초래한다. 이러한 결과는, 2개의 ORF의 업스트림에 VCIP IRES를 함유하고 2개의 ORF 사이에 2A 서열, 특히 T2A를 함유하는 이시스트론성 작제물이 제2 인코딩된 페이로드(이 경우, 변형된 STING 단백질)의 더 높은 발현 수준을 초래함을 나타낸다.

다양한 작제물에 의한 인간 M2 대식세포의 형질주입 후 IFN-β 단백질 발현의 순(net) 신호

작제물	순 IFN-β (pg/mL)	표준 편차
pATI2.1 CMV VCIP secNanoLuc® HPRE bGHpA	0.00	± 133.76
pATI1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA	-411.92	± 229.81
pATI1.76 CMV huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	2710.37	± 579.12
pATI1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	-788.33	± 139.87
pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	5505.08	± 397.48
pATI2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL-15sc P2A huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1425.51	± 62.06
pATI1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	1630.63	± 709.30
pATI1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc 새로운 스페이서* VCIP huSTING tazCTT N154S/R284G HPRE bGHpA	2014.95	± 97.68
pATI1.76 CMV huIL-15Rα-IL-15sc 더 긴 스페이서** VCIP huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	385.71	± 158.29

*새로운 스페이서 = ACGTCTTCTCTTTTTAAAGGACCTCGTGAAATAAAAGTGC

**더 긴 스페이서 = TCCGAGCCAAGTAAGGAGGTCCCTCTCTCTCTCTCCCCCCACGTCTTCTCTTTTTAAAGGACCTCGTGAAATAAAAGTGC

[1379]

[1380] **실시예 28**

[1381] **플라스미드 전달 을 향상시키기 위한 방법으로서의 포스포리파제 D의 발현**

[1382] *살모넬라 엔테리카(Salmonella enterica)* 혈청형 티피무리움은 이의 발병의 일부로서, 골수성 세포에 의해 표식되고 독성(virulence) 프로그램을 활성화시켜, 식포(phagosome)를 살모넬라-함유 액포(SCV)로 변경시킨다. 플라스미드 상에서 인코딩된 유전자의 이소성 발현이 SCV로부터 핵으로의 플라스미드 전좌를 필요로 하는 한편, 이러한 전좌 사건의 기전은 알려져 있지 않다. 이러한 예는 조작된 면역자극성 박테리아로부터의 플라스미드 이동을 향상시키기 위한 조작 접근법을 제공한다.

[1383] *리켓치아 프로와제키이(Rickettsia prowazekii)*는 숙주 세포기질에 접근하고 복제하기 위해 식포 구획을 탈출해야 하는 그람-음성 세포내 병원체이다. 이전의 연구는, 분비된 *알. 프로와제키이(R. prowazekii)* 독성 인자인 포스포리파제 D(Pld)가 *에스. 엔테리카(S. enterica)*로 클로닝되어, SCV로부터의 탈출을 용이하게 할 수 있음을 보여주었다(예를 들어, Whitworth *et al.* (2005) *Infection and* 면역 73(10):6668-6673). 박테리아가 포식 세포 내로 전달된 후 높은 발현을 보장하기 위해 Pld(SEQ ID NO: 433)를 인코딩하는 *pld* 유전자(SEQ ID NO: 432)를 SCV에서 유도되는 ssaG 프로모터의 제어 하에 배치시켰다(예를 들어, Walthers *et al.* (2007) *Molecular Microbiology* 65(2):477-493). 이러한 박테리아 발현 카세트를 CMV-NanoLuc® 및 EF1α-NanoLuc®로 표기된 2개의 나노루시퍼라제® 리포터 플라스미드의 백본 내로 클로닝하였고, 플라스미드 전달을 인간 대식세포에서 평가하였다.

[1384] 감염된 세포 내로의 플라스미드 전달을 측정하기 위해, 1차 인간 단핵구를 100 ng/ml GM-CSF를 함유하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지(StemCell Technologies)에서 5일 동안 분화시켰다. 제6일에, 세포에 150 ng/ml GM-CSF 및 60 ng/ml huIL-4를 함유하는 추가의 배지를 48시간 동안 보충하였다. 그 후에, 세포를 CMV-NanoLuc® , CMV-NanoLuc® + *pld*, EF1α-NanoLuc® , 또는 EF1α-NanoLuc® + *pld* 플라스미드 중 하나를 포함하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD* 박테리아의 정지기 균주로 박토펙션시켰다. 박테리아 균주를 4XYT 배지에서 37℃에서 밤새 100의 MOI(감염 다중도: multiplicity of infection)로 성장시켰다. 감염된 세포를 500 rcf에서 5분 동안 원심분리한 다음, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 그 후에 세포를 DPBS로 3회 세척하고, 100 μg/ml 겐타마이신을 함유하는 신선한 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지에서 인큐베이션하여, 임의의 세포외 박테리아를 제거하였다. 감염후 24시간 및 48시간째에, 세포 상층액을 수합하고, NanoLuci-ferase® 루시퍼라제 함량을 루시퍼라제 검정(Promega)을 사용하여 측정하였다. 세포를 또한 PBS 중 0.1% Triton X로 용

해시키고 평판배양하여, 세포 내부에 남아 있는 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 나열하였다.

[1385] 아래 표에 요약된 결과는, CMV 프로모터의 제어 하에 배치되었을 때, *pld-인코딩* 군(즉, CMV-NanoLuc® 루시퍼라제 + *pld* 플라스미드)으로부터 발현된 나노루시퍼라제®의 수준이 감염후 24시간째에 CMV-NanoLuc® 루시퍼라제 플라스미드 단독으로부터 발현된 나노루시퍼라제®의 수준보다 더 컸음을 보여주었다; 이러한 차이는 감염-후 48시간째에 규모가 커졌다.

[1386] *pld*를 인코딩하는 조작된 면역자극성 박테리아에 의한 세포의 박토펙션은 또한, NanoLuc®가 EF-1α 프로모터의 제어 하에 배치되었을 때 *pld*가 없는 상응하는 감염보다 더 높은 발광 수준을 초래하였다. 이러한 효과는 CMV 프로모터를 이용하는 군에서 관찰된 것보다 더 낮았으며, 이는 일부 *pld* 발현이 CMV 프로모터로부터의 누출에 의해 증강됨을 나타낸다.

Pld 를 인코딩하는 플라스미드 대 Pld 를 인코딩하지 않는 플라스미드를 함유하는 박테리아 균주로 감염된 인간 대식세포의 세포 상층액 내 루시퍼라제 발현 수준의 비교

박테리아에 의해 전달된 플라스미드	평균 발광 t=0 (RLUs)	SD t=0 (RLUs)	평균 발광 24 hpi (RLUs)	SD 24 hpi (RLUs)	평균 발광 48 hpi (RLUs)	SD 48 hpi (RLUs)
비감염	122.9	± 47.7	177.9	± 25.8	157.6	± 18.2
CMV-NanoLuc®	2057.0	± 517.2	2291.2	± 233.9	3443.9	± 124.4
CMV-NanoLuc® + *pld*	1412.6	± 73.6	8155.0	± 2156.2	12054.8	± 3112.9
EF1α-NanoLuc®	154.6	± 20.8	148.6	± 24.3	132.5	± 5.2
EF1α-NanoLuc® + *pld*	165.6	± 7.5	223.4	± 18.3	256.0	± 24.7

hpi =감염후 시간; SD = 표준 편차; RLUs = 상대 광 단위.

[1387]

[1388] 결과는 또한, 감염후(hpi) 24시간 및 48시간째에 세포 내부에 남아 있는 CMV-NanoLuc® + *pld*-인코딩 균주의 CFU 수가 CMV-NanoLuc® 루시퍼라제 플라스미드 단독을 보유하는 박테리아의 CFU 수보다 더 큰 비율로 저하되었음을 보여주었고, 이는 동일한 세포 내의 각각의 균주에 대한 상이한 운명을 나타낸다.

상이한 시점에서 세포 내부에 남아 있는 CFUs

균주	CFUs, 0 감염후 시간	CFUs, 24 감염후 시간	CFUs, 48 감염후 시간
CMV-NanoLuc®	5.4×10^7	1.5×10^5	4.2×10^3
CMV-NanoLuc® + *pld*	8.0×10^7	1.6×10^4	6.4×10^2
EF1α-NanoLuc®	7.8×10^7	5.5×10^4	2.5×10^3
EF1α-NanoLuc® + *pld*	6.8×10^7	2.6×10^5	2.3×10^3

[1389]

[1390] 박테리아 플라스미드 내 인코딩 포스포리파제 D가 동일한 플라스미드 상에서 인코딩된 면역조절성 페이로드의 전달을 증강시키는지 결정하기 위해, RAW-Dual™ TLR4-KO 세포(STING을 발현함; InvivoGen)를, *pld*를 인코딩하는 핵산과 함께 그리고 없이 박테리아 균주 함유 플라스미드로 감염시켰다. RAW-Dual™ TLR4-KO 세포는 인터페론-자극 반응 요소(ISRE)의 제어 하에 Lucia™ 루시퍼라제 리포터를 인코딩한다. 세포를 DMEM + 10% FBS에서 배양하고, 웰 내로 시딩하고, 밤새 부착되게 하였다. 박토페션을, ssaG 프로모터의 제어 하에 *pld*를 인코딩하는 핵산과 함께 또는 없이 huIL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646△*asd*/△FLG/△*pagP*/△*ansB*/△*csgD*의 균주를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 비감염 세포, 및 5 μg/ml의 STING 작용제 3'5' RpRp c-디-AMP로 처리된 비감염 세포를 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로서 사용하였다. 감염-후 48시간째에, 세포 상층액을 수합하고, 발현된 Lucia™ 루시퍼라제의 수준을 루시퍼라제 검정(Promega)을 사용하여 측정하였다.

[1391] 아래 표에 제시된 결과는, *pld*가 감염 동안 인간 IL-15Rα-IL-15sc 및 STING 돌연변이체 폴리펩타이드를 인코딩하는 플라스미드로부터 발현되었을 때, ISRE 활성(Lucia™ 루시퍼라제 발현에 의해 측정된 바와 같음)이 *pld* 발현의 부재 하에서보다 더 높았음을 보여준다. ISRE 활성은 STING-유도 유형 I IFN 활성의 측정치이고, 그러므로, 세포에서 STING 변이체를 인코딩하는 플라스미드의 전달 및 STING 변이체의 발현을 나타낸다. 그러므로, 포스포리파제 D(pld)의 발현은 면역조절성 페이로드를 또한 인코딩하는 플라스미드의 전달을 증강시킨다.

면역자극성 박테리아에 의한 면역조절성 페이로드 조합을 인코딩하는 플라스미드의 전달에 미치는 *pld* 발현의 효과

플라스미드 작제물	평균 발광 (RLUs)	STDEV
비감염 세포	63.6	± 12.1
비감염 세포 + 5 μg/ml 3'5' RpRp c-디-AMP	1052.6	± 32.3
VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT	80.5	± 20.9
VCIP huIL-15Rα-IL-15sc T2A huSTING N154S/R284G tazCTT (P-ssaG-*pld*)	108.3	± 4.5

[1392] STDEV = 표준 편차

[1393] **실시예 29**

[1394] **뮤린 IL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합, 및 뮤린 항-CTLA-4 scFv-Fc와의 이의 조합은 골수성 세포로부터 CXCL10의 분비를 유도하고 T-세포의 활성화를 유도한다**

[1395] T-세포 및 골수성 세포의 활성화 및 기능에 미치는 면역조절성 페이로드 및 이의 조합의 발현의 영향을 평가하였다. 이 실시예는 항원-특이적 T-세포(CD25 발현 및 IFN-γ 분비의 측면에서)의 활성화 및 골수성 세포에 의한 항종양 T-세포의 모집에 관여하는 핵심 케모카인인 CXCL10의 분비에 미치는 본원에 제공된 면역자극성 박테리아에 의한 다양한 면역조절성 페이로드 조합의 전달의 영향을 기재하고 실증한다. 분비된 사이토카인, 예컨대 IFN-γ, IFN-β, 및 CXCL10(IP-10)의 수준을 보호적 항종양 면역력의 상관관계로서 측정하고, CD25 세포 표면 발현을 T-세포 활성화의 마커로서 모니터링하였다. 이를 마우스 골수 유래 수지상 세포(BMDCs)를 페이로드의 다양한 조합을 인코딩하는 플라스미드로 형질주입하고, 형질주입된 수지상 세포를 자가 마우스 T-세포와 공동배양한 다음, 생성된 사이토카인을 식별험으로써 평가하였다.

[1396] 면역조절성 페이로드/단백질을 인코딩하는 플라이스미드는 단일 페이로드를 인코딩하는 것, 뿐만 아니라 페이로드의 조합을 인코딩하는 것을 포함하였다. 예를 들어, 아래 표에 제시된 것과 같이, 인코딩된 페이로드는 뮤린(mu) IL-15Rα-IL-15sc(IL-15/IL-15Rα 복합체, IL-15/IL-15Rα 사슬 복합체, IL-15/IL-15R 알파 사슬 복합체, IL-15 복합체, 및 IL-15cplex로도 지칭됨); 뮤린 항-CTLA-4 scFv-Fc(클론 9D9); 및 huSTING N154S/R284G tazCTT(인간 STING을 GOF 돌연변이 N154S 및 R284G와 함께 함유하고 인간 STING의 C-말단 테일(CTT)을 태즈메니아 데빌 STING의 CTT로 대체한 키메라 단백질); 및 이의 조합을 포함하였다.

[1397] 페이로드의 조합은, T2A 및/또는 P2A 펩타이드를 사용하여 단일 플라스미드에 발현되는 2개 또는 3개의 페이로드를 포함하여, 단백질은 동일한 프로모터의 제어 하에 인코딩된다. 페이로드 조합은 하기를 포함하였다: 1) 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc 및d 인간 STING N154S/R284G tazCTT; 및 2) 뮤린 항-CTLA-4 scFv-Fc, 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc, 및 인간 STING N154S/R284G tazCTT.

[1398] 골수-유래 수지상 세포(BMDCs)를 STING 결핍인 Goldenticket 마우스로부터 분화시켰고, 세포를 조사된 페이로드의 다양한 조합을 인코딩하는 플라스미드로 형질주입하였다. 형질주입후 24시간째에, 세포 상층액을 수합하고, BMDC 배양 상층액에서 분비된 CXCL10의 수준을 Meso Scale Discovery의 U-Plex 검정 플랫폼을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 측정하였다.

[1399] $CD8^+$ T-세포 활성화를 측정하기 위해, 형질주입된 BMDC에 $CD8^+$ T-세포에 의해 인식되는 주조직적합성 복합체(MHC) 부류 I(H-2Kb)-제한 펩타이드 에피토프인 닭 오브알부민(OVA) SIINFEKL($OVA_{257-264}$) 펩타이드로 감작시켰다. MHC 부류 I 분자 H-2Kb에 의해 제시되는 SIINFEKL에 특이적인 T-세포 수용체(TCRs)를 발현하는 $Rag1^{-/-}$ OT-I 마우스로부터 단리된 비장 T-세포를 공동배양을 위해 BMDC에 첨가하였다. 24시간의 BMDC/T-세포 공동배양 후, 상층액을 수합하고, 분비된 IFN-γ의 수준을 Meso Scale Discovery로부터의 U-Plex 검정 플랫폼을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 측정하였다.

[1400] 공동배양된 세포를 또한 수합하고, $CD8^+$ T-세포를 피코에리트린(PE)-접합 뮤린 항-CD25 항체(클론 PC61, BioLegend)로 염색하여, CD25 T-세포 활성화 마커의 발현 수준을 결정하였다.

[1401] 결과를 아래 표에 요약하며, 이는 다양한 단일 및 조합 페이로드를 인코딩하는 플라스미드를 사용한 형질주입에 대한 반응으로 BMDC에 의해 분비된 CXCL10의 수준, 뿐만 아니라 $CD8^+$ T-세포에 의해 분비된 IFN-γ의 수준, 및 형질주입된 BMDC와 공동배양 후 T-세포 활성화(CD25 발현의 측면에서)의 수준을 보여준다.

[1402] 결과는 huSTING N154S/R284G tazCTT 단독이 BMDC에 의한 매우 높은 수준의 CXCL10 분비를 유도함을 보여준다. 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합 또는 뮤린 항-CTLA-4 scFv-Fc + 뮤린 IL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합도 BMDC에 의한 높은 수준의 CXCL10 분비를 유도한다.

[1403] 결과는 또한 인간 T-세포에 의한 높은 수준의 IFN-γ 분비를 유도하고 T-세포의 활성화(CD25 발현)를 유도하는 인코딩된 페이로드의 예시적인 조합을 보여준다. 증가된 효과는 muIL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합으로 관찰되었다. muIL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합은 또한 $CD8^+$ T 세포 반응의 활성화 및 CD25의 발현을 증가시킨다. 이러한 결과는 IL-15Rα-IL-15sc와 기능 획득 돌연변이 및 NF-κB 신호전달을 감소시키는 CTT 대체를 갖는 돌연변이를 갖는 STING 키메라의 변형의 조합을 종양 미세환경으로 전달하는 것이 유리한 항종양 면역 반응을 증가시키고 바람직하지 않은 염증 반응을 감소시킴을 나타낸다.

BMDC 처리 (형질주입)	BMDCs 에 의해 분비된 CXCL10 (pg/ml)		$CD8^+$ T-세포에 의해 분비된 IFN-γ (pg/ml)		$CD8^+$ T-세포 상에서의 CD25 발현 %	
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
비형질주입 대조군	11	0	1102	70	17	3
Beta-actin (플라스미드 대조군)	159	18	1391	27	26	1
muIL-15Rα-IL-15sc	286	43	1705	139	43	1
mu 항-CTLA-4 scFv-Fc	627	9	2182	87	41	7
huSTING N154S/R284G tazCTT	3612	62	2731	121	54	1
muIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT	2340	190	2973	246	70	21
mu 항-CTLA-4 scFv-Fc + muIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT	1860	96	3098	165	51	2

SEM = 평균의 표준 오차

[1404]

[1405] 종양-체류 골수성 세포 및/또는 종양 미세환경에서 페이로드의 발현을 위해 본원에 제공된 면역자극성 박테리아 또는 종양용해성 바이러스 또는 벡터와 같은 다른 전달 비히클에 의한 인코딩된 페이로드의 이러한 조합의 전달은 치료받은 대상체에서 증가된 항종양 반응을 제공한다. 아래 실시예에서 또한 제시된 바와 같이, 키메라를 포함하여 기능-획득 돌연변이를 갖는 변형된 STING 단백질과 사이토카인의 조합은 치료받은 대상체에서 추가적인 유리한 항종양 반응을 초래한다.

[1406] **실시예 30**

[1407] **저분자 STING 작용제와 조합된 인간 재조합 IL-15는 골수성 세포로부터 CXCL10의 분비를 유도하고, T-세포의 활성화를 유도한다**

[1408] 이 실시예는 T-세포 및 골수 세포의 활성화 및 기능에 대한 인간 면역조절 페이로드 및 이의 조합의 발현의 영향을 보여준다. IFN-γ 및 CXCL10(IP-10)과 같은 분비된 사이토카인의 수준을 보호 항종양 면역력의 지표로 측정하였다. 이 실시예는 재조합 단량체 인간 IL-15 사이토카인 및 2'3'-c-디-AM(PS)2(Rp, Rp), 저분자 STING(smSTING) 작용제가, 항종양 T 세포 모집에 관여하는 케모카인인 골수 세포에 의한 CXCL10의 분비 및 항원 특이적 T 세포에 의한 IFN-γ 분비에 미치는 영향을 기재하고 실증한다. smSTING 작용제는 소포체-체류 STING에 의해 인식된 후 유형 I 인터페론(IFN)의 생산을 유도하는 것으로 알려진 환식 디뉴클레오타이드(CDN)이다. 2'3'-c-디-AM(PS)2(Rp, Rp)는 3'3'-환식 아데노신 모노포스페이트(c-디-AMP)의 2'3'-비스포스포로티오에이트 유사체의 Rp,Rp-이성질체이다. 이는 2'-5', 3'-5' 혼합 결합의 존재로 인해 c-디-AMP보다 STING에 대한 친화력

이 더 높다. 이 유사체는 숙주 세포 또는 전신 순환계에 존재하는 포스포디에스테라아제에 의한 분해로부터 보호하기 위해 2개의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 2'3'-c-di-AM(PS)2(Rp, Rp)는 관련 세포에서 유형 I IFN 및 CXCL10 생산을 강력하게 유도한다.

[1409] 인간 단핵구 유래 수지상 세포(ModDCs)와 자가 인간 T-세포를 저분자(smSTING) 작용제 및 재조합 IL-15와 함께 공동배양하여 생성된 분비 사이토카인을 확인하였다. 인간 단핵구 유래 수지상 세포(ModDC)는 ImmunoCult™ 수지상 세포 배양 키트(STEMCELL Technologies)를 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 6일 동안 음성으로 분리된 단핵구로부터 분화되었다. 분화 6일 후, ModDC를 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(EBV) 및 인플루엔자 바이러스(Flu)(인간 CD8에 대한 확장된 CEF 펩타이드 풀 T 세포, MABTECH)로부터의 32개의 MHC 부류 I-제한 바이러스 펩타이드 풀로 감작시킨 후, 자가 $CD8^+$ T 세포를 첨가하고, 2.5 nM의 재조합 인간 IL-15 및/또는 5 μg/ml의 smSTING으로 처리하였다. 수지상 세포를 바이러스 펩타이드로 감작시키면 수지상 세포가 바이러스 항원을 세포 표면에 제시하고 항원 특이적 T 세포를 자극하여 IFN-감마를 생성한다. ModDC/T 세포 공동배양 48시간 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 Meso Scale Discovery의 U-Plex 검정 플랫폼을 사용하여 세포 배양 상층액에서 분비된 IFN-γ 및 CXCL10의 수준을 측정하였다.

[1410] 아래 표에 요약된 결과는 항원 특이적 자극 시 인간 수지상 세포에 의한 CXCL10 분비에 대한 STING 활성화 및 인간 IL-15 활성의 부가적인 효과를 보여준다. 결과는 또한 STING 활성화와 인간 IL-15와 같은 사이토카인의 조합이 상승작용적으로 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포를 활성화하고 활성화된 $CD8^+$ T 세포에 의해 높은 수준의 IFN-γ 분비를 유도한다는 것을 보여준다.

처리	ModDCs 에 의해 분비된 CXCL10 (pg/ml)		$CD8^+$ T-세포에 의해 분비된 IFN-γ (pg/ml)	
	평균	SEM	평균	SEM
배지 (대조군)	21337	1015	685	40
smSTING (CDN)	78407	3869	5185	654
재조합 인간 IL-15	38671	1052	35311	29713
재조합 인간 IL-15 + smSTING (CDN)	100673	3229	268328	17505

SEM = 평균의 표준 오차

[1411]

[1412] **실시예 31**

[1413] **기능 획득 STING 변이체와 사이토카인의 조합은 항종양 면역 반응을 증강시킨다**

[1414] **인간 IL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합은 골수 세포에서 IFN-β의 분비를 유도하고 T 세포의 활성화를 유도한다**

[1415] 이 실시예는 인간 T-세포 및 수지상 세포의 활성화 및 기능에 대한 TME 및/또는 종양-체류 골수 세포에서 발현을 위해 전달되는 코딩된 인간 면역조절 페이로드 및 이의 조합의 영향을 실증한다. IFN-γ 및 IFN-β와 같은 수지상 세포 및 T-세포에 의해 분비되는 사이토카인의 수준은 방어적 항종양 면역력의 상관관계로서 측정되었다. 이 실시예는 본원에 예시된 면역자극성 박테리아 및/또는 본원에 기재된 다른 전달 비히클과 같은 종양 미세환경에 대한 다양한 면역조절 페이로드 조합의 전달이 항원-특이적 T-세포의 활성화 및 항종양 면역반응에 관여하는 핵심 인자인 IFN-β의 분비에 미치는 영향을 설명하고 실증한다(IFN-γ 분비에 의해 실증된 바와 같이). 이는 페이로드의 다양한 조합을 인코딩하는 플라스미드로 인간 단핵구 유래 수지상 세포(ModDC)를 형질주입시키고, 형질주입된 수지상 세포를 자가 인간 T-세포와 공동배양하고, 그 결과 분비되는 사이토카인을 확인함으로써 달성되었다. 면역조절 페이로드/단백질을 인코딩하는 플라스미드는 단일 페이로드를 인코딩하는 플라스미드와 페이로드 조합을 인코딩하는 플라스미드를 포함한다. 예를 들어 아래 표와 같이 인코딩된 페이로드는 huIL-15Rα-IL-15sc 단독, huSTING N154S/R284G tazCTT 단독 및 huIL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합을 포함하였다.

[1416] 인간 단핵구 유래 수지상 세포(ModDC)는 제조업체의 설명서에 따라 6일 동안 ImmunoCult™ 수지상 세포 배양 키트(STEMCELL Technologies)를 사용하여 음성으로 분리된 단핵구로부터 분화되었다. 분화 6일 후, Viromer® RED mRNA 및 플라스미드 DNA 형질주입 시약(Origene)을 사용하여 다양한 조사된 페이로드 및 이의 조합을 인코

딩하는 플라스미드로 ModDC를 형질주입하였다. 형질주입 4시간 후, ModDC를 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(EBV) 및 인플루엔자 바이러스(Flu)로부터의 32개의 MHC 부류 I-제한 바이러스 펩타이드 풀(인간 CD8 T 세포에 대한 확장된 CEF 펩타이드 풀, MABTECH) CEF 펩타이드 풀)로 감작시킨 후, 자가 $CD8^+$ T 세포를 세포 배양에 첨가하였다. 형질주입된 수지상 세포를 또한 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV-1) 역전사효소로부터의 무관한 펩타이드로 감작시키고, T-세포의 펩타이드 자극을 위한 음성 대조군으로서 사용하였다. HIV-1 음성 공여자의 $CD8^+$ T 세포를 사용하였다. ModDC/T 세포 공동배양 48시간 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 Meso Scale Discovery의 U-Plex 검정 플랫폼을 사용하여 세포 배양 상층액에서 T 세포에 의해 분비된 IFN-γ의 수준을 측정하였다.

[1417] 별도의 실험에서 ModDC를 Viromer® RED mRNA 및 플라스미드 DNA 형질주입 시약(Origene)을 사용하여 조사된 다양한 페이로드 및 이의 조합을 인코딩하는 플라스미드로 형질주입하였고 48시간 동안 배양하였다. 형질주입된 ModDC의 세포 배양 상층액을 형질주입 48시간 후 수합하고 분비된 IFN-β의 수준을 Meso Scale Discovery의 U-Plex 검정 플랫폼을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 측정하였다. 인간 수지상 세포에 의한 IFN-β의 분비에 미치는 인코딩된 페이로드의 영향을 분석하기 위해, 플라스미드 대조군(베타-액틴)에 대해 측정된 IFN-β의 농도를 다른 모든 군에서 차감하였고, 이는 인코딩된 페이로드의 활성에서만 발생하는 순 IFN-β 농도를 제공하였다.

[1418] 하기 표에 요약된 결과는 인간 수지상 세포에 의한 IFN-β의 분비에 미치는 huIL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT 활성의 조합의 상승 효과를 보여준다. 결과는 또한 항원 특이적 $CD8^+$ T-세포의 활성화 및 활성화된 T 세포에서 높은 수준의 분비된 IFN-γ에 미치는 적어도 부가적인 huIL-15Rα-IL-15sc와 huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합 효과를 보여준다.

ModDC 처리 (형질주입)	ModDCs 에 의해 분비된 순 IFN-β (pg/ml)	$CD8^+$ T-세포에 의해 분비된 IFN-γ (pg/ml)			
	평균	HIV 펩타이드		CEF 펩타이드	
		평균	SEM	평균	SEM
비형질주입 대조군	0	205	62	1661	169
베타-액틴 (플라스미드 대조군)	0	7639	2422	18252	619
huSTING N154S/R284G tazCTT	647	11746	825	31452	3280
huIL-15Rα-IL-15sc	226	10670	2397	39245	6439
huIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT	1281	16953	3595	42942	8083

SEM = 평균의 표준 오차

[1419]

[1420] 인코딩된 페이로드의 조합 효과가 암의 마우스 모델에서 관찰된 치유에 의해 입증된 바와 같이 상승작용 결과를 유발한다는 것은 다음 실시예에서 제시된다.

[1421] **실시예 32**

[1422] **muIL-15Rα-IL15sc, huSTING N154S/R284G tazCTT 및 뮤린 항i-CTLA-4 scFv-Fc의 조합은 삼중 음성 유방암의 고도로 불응성인 마우스 모델에서 우수한 항종양 효능을 실증한다**

[1423] 이전의 실시예(실시예 31)에서 관찰된 상승작용 효과가 이 실시예에서 추가로 제시되며, 이는 페이로드의 조합이 치유를 수행함에 있어 상승작용적으로 작용함을 보여준다. CPI(면역 체크포인트 저해제) 성불응 삼중 음성 유방암의 동소성, T 세포 배제 및 전이성 모델에서 생체내 효능에 대해 다양한 페이로드 조합을 평가하였다. 이 실험을 위해 6-8 주령의 암컷 BALB/c 마우스(군당 8 마리)에 EMT6 종양 세포(ATCC® CRL-2755™)(100 μL PBS 중 $1x10^6$ 세포)를 왼쪽 유선 지방 패드에 접종하였다. 7일된 유선 종양(부피 약 65 mm^3)이 있는 마우스에 다양한 페이로드를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주의 1 $x10^7$ CFU의 단일 용량을 정맥내(IV) 주사하거나, 항-PD-L1 항체 아테졸리주맙 100 μg을 매주 복강내(IP) 주사와 함께 투여하였다. YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주는 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT, 또는 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT + muAnti-CTLA-4 scFv-Fc, 또는 β-액틴을 인코딩하는

대조군 플라스미드를 PBS 대조군으로 처리한 것과 비교하였다.

[1424] 결과는 아래 표에 요약되어 있다. PBS 치료된 마우스의 종양은 고르게 성장하여 31일에 최대 종양 부피에 도달하였다. 대조군 β-액틴 플라스미드로 마우스를 처리한 결과 항종양 효능의 많은 증거가 실증되지 않았으며(5% 종양 성장 저해(TGI), 2/8 치유), IP 항-PD-L1 단독 치료(17.9% TGI, 1/8 치유)도 하지 않았다. muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 박테리아 균주로 IV 처리된 마우스는 단일요법 효능(59.8% TGI, 3/8 치유)을 실증하였으며, 이는 IP 항-PD-L1의 조합으로 향상되었다(77.3% TGI, 5/8 치유). muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT + muAnti-CTLA-4 scFv-Fc의 조합도 상당한 단일요법 효능(62.4% TGI, 4/8 치료)을 실증하였다.

[1425] 치료용 페이로드 조합은 내약성이 매우 우수하였으며 마우스는 연구 중에 체중이 감소하지 않았다. 이러한 데이터는 동소, T 세포 제외 및 체크포인트 저해제 불응 삼중 음성 유방암(TNBC)의 전이성 모델에서 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT 단독 또는 IP 투여된 항-PD-L1로 증강된 조합, 및 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT + muAnti-CTLA-4 scFv-Fc를 인코딩하는 IV 투여된 면역자극성 박테리아의 생체내 효능을 실증한다.

체크포인트 저해제 불응성 삼중 음성 유방암을 갖는 마우스의 종양 성장의 저해 및 치유율에 미치는, IP 항-PL-L1 의 첨가와 함께 그리고 없이 면역자극성 박테리아에 의해 전달된 인코딩된 페이로드의 조합의 효과

인코딩된 페이로드(들) 및 항-PD-L1 처리	종양 성장 저해 (TGI)	치유
베타-액틴 (플라스미드 대조군)	5 %	2/8
Intraperitoneal (IP) Anti-PD-L1 alone	17.9%	1/8
muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT	59.8%	3/8
muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT + IP Anti-PD-L1	77.3%	5/8
muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT + mu 항-CTLA-4 scFv-Fc	62.4%	4/8

[1426]

[1427] 고용량 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT 병용 요법의 효능을 평가하고 별개의 투여된 muIL-15Rα-IL15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT의 효능과 비교하기 위해 후속 연구를 수행하였다. muIL-15Rα-IL15sc, huSTING N154S/R284G tazCTT 또는 이의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주를 3e7 CFU 용량으로 정맥내(IV) 투여하여 7 일된 확립된 유선 종양을 PBS 대조군과 비교하였다. PBS 치료된 마우스의 종양은 고르게 성장하여 31일에 최대 종양 부피에 도달하였다. 아래 표에 표시된 바와 같이, muIL-15Rα-IL15sc를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 박테리아 균주로 처리된 마우스 또는 huSTING N154S/R284G tazCTT 단독은 각각 2/10이 치료되는 반면, muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합은 7/10이 치료되었다.

인코딩된 페이로드(들)	치유
PBS 대조군	0/10 치유
muIL-15Rα-IL15sc	2/10 치유
huSTING N154S/R284G tazCTT	2/10 치유
muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT	7/10 치유

[1428]

[1429] 이러한 데이터는 완전한 반응을 촉진하기 위한 사이토카인과 변형된 STING 단백질의 조합, 예컨대 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합의 상승작용 효과를 보여준다. 이러한 결과는 조합의 일반적인 항종양 치료 효능을 강조하는 매우 불응성인 유방암 모델에서 달성되었기 때문에 특히 중요한다. 이러한 결과는 IL-15Rα-IL15sc 융합 단백질과 같은 사이토카인과 STING 단백질, 특히 고도로 활성인 STING 단백질, 예를 들어 기능 획득의 항시적 활성 STING 변이체, 또는 NF-κB 신호 전달이 감소하도록 추가로 변형된 기능 획득의 항시적 활성 STING 변이체의 조합의 상승작용적 항종양 약효를 나타낸다.

[1430] muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT 병용 치료군(상기 기재됨)의 치유된 마우스는 동소 EMT6 종

양 재공격 연구 및 $CD8^+$ T-세포 의존적 방식에서 지속적인 항종양 면역력을 촉진하는 능력에 대해 평가되었다. 이 연구를 위해 20 마리의 치유된 마우스를 각각 10 마리씩 2개 군으로 나누고, 종양 재공격 전 제3일 및 제1일(각각 초기 종양 이식 후 제56일 및 제58일)에 각각의 마우스에 100 μg의 항-CD8β 항체($CD8\alpha^+$ 수지상 세포를 고갈시키지 않음) 또는 100 μg의 IgG 이소형 대조군을 IP 주사하였다. 마우스는 $CD8^+$ T-세포 고갈을 확인하기 위해 종양 재공격 전에 채혈되었고, 평균 순환 $CD8^+$ T-세포는 이소형 대조군의 경우 5.72%, 항-CD8β 항체의 경우 0.48%인 것으로 결정되었다. 그 후에, 마우스를 1e6 EMT6 종양 세포로 반대쪽 유선 지방 패드에서 동소적으로 재공격하고 미접촉 연령-일치 대조군 마우스(N=10)와 비교하였다. 미접촉 군의 마우스는 모두 30일까지 종양이 최대 종양 부피로 성장하였다. 항-CD8β 항체 고갈 군의 재공격된 마우스는 미접촉 마우스보다 훨씬 더 공격적으로 종양이 성장한 반면, IgG 아이소타입의 모든 10 마리의 재공격된 마우스는 종양을 성장시켰다. 항체 대조군(즉, $CD8^+$ T-세포 고갈이 없는 마우스)은 종양 재공격으로부터 보호되었다. 이러한 데이터는 예를 들어 muIL-15Rα-IL15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 포함하는, YS1646 *Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 박테리아 균주와 같은 면역자극성 박테리아에서 전달될 때 사이토카인과 변형된 기능 획득의 항시적 활성 STING 단백질 변이체의 조합의 중요하고 지속적인 항종양 효능을 실증한다. 치료 페이로드/단백질의 조합은 박테리아의 IV 투여 후 높은 치료율을 유도하고 마우스는 $CD8^+$ T 세포 의존 방식으로 종양 재공격으로부터 보호된다.

[1431] **실시예 33**

[1432] **DLL3xCD3 TCRA(T-세포 재지향 항체) 설계**

[1433] T-세포 재지향 항체(TCRA) 또는 T-세포 재지향 이중특이적 항체(TRBA)는 T-세포 수용체(TCR) 기능 독립적인 T-세포 기초 면역 요법으로, TCR 복합체의 구성요소인 분화 클러스터 3(CD3)의 엡실론(ε) 도메인은 하나의 결합 도메인에 의해 표적화되는 반면, 제2 결합 도메인은 종양 세포 표면 항원을 표적으로 한다. TCRA에는 예를 들어 펩타이드 링커에 의해 함께 연결된 2개의 단일 사슬 가변 단편(scFvs)의 융합 단백질인 조작된 항체 기초 면역 요법인 이중특이적 T 세포 연계자(상표 BiTEs®로 판매됨)가 포함된다.

[1434] TCRA는 종양 세포 표면 항원과 T 세포의 CD3에 동시에 결합하여 T 세포의 세포용해 활성을 표적 종양 세포에 선택적으로 지향시킴으로써 MHC 독립적 및 TCR 기능 독립적인 방식으로 T 세포와 종양 세포 사이의 세포용해성 시냅스 형성을 유도한다. 세포용해 시냅스의 형성 후, T 세포는 퍼포린 및 그랜자임(예를 들어 그랜자임 B)과 같은 세포독성 단백질을 방출하여 종양 세포의 세포자멸사를 유발한다. T 세포의 활성화는 사이토카인의 방출로 이어져 다른 면역 세포와 결합하고 더 광범위한 항종양 면역 반응을 유도한다. 이로 인해 염증이 없는(또는 차가운) 종양 환경이 염증이 있는(또는 뜨거운) 환경으로 전환되어 T 세포의 침투 및 증식과 종양 세포의 사멸을 초래한다. 원래 BiTE® 항체는 반감기가 짧다; 후기 세대 BiTE® 항체는 Fc에 대한 융합으로 인해 연장된 반감기를 갖는다(예를 들어, Hipp et al. (2020) Clin. Cancer Res. 26:5258-5268; 및 Strohl, W. R. 및 Naso, M. (2019) 항체 8:41).

[1435] 델타 유사 리간드 3(DLL3)은 배아 발달 동안 노치 신호 전달에서 역할을 하는 저해성 노치 경로 리간드이다. DLL3은 정상 조직에서 배아 발달 동안 세포내에서 발현되며 태아 뇌에서 가장 많이 발현되지만 성인 정상 조직에서는 존재하지 않는다. DLL3은 소세포 폐암(SCLC) 및 다른 고등급 신경내분비 종양과 같은 특정 종양에서 과발현되며, 세포 내에서 발현되는 대신 세포 표면으로 탈출하여 항체 기초 치료제로 표적화할 수 있다(예를 들어, Hipp et al.(2020) Clin. Cancer Res. 26:5258-5268 참조). DLL3은 또한 흑색종, 다형 교모세포종, 소세포 방광암, 전이성 거세 저항성 전립선암 및 신경내분비 폐 종양을 포함하는 신경내분비 기원의 다른 종양 유형에서 발현된다(예를 들어, Owen et al. (2019) Journal of Hematology & 종양학 12:61); 따라서 TCRA 기초 요법의 유용한 표적이다.

[1436] DLL3xCD3 TCRA(각각 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열에 대한 SEQ ID NO: 410 및 411 참조; 또한 Hipp et al. (2020) Clin. Cancer Res. 26:5258-5268 참조)를 항-DLL3 클론 hSC16.56 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역(각각 V_L 및 V_H)(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO 2013/126746 참조), 및 항-CD3ε 클론 145-2C11 항체(BioLegend에서 입수 가능)의 경쇄 및 중쇄 가변 영역으로부터 제조하였다.

[1437] 작제물은 TCRA의 분비를 위한 pSecTag2 벡터(SEQ ID NO: 411의 잔기 1-21에 해당; 예를 들어, addgene.org 참조)로부터의 마우스 IgGκ 리더/신호 서열을 포함하였다. 항-DLL3 V_H 도메인(SEQ ID NO: 411의 잔기 22-139에

상응함)은 15개 아미노산 길이 $(Gly_4Ser)_3$ 링커(SEQ ID NO: 411의 잔기 140-154에 상응함)를 통해 항-DLL3 V_L 도메인(SEQ ID NO: 411의 잔기 155-261에 상응함)에 연결되어, 항-DLL3 scFv를 형성하였다. 5개 아미노산 길이의 Gly_4Ser 링커(SEQ ID NO: 411의 잔기 262-266에 상응함)를 항-DLL3 scFv와 항-CD3 scFv 사이에 삽입하였다. 항-CD3 scFv는 제2 $(Gly_4Ser)_3$ 링커(SEQ ID NO: 411의 잔기 383-397에 상응함)를 통해 항-CD3 V_L 도메인(SEQ ID NO: 411의 잔기 398-504에 상응함)에 연결된 항-CD3 V_H 도메인(SEQ ID NO: 411의 잔기 267-382에 상응함)을 함유한다. 이 작제물은 항-DLL3 및 항-CD3 항체의 중쇄(H) 및 경쇄(L) 가변 도메인이 분자에 나타나는 순서를 나타내기 위해 DLL3HL x CD3HL로 표기되었다. 검출을 위해 플래그 태그(DYKDDDDK; SEQ ID NO: 412)를 이 작제물의 C-말단 단부에 첨가할 수 있다(플래그 태그-표지화된 DLL3xCD3 TCRA의 경우 DLL3HL x CD3HL-FLAG TCRA로 표기됨, SEQ ID NO: 413 참조).

[1438] DLL3LH x CD3HL TCRA(각각 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열에 대해 SEQ ID NO: 414 및 415 참조)로 표기된 또 다른 DLL3xCD3 TCRA 작제물을 DLL3HL x CD3HL 작제물과 유사하게 작제하였으나, 표기가 의미하는 바와 같이 항-DLL3 scFv는 항-DLL3 V_H 도메인에 대해 N-말단에 배치된 항-DLL3 V_L 도메인을 함유한다. TCRA의 항-CD3 scFv 부분, GS 링커 및 분비를 위한 리더 서열은 모두 위에서 DLL3HL x CD3HL 구조에 대해 설명한 것과 같다. DLL3LH x CD3HL-FLAG TCRA로 표기된 DLL3LH x CD3HL TCRA 작제물의 플래그 태그-표지된 버전(각각 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열에 대해 SEQ ID NO: 416 및 417 참조)을 또한 작제하였다.

[1439] **실시예 34**

[1440] **표적 결합, 접합 및 세포독성에 대한 T-세포 재지향 항체(TCRA)의 평가**

[1441] CD19 및 CD3와 같은 CD(분화 클러스터) 항원에 대한 항체는 항암 표적이다. 특정 CD 항원의 발현은 특정 계통 림프조혈 세포로 제한된다. 림프구 특이 항원에 대한 항체가 치료제로 개발되었다. CD19는 B 세포에서 발현되고, 떨어져 나가지 않고, 모든 림프종 세포에서 균일하게 발현되며, 줄기세포에는 없기 때문에 유용한 표적이다. CD3는 CD3ε, CD3δ 및 CD3γ의 세 가지 사슬을 포함하는 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 일부로 T 세포에서 발현된다. 고정된 항-CD3 항체에 의한 것과 같은 T-세포 상의 CD3 클러스터링은 T-세포 수용체(TCR)의 결합과 유사한 T-세포 활성화를 초래하지만, 이의 클론의 전형적인 특이성과는 독립적이다. 각각의 CD19 및 CD3 항원에 대한 이중특이적 항체는 MHC-독립적 방식으로 그리고 T-세포 사전-자극 또는 공동자극 없이 CD-19 양성 세포(예를 들어 림프종 세포)에 대한 T-세포 세포독성을 재표적화한다. 따라서, 이러한 분자는 지속적인 T-세포 매개 항종양 면역력을 유도하고 항암 치료제로서 특히 유용하다.

[1442] 항-CD19 및 항-CD3 TCRA의 FLAG-태그 변이체 서열, MT103(SEQ ID NO: 418; 또한 만료된 미국 특허 번호 7,112,324 참조)을 pATI1.75(상기 기재됨)로 표기된 벡터 내로 클로닝하였다. MT103 TCRA 작제물은 리더 서열(SEQ ID NO: 418의 잔기 1-19에 상응함), 뒤이어 플래그 태그(DYKDDDDK; SEQ ID NO: 418의 잔기 20-27에 상응함) 및 항-CD3 scFv에 연결된 항-CD19 scFv를 함유한다. 항-CD19 scFv는 $(GGGGS)_3$ 링커(SEQ ID NO: 418의 잔기 139-153에 상응함)를 통해 항-CD19 V_H 도메인(SEQ ID NO: 418의 잔기 154-277에 상응함)에 연결된 항-CD19 V_L 도메인(SEQ ID NO: 418의 잔기 28-138에 상응함)을 포함한다. 항-CD19 scFv는 GGGGS 링커(SEQ ID NO: 418의 잔기 278-282에 상응함)를 통해 항-CD3 scFv에 연결된다. 항-CD3 scFV는 펩타이드 링커(VEGGSGGSGGSGGSGGVD; SEQ ID NO: 418의 잔기 402-419에 상응함)를 통해 항-CD3 V_L 도메인(SEQ ID NO: 418의 잔기 420-525에 상응함)에 연결된 항-CD3 V_H 도메인(SEQ ID NO: 418의 잔기 283-401에 상응함)을 함유한다. 작제물은 또한 His 태그(His6; SEQ ID NO: 418의 잔기 526-531에 상응함)를 포함한다.

[1443] HEK293T STING Null Cells(293-Dual™ Null Cells; InvivoGen)를 폴리-L-리신으로 코팅된 6-웰 플레이트에 웰당 1.5e6개 세포로 시딩하고 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 80% 합류도를 달성할 때까지 밤새 배양하였다. 이튿날, 3000 ng의 MT103 플라스미드 DNA를 무혈청 배지에 희석시키고 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 첨가하고 형질주입되지 않은 웰을 음성 대조군(2벌 중복)으로 사용하면서 세포에 형질주입하였다. 각 시료의 세포 배양 상층액을 형질주입후 48시간째에 수집하였다. 상층액을 깔끔하게 유지시키거나 Amicon® Ultra 4 mL 원심분리 필터(Millipore Sigma)를 사용하여 농축시켰다.

[1444] 발현된 MT103(CD19xCD3) TCRA의 기능성을 확인하기 위해, Raji 세포(ATCC에서 구입) 및 Jurkat-Lucia™ NFAT 세포(InvivoGen)를 사용한 유세포분석 실험을 수행하였다. Raji 세포는 CD19를 고도로 발현하는 인간 림프구 세포이고, Jurkat 세포는 CD3를 발현하는 인간 T-림프구이다. 200,000개의 Raji 세포 및 200,000개의 Jurkat 세

포를 각각 PBS + 2% FBS에서 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 세척하였다. 그 후에, 발현된 TCRA를 포함하는 순수 또는 농축 세포 배양 상층액 50 μL를 세포에 첨가하고 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃로 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를 PBS + 2% FBS에 재현탁하고 APC 표지 항-플래그 태그 항체(BioLegend)로 염색하였다. APC 표지된 항-플래그 태그 항체는 Raji 세포의 CD19 및/또는 Jurkat 세포의 CD3에 결합하는 모든 MT103 TCRA(플래그 태그 포함)를 표지하기 위해 첨가된다. 30분 인큐베이션 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 2회 세척한 다음, DAPI(사멸/생존 염색)가 있는 PBS + 2% FBS에 재현탁하였다. Raji 세포 상의 CD19에 대한 CD19xCD3 MT103 TCRA의 임의의 결합 및/또는 Jurkat 세포 상의 CD3에 대한 TCRA의 결합을 검출하기 위해 유세포분석을 수행하였다. 각 시료에 대해 50,000개의 이벤트가 수집되었다. ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 유세포분석 데이터를 수집하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1445] 아래 표에 나타난 바와 같이, 순수한 또는 농축된 MT103 함유 세포 배양 상층액과 함께 인큐베이션된 Raji 및 Jurkat 세포에서 검출된 APC의 중간 형광 강도(MFI)는 형질주입되지 않은 세포 배양 상층액과 함께 인큐베이션된 세포에서 검출된 MFI보다 훨씬 높았으며, 이는 MT103 TCRA가 CD19- 및 CD3-발현 세포에 결합함을 나타낸다.

MT103 (CD19xCD3) TCRA 로 처리된 세포에 대한 유세포분석 데이터

시료	APC + 세포의 MFI
항-FLAG-APC 항체 단독으로 염색된 Raji 세포	1021
비형질주입 상층액으로 염색된 Raji 세포	1064
순수한 MT103-함유 상층액으로 염색된 Raji 세포	6334
농축된 MT103-함유 상층액으로 염색된 Raji 세포	14544
항-FLAG-APC 항체 단독으로 염색된 Jurkat 세포	1035
비형질주입 상층액으로 염색된 Jurkat 세포	996
순수한 MT103-함유 상층액으로 염색된 Jurkat 세포	4062
농축된 MT103-함유 상층액으로 염색된 Jurkat 세포	12538

[1446]

[1447] 추가로, CD19xCD3 MT103 TCRA 작제물은 Raji 및 Jurkat-Lucia™ NFAT 세포의 공동배양에서 시험되었다. Jurkat-Lucia™ NFAT 리포터 세포주는 NFAT 유도성 Lucia™ 구조를 포함하고 있으며, 여기서 Lucia™ 루시퍼라제의 발현은 NFAT(활성화된 T 세포의 핵 인자; 전사 인자) 컨센서스(consensus) 전사 반응 요소의 6개 복사체에 융합된 ISG54 최소 프로모터에 의해 구동된다. 따라서 Jurkat-Lucia™ NFAT 세포는 Lucia™ 루시퍼라제 활성을 모니터링하여 NFAT 활성화를 연구하는 데 사용할 수 있다; Lucia™ 루시퍼라제 검출 시약인 QUANTI-Luc™을 사용하여 세포 배양 상층액에서 Lucia™ 루시퍼라제 수준을 측정할 수 있다. 이 실험에서 CD19를 발현하는 Raji 세포와 CD3를 발현하는 Jurkat 세포 모두에 대한 MT103 TCRA의 결합은 Jurkat 세포(T 세포)를 활성화시켜, Jurkat 세포의 활성화 수준을 결정하기 위해 측정될 수 있다.

[1448] Jurkat 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에 웰당 5e4 세포로 시딩하였다. Raji 세포는 각각 1:2 또는 1:1의 이펙터:표적(Jurkat:Raji) 비율에 대해 웰당 1e5 또는 5e4 세포로 시딩되었다. 공동배양된 세포는 순수한 또는 농축된 MT103 함유 세포 배양 상층액과 함께 또는 없이 배양되었다. 순수한 또는 농축된 상층액의 10배, 100배 및 1000배 희석액을 준비하고 공동배양물과 함께 인큐베이션하였다. 유도된 NFAT 리포터로 인한 발광(즉, 분비된 Lucia™ 루시퍼라제 활성)은 공동배양물에 TCRA를 첨가한 후 6시간 및 24시간에 검출되었다.

[1449] 결과는 아래 표에 요약되어 있으며, 이는 MT103 TCRA의 활성이 MT103을 첨가하지 않은 대조군 시료 및 Raji(표적) 세포와의 공동배양이 없는 대조군 시료와 비교하여 Jurkat-Lucia™ NFAT 리포터 세포주로부터 증가된 발광을 초래함을 보여준다. NFAT-inducible Lucia™ 리포터 구조에서 발생하는 발광은 용량 의존 방식으로 MT103의 희석에 따라 감소한다. 더 긴 배양 시간(24시간 대 6시간)은 예상대로 증가된 발광을 초래하며, 이는 증가된 T 세포 활성화를 나타낸다.

상이한 농도의 MT103, 및 상이한 이펙터:표적 비율로 처리된 Jurkat 및 Raji 세포의 공동배양물로부터의 NFAT-Lucia™ 리포터 값

1:2 이펙터:표적 (Jurkat:Raji) 비율, 6 시간 인큐베이션						
	MT103 순수		MT103 농축		MT103 없음	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
희석 없음	12110.5	837.9	3445.0	717.0	44.5	10.6
10 배 희석	4285.0	209.3	5880.0	581.2	70.0	15.6
100 배 희석	2253.5	507.0	3415.5	161.9	48.0	36.8
1000 배 희석	270.0	110.3	954.5	10.6	37.0	0.0
Raji(표적) 세포 없음	63.0	5.7	55.5	16.3	37.0	21.2
1:1 이펙터:표적 (Jurkat:Raji) 비율, 6 시간 인큐베이션						
	MT103 순수		MT103 농축		MT103 없음	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
희석 없음	4337.0	219.2	2057.5	20.5	26.0	15.6
10 배 희석	2113.0	36.8	2767.5	41.7	78.0	15.6
100 배 희석	965.5	26.2	1620.5	241.1	48.0	15.6
1000 배 희석	188.5	5.0	566.0	46.7	41.0	15.6
Raji(표적) 세포 없음	63.0	5.7	55.5	16.3	37.0	21.2
1:2 이펙터:표적 (Jurkat:Raji) 비율, 24 시간 인큐베이션						
	MT103 순수		MT103 농축		MT103 없음	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
희석 없음	47159.5	1038.7	11274.0	408.7	114.5	57.3
10 배 희석	12843.5	1047.2	13995.5	225.6	159.5	26.2
100 배 희석	5114.0	21.2	8767.5	204.4	189.0	36.8
1000 배 희석	562.5	94.0	1979.5	57.3	148.0	62.3
Raji(표적) 세포 없음	159.0	67.9	181.5	5.0	77.5	4.95
1:1 이펙터:표적 (Jurkat:Raji) 비율, 24 시간 인큐베이션						
	MT103 순수		MT103 농축		MT103 없음	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
희석 없음	18614.0	1540.1	6017.0	31.3	122.0	15.6

[1450]

10 배 희석	7083.0	209.3	7479.0	717.0	181.5	26.2
100 배 희석	2908.5	41.7	5210.5	72.9	174.0	15.6
1000 배 희석	444.0	9.9	1213.5	94.0	163.0	52.3
Raji(표적) 세포 없음	159.0	67.9	181.5	5.0	77.5	4.95

SD = 표준 편차

[1451]

[1452] 인간 $CD8^+$ T 세포와 Raji 세포(버킷 림프종 세포, 즉 종양 세포)의 공동배양을 사용하여 세포독성 분석을 수행하였다. EasySep™ 인간 T-세포 단리 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 인간 $CD8^+$ T-세포를 분리한 다음 RPMI + 2% FBS에 재현탁하고 96-웰 플레이트에 시딩하였다. $CD8^+$ T 세포를 웰당 1e5 세포 또는 웰당 5e4 세포로

시딩하고, Raji 세포를 웰당 10,000개 세포로 시딩하여 이펙터:타겟(T 세포:Raji 세포) 비율을 10:1 또는 5:1로 하였다. 농축 또는 순수 MT103 함유 상층액을 RPMI + 2% FBS에서 10배, 100배 및 1000배 희석한 다음 각 상층액 시료 50 μL를 공동배양에 첨가하였다. 5시간의 공동배양 인큐베이션 후 상층액을 수집하고 제조업체의 설명서에 따라 CytoTox 96® 비방사성 세포독성 분석(Promega)을 사용하여 분석하였다. % 세포독성은 제조업체의 설명서에 따라 계산되었다.

[1453] 아래 표에 나타난 바와 같이, MT103의 양이 많을수록(농도) % 세포독성이 높아진다. % 세포독성은 MT103 함유 상층액이 용량 의존적으로 10배, 100배, 1000배 희석됨에 따라 감소한다.

$CD8^+$ T-세포 및 다양한 농도의 MT103 과의 공동배양물에서 Raji 세포의 용해(세포독성 %)

5:1 이펙터:표적 ($CD8^+$ T-세포:Raji 세포) 비율, 5 시간 인큐베이션						
	MT103 순수		MT103 농축		MT103 없음	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
희석 없음	NA	NA	NA	NA	28.2	1.63
10 배 희석	59.0	9.6	78.8	7.5	NA	NA
100 배 희석	36.0	5.1	54.5	6.4	NA	NA
1000 배 희석	3.7	3.6	32.8	2.4	NA	NA
10:1 이펙터:표적 ($CD8^+$ T-세포:Raji 세포) 비율, 5 시간 인큐베이션						
	MT103 순수		MT103 농축		MT103 없음	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
희석 없음	NA	NA	NA	NA	18.0	1.0
10 배 희석	51.9	5.4	77.6	1.6	NA	NA
100 배 희석	38.5	2.6	51.9	2.2	NA	NA
1000 배 희석	NA	NA	16.8	2.2	NA	NA

[1454] SD = 표준 편차; NA = 적용 불가능함

[1455] **실시예 35**

[1456] **발현 플라스미드에서 인코딩된 종양-연관 항원의 면역자극성 박테리아 전달**

[1457] 이 실시예는 면역자극성 박테리아에 의해 전달될 수 있는 예시적인 종양-연관 항원(TAA)을 기재한다. 조작된 면역자극성 박테리아로 치료할 때 종양-연관 항원을 대식세포 및 수지상 세포와 같은 종양-체류 골수 세포로 전달하면 항종양 반응을 일으키는 항원 특이적 T 세포의 프라이밍 및 활성화가 가능하다.

[1458] 면역자극성 박테리아의 플라스미드에 의해 코딩되는 종양-연관 항원 중에는 종양태아 또는 암바이러스로 분류되는 항원이 있다. 일부 항원은 과발현되거나 종양에 축적된다. 항원에는 혈통 제한, 돌연변이 또는 번역 후 변경된 항원이 포함된다. 이러한 각각의 범주에서 종양-연관 항원의 비제한적 예 및 관련 암 유형(적응증)이 하기 표에 제시되어 있다.

종양-연관 항원(TAA)의 범주	TAA 의 명칭 / 과 명칭	암 조직학
종양태아	암배아 항원 (CEA)	결장직장 암종
	미성숙 라미닌 수용체	신세포 암종 (RCC)
	종양-연관 당단백질 72 (TAG-72)	전립선 암종
종양바이러스	HPV E6, HPV E7	자궁경부 암종
과발현/축적	BING-4	흑색종
	표피 성장 인자 수용체 (EGFR)	결장직장 암종(CRC)
	윌름 종양 단백질	다발성
	칼슘-활성화된 클로라이드 채널 2	폐 암종
	사이클린-B1	다발성
	9D7	RCC
	상피 세포 접착 분자 (EpCAM)	유방 암종
	에프린 유형-A 수용체 3 (EphA3)	다발성
	인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2/Neu)	다발성
	텔로머라제	다발성
	중피종	도관 췌장 암종
	위암–연관 단백질 티로신 포스파타제 1 (SAP-1)	결장직장 암종(CRC)
	서바이빈	다발성
암-고환	BAGE (B 흑색종 항원) 과	다발성
	CAGE 과	다발성
	GAGE 과	다발성
	MAGE (흑색종 항원) 과	다발성
	SAGE (육종 항원) 과	다발성
	PAGE 과	다발성
	XAGE 과	다발성
	CT9, CT10	다발성

[1459]

	뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 (NY-ESO-1), LAGE-1	다발성
	흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원 (PRAME)	다발성
	활액막 육종/X 절단점 2 (SSX-2)	흑색종, 다발성
계열-제약	T-세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 1 (Melan-A/MART-1)	흑색종
	gp100/Pmel17	흑색종
	티로시나제	흑색종
	티로시나제 관련 단백질 (TRP)-1, TRP-2	흑색종
	P.poly 펩타이드	흑색종
	멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R)	흑색종
	전립선-특이적 항원 (PSA)	전립선 암종
돌연변이	β-카테닌	흑색종, 전립선 암종, 간세포 암종 (HCC)
	BRCA1, BRCA2	유방 암종, 난소 암종
	사이클린 의존적 키나제 4 (CDK4)	다발성
	만성 골수원성 백혈병 종양 항원 66 (CML66)	만성 골수원성 백혈병 (CML)
	피브로넥틴	다발성
	T-세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 2 (MART-2)	흑색종
	p53	다발성
	Ras	다발성
	TGF-β 수용체 유형 II (TGF-βRII)	결장직장 암종
번역후 변경	뮤신 1, 세포 표면 연관 (MUC1)	도관 암종, RCC
이디오타입	면역글로불린(Ig), T-세포 수용체 (TCR)	B-세포 백혈병, T-세포 백혈병, 림프종, 골수종

[1460]

[1461] **실시예 36**

[1462] **진핵 세포에서 박테리아-유래 RNA 전달로부터의 이소성 단백질 합성**

[1463] 상세한 설명에 기재된 바와 같이, 플라스미드 DNA 전달에 더하여, 면역자극성 박테리아를 사용하여 mRNA와 같은 박테리아 유래 RNA를 감염된 골수 세포로 직접 전달할 수 있다. RNA의 직접 전달은 숙주 세포 핵으로의 플라스미드 DNA의 적절한 트래피킹뿐만 아니라 진핵 전사 및 번역 머시너리에 의존하는 플라스미드 DNA 전달의 필요성을 제거한다. mRNA와 같은 RNA의 직접 전달은 숙주 트래피킹 및 전사 과정을 우회하여 단백질 생산을 위한 진핵 번역 머시너리에만 의존한다. 박테리아 유래 RNA의 전달은 박테리아에서 외래 단백질의 문제 번역을 방지하기 위해 박테리아 번역에서 박테리아 전사의 분리를 필요로 한다. 많은 진핵 단백질은 적절한 접힘 조건, 소포체, 이황화 결합을 포함한 적절한 번역 후 변형, 접힘을 위한 숙주 샤페론을 필요로 하는 복잡한 단백질이다. 박테리아에서 외래 단백질의 과발현은 균주 적합성을 감소시키고 배가 시간을 감소시키며 균주 안정성을 감소시킬 수 있다.

[1464] 면역자극성 박테리아로 치료하는 동안 mRNA 전달이 일어난다는 것을 입증하기 위해 일련의 플라스미드를 개입 뇌척수심근염(encephalo-myocarditis) 리보솜 진입 부위(EMCV IRES)의 존재 및 부재 하에 mu4-1BBL_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA의 발현을 유도하는 진핵생물 또는 박테리아 프로모터로 조작하였다. 박테리아에서 기능하지 않는 EMCV IRES는 원핵생물의 번역을 감소시키고 진핵생물의 번역을 향상시킨다. 박테리아에서 기능하는, 바이러스의 *디시스트로비리대*(*Dicistroviridae*) 과로부터의 알려진 진핵 IRES는 단 하나뿐이다(예를 들어, Colussi et al. (2015) Nature 519(7541):110-113 참조). 따라서 일반적으로 IRES 요소는 박테리아에서 기능하지 않는다. 프로모터-IRES(또는 프로모터-코작) 조합도 mCherry 형광 리포터 유전자(Takara Bio)에 클로닝하여 조절 서열의 박테리아 발현을 형광으로 신속하게 평가할 수 있다.

[1465] 형광 mCherry 단백질의 박테리아 발현을 측정하기 위해 박테리아 균주의 밤새 배양물을 PBS에서 세척하고 OD_{600}에서 0.1로 정규화하였다. 모든 박테리아 배양에 대해 NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 유세포분석기로 mCherry 발현 백분율을 분석하였다. 감염된 1차 인간 M2 대식세포와 HEK-Blue™ IL-12 리포터 세포(InvivoGen)의 공동배양 시스템을 사용하여 박토펙션 후 이소성 유전자 발현 수준을 측정하였다. HEK-Blue™ IL-12 세포는 IL-12 수용체뿐만 아니라 IL-12 신호 경로의 유전자 및 STAT4 유도성 SEAP 리포터 유전자를 발현하는 HEK293 세포이다. HEK-Blue™ IL-12 세포 표면에 있는 IL-12 수용체에 대한 IL-12의 결합은 STAT-4의 활성화로 이어지는 신호 캐스케이드를 촉발하고 이후 SEAP를 생성한다. HEK-Blue™ IL-12 세포의 상층액에서 SEAP 검출은 QUANTI-Blue™ 용액을 사용하여 쉽게 평가할 수 있다. 따라서, 이러한 리포터 세포는 IL-12의 발현을 측정하는 데 사용된다.

[1466] 일차 인간 단핵구는 100 ng/ml M-CSF를 포함하는 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지에서 3일 동안 분화한 다음, 200 ng/ml M-CSF, 20 ng/ml IL-4, 및 20 ng/ml IL-10을 함유하는 추가 배지로 4일 더 보충하였다. 그 후에, 세포를 정지기 면역자극성 박테리아로 감염시키고 4XYT 배지에서 37℃, MOI 50에서 밤새 성장시켰다. 세포에 박테리아를 접종하고 500 rcf에서 5분 동안 원심분리한 다음 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후에, 세포를 DPBS로 두 번 세척한 다음 100 μg/ml 겐타마이신을 함유한 신선한 ImmunoCult™-SF 대식세포 배지에서 인큐베이션하여 세포외 박테리아를 제거하였다. 감염된 대식세포를 HEK-Blue™ IL-12 리포터 세포와 2.5:1의 비율로 공동배양하였다(대식세포 대 HEK-Blue™ 세포). 감염 후 48시간째에 세포 배양 상층액 5 μl를 QUANTI-Blue™ 용액(SEAP를 검출함) 180 μl와 함께 배양하고 37℃에서 인큐베이션하여 발색되도록 하였다. 따라서 감염된 대식세포에 의한 IL-12의 발현은 세포 표면의 IL-12 수용체에 IL-12가 결합할 때 HEK-Blue™ 세포에 의해 생성되는 상층액의 SEAP 수준을 측정하여 평가된다.

[1467] 아래 표에 요약된 결과는 감염된 대조군(EF-1α-NanoLuc® 루시페라아제)이 일차 인간 M2 대식세포에서 IL-12 발현의 기준선 수준을 자극하고 박테리아에서 mCherry 발현으로부터 매우 적은 형광을 나타냄을 보여준다. CMV-코작 쌍은 박토펙션 후 더 높은 수준의 IL-12 발현과 더 높은 수준의 mCherry 단백질 발현을 유도한다. 이는 박테리아의 CMV 프로모터에서 발생하는 낮은 수준의 박테리아 "누출" 때문이다. 시험된 2개의 박테리아 프로모터인 rpsM 및 MTL은 코작 서열과 쌍을 이룰 때 CMV 프로모터보다 낮지만 EF-1α-나노루시퍼라제 대조군보다 높은 1차 인간 M2 대식세포에서 IL-12 발현 수준을 유도하고, 두 프로모터 모두 박테리아에서 높은 수준의 mCherry 단백질 발현을 유도한다. 이러한 결과는 박테리아 프로모터가 진핵 숙주에서 기능하지 않기 때문에 mRNA 전달이 발생하고 있음을 나타낸다. IL-12 리포터 단백질의 발현 수준은 박테리아 프로모터가 IRES와 결합될 때 더 높으며, 이는 전달된 mRNA로부터의 단백질 발현이 진핵 IRES의 존재에 의해 번역 수준에서 향상됨을 나타낸다. IRES의 존재는 또한 박테리아에서 mCherry 발현의 양을 감소시키며, 이는 RNA의 2차 구조가 박테리아 프로모터와 결합된 경우에도 발현을 저해함을 나타낸다.

[1468] 작제물에 IRES를 포함하면 프로모터의 다운스트림 및 개시 코돈 앞에 박테리아의 번역이 저해되거나 방지되어 박테리아가 mRNA의 전달제 역할을 한다. 본 출원에서 제공되는 면역자극성 박테리아와 같은 박테리아는 조직-체류 대식세포(예를 들어, 종양-체류 골수 세포)와 같은 숙주 세포를 감염시키고 인코딩된 RNA를 숙주 세포로 전달하도록 설계된다. 박테리아는 *asd*⁻와 같이 영양요구성이어서 시험관 내에서 성장할 수 있지만 인간과 같은 숙주에 도입되면 성장하지 않는다. 박테리아는 내용물을 숙주 세포에 전달하고 번식하지 않는다.

프로모터 유형	IRES	프로모터-IRES 또는 프로모터-코작	흡광도 (650 nm) IL-12-SEAP	IL-12 범위	형광 (박테리아에서의 mCherry 발현)
진핵	없음	EF-1α-코작-NanoLuc®	0.4585	0.1042	0.00403
진핵	없음	CMV-코작	0.60545	0.1315	9.43
원핵	없음	rpsM-코작	0.47785	0.0233	21.1
원핵	있음	rpsM-IRES	0.5802	0.106	0.82
원핵	없음	MTL-코작	0.55295	0.0757	85.8
원핵	있음	MTL-IRES	0.75665	0.0801	4.19

[1469]

[1470] 박테리아는 인코딩된 RNA를 생성하기 위해 시험관 내에서 배양되며, IRES 또는 박테리아 번역을 방지하거나 저해하는 다른 그러한 조절 서열의 존재로 인해 박테리아에 의한 RNA와 같은 RNA의 생성을 초래한다. 박테리아에 의한 인간 대식세포와 같은 진핵 숙주 세포의 감염 시, RNA는 번역되어, 예를 들어 항원과 같은 인코딩된 생성물을 생성한다.

[1471] 박테리아는 RNA 전달을 위한 유리한 용기인데, 박테리아는 대량으로 쉽게 배양된 다음 저장 및/또는 제형화되거나 분말, 정제 또는 주사용 액체로 제공될 수 있기 때문이다. 이는 정맥내 및 코 또는 폐를 통한 점막을 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 이는 매우 안정적이며 많은 양의 RNA를 안정적으로 제공할 것이다.

[1472] 본원에서 제공되는 면역자극성 박테리아는 예를 들어 백신으로 사용되거나 바이러스 항원 및/또는 다른 단백질을 인코딩하여 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(COVID-19를 유발하는 SARS-CoV-2)는 전장 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(예를 들어 SEQ ID NO: 438 참조)을 인코딩하거나 전장 수용체 결합 도메인(SARS-CoV-2 스파이크 단백질(SEQ ID NO: 440 참조)의 RBD) 또는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(SEQ ID NO: 440 참조), 또는 면역 반응을 유도하거나 유발하기 위해 그리고/또는 SARS-CoV-2에 대해 대상체를 면역화 또는 백신화하거나 보호하기 위해 충분한 스파이크 단백질 RBD(예를 들어 SEQ ID NO: 441 참조)의 일부를 인코딩할 수 있다. 면역자극성 박테리아는 또한, 스파이크 단백질 또는 이의 일부의 발현을 증가시키거나 증강시키고/시키거나 ACE2 수용체에의 스파이크 단백질 또는 RBD 또는 이의 일부의 결합을 증가시키거나 증강시키는 RBD 또는 이의 부분와 같은 스파이크 단백질 또는 이의 일부에서의 돌연변이와 함께 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 돌연변이체를 인코딩하는 mRNA를 전달할 수 있다.

[1473] 스파이크 단백질 또는 스파이크 단백질 RBD 돌연변이체는 스파이크 단백질 또는 이의 일부의 돌연변이 V367F, D614G, G476S, V483A, H49Y, N501Y, N501F, N501W, N501V, F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P, V417K, G502D, N501T, Q498Y, W436R 및 D364Y, 및 잔기 N439/R426, L452/R426, T470/N457, E484/P470, Q498/Y484 및 N501/T487에 상응하는 잔기에 돌연변이를 포함하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 본원에 기재되고 당업계에 알려진 임의의 것을 포함한다. 면역자극성 박테리아는 예를 들어 U.S. 특허 번호 10,973,908 및 10,702,600. 면역자극성 박테리아는 또한 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이 Pfizer-BioNTech COVID-19 백신 및 Moderna COVID-19 백신에서 mRNA를 전달하기 위해 백신/mRNA 전달용으로 사용될 수 있다. 항원으로 사용하기 위한 SARS-CoV-2 단백질은 예를 들어 스파이크 단백질, 뉴클레오캡시드 및 M 단백질 및 이의 항원 부분을 포함한다. 면역자극성 박테리아는 인플루엔자 유형 A 균주(H1 및 H3) 및 인플루엔자 유형 B 균주와 같은 다양한 균주로부터 HA 단백질에 대한 항체를 이끌어내는 독감 백신과 같은 범용 독감 항원을 전달하는 데 사용될 수 있다. 다른 조합에는 FlusMos-v1과 같은 HA 에피톱의 반복 패턴이 포함된다. 예를 들어, 키메라 헤마글루티닌 기초 범용 인플루엔자 백신을 제공하는 Nachbaguer et al. (2021) Nature Medicine 27:106-114를 참조한다.

[1474] **실시예 37**

[1475] **인간 IL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT를 포함하는 면역조절 균주는 자가 뮤린 종양을 콜로니화한다**

[1476] 이전에 약독화 *살모넬라* 균주 YS1646이 4T1 뮤린 유방 이식 모델(평균 종양 크기 400 mm^3, 평균 CFUs/g = 10^8)에서 종양을 콜로니화할 수 있지만 자발적인 BALB-NeuT 유선 종양 모델(평균 종양 크기 400 mm^3, 평균 CFUs/g = 10^3; 예를 들어, Drees et al. (2015) J. Cancer 6(9):843-848 참조)를 콜로니화할 수 있는 능력이 현저히 낮다고 보고되었다.

[1477] 본원에서 제공되는 면역자극성 박테리아가 이식된 종양과 비교하여 자발적 종양 콜로니화에서 유사한 결핍을 갖지 않음을 보여주기 위해, 동소 이식된 유방암의 EMT6 마우스 모델로부터 종양을 수집하고, 자발적 MMTV-PyMT 유방암 모델로부터 수집한 종양과 비교하였다. EMT6 모델의 경우, 6-8 주령의 암컷 BALB/c 마우스(군당 5 마리)에게 EMT6 세포(100 μL PBS 중 $1x10^6$ 세포)를 4번째 유선 지방 패드에 동소적으로 접종하였다. 7일 동안 확립된 옆구리 종양(평균 종양 크기 56 mm^3)이 있는 마우스에게 huIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646 *Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주의 단일 용량 $3 x10^7$ CFU를 IV 주사하였다. IV 투약 후 제4일에, 마우스를 안락사시키고 종양을 균질화하고 LB 플레이트에 평판배양하여 종양 조직 그램당 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 열거하였다. YS1646 *Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주는 종양 조직 그램당 평균 $1.7 x10^7$ CFU로 종양을 콜로니화하였다.

[1478] 자발적 유방암 모델의 경우, 가장 큰 종양의 부피가 평균 272 mm^3로 측정되었을 때 MMTV-PyMT 마우스에 동일한 세균 균주의 $3 x10^7$ CFU를 IV 주사하였다. IV 투약 후 6일째에 종양을 수집하였다. 종양을 균질화하고 LB 플레이트에 평판배양하여 종양 조직 그램당 CFU의 수를 계산하였다. 수집된 모든 종양은 평균 $2.89 x 10^6$ CFUs/g의 종양 무게 범위(0.05 g 내지 0.36 g, N=7)에도 불구하고 잘 콜로니화된 것으로 밝혀졌다. 이러한 데이터는 부모 YS1646 균주와 달리, huIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합을 코딩하는 플라스미드를 함유하는 면역조절 YS1646 *ΔasdΔASdΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주가 이식된 EMT6 종양과 유사한 수준의 MMTV-PyMT 종양(P = 0.18, NS)을 자발적으로 콜로니화할 수 있었음을 실증한다.

[1479] 이식된 종양과 달리 자발적 종양은 인간 종양과 더 유사한 혈관 구조를 갖기 때문에, 이러한 데이터는, 부모 YS1646 균주가 진행성 암 환자의 I 상 임상 시험에서 보고된 것보다 훨씬 더 높은 비율/수준으로 면역자극성 박테리아가 인간 종양을 콜로니화할 것임을 나타낸다(예를 들어, Toso et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152 참조).

[1480] **실시예 38**

[1481] **인간 IL-15Rα-IL-15sc 및 huSTING N154S/R284G tazCTT를 인코딩하는 플라스미드 또는 나노루시퍼라제® 루시퍼라제 대조군 플라스미드를 함유하는 면역 조절 세균 균주는 비인간 영장류에서 내약성이 우수하다**

[1482] I 상 임상 시험에서 부모 YS1646 균주의 최대 허용 용량(MTD)은 $3 x 10^8$ CFUs/m^2이고 용량 제한 독성(DLT) 용량은 $1 x 10^9$ CFUs/m^2인 것으로 보고되었다(예를 들어, Toso et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152 참조). 이 용량에서 발열, 저혈압, 혈소판 감소증, 빈혈, 구토, 설사, 메스꺼움, 저인산혈증과 같은 독성 및 부작용은 IV 투여 후 4시간째에 측정된, TNF-α(약 500,000 pg/mL), IL-6(약 500,000 pg/mL) 및 IL-1β(약 200 pg/mL)를 포함한 전염증성 사이토카인의 혈청 수치가 매우 높기 때문이었다. 별도의 연구에서 YS1646 균주는 시노몰구스 원숭이를 사용한 비인간 영장류(NHP) 연구에서 평가되었다. 이 연구에서 $1 x 10^9$ CFUs/원숭이는 MTD(인간 동등 용량(HED) = $4 x 10^9$ CFUs/m^2)인 한편, $1 x 10^{10}$ CFUs/원숭이의 용량은 허용되지 않는 것으로 간주되었다(HED = $4 x 10^{10}$ CFU/m^2). 최고 용량에서의 DLT는 간 관련 부작용(AE)에 기인하였으며 혈청 사이토카인은 측정되지 않았다(예를 들어 Lee et al. (2000) *International Journal of Toxicology* 19:19-25 참조). NHP는 인간보다 훨씬 더 나은 균주 YS1646에 대해 내약성이 있었고, 인간 MTD보다 로그의 MTD 값이 더 높았기 때문에, 원숭이의 사이토카인 수준이 인간에서 측정된 것보다 대략 로그 더 낮을 것이라고 추론할 수 있다.

[1483] 편모가 없고 *msbB*$^-$/*pagP*$^-$인 균주와 같은 본원에 제공된 면역자극성 박테리아의 MTD 및 혈청 사이토카인 프로파일

을 결정하기 위해 NHP에서 내약성 연구를 수행하였다. 이 연구를 위해 이전에 치료를 받지 않은 24 개월령 내지 50 개월령 사이의 수컷 시노몰구스 원숭이 15 마리를 사용하였다. NHP는 huIL-15Rα-IL-15sc + huSTING N154S/R284G tazCTT의 조합을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/F-ΔpurI* 균주(위에서 논의됨)를 3 x 10^8 CFUs/원숭이, 1 x 10^9 CFUs/원숭이, 또는 3 x 10^9 CFUs/원숭이(투여군당 3 NHP)의 용량으로 IV 투여하거나, 나노루시퍼라제® 루시퍼라제를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주를 3 x 10^8 CFUs/원숭이(군당 3 NHP)의 투여량으로 IV 투여하고, 식염수 비히클 대조군(N=3)과 비교하였다. NHP는 투여 전, 투여 후 4시간째 및 투여 후 24시간째에 채혈하고, 원숭이 사이토카인 U-Plex 패널(Meso Scale Discovery)을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 혈청 사이토카인 수준을 측정하였다.

[1484] 아래 표에 요약된 결과는 박테리아 균주가 시험된 모든 용량 수준에서 내약성이 우수하였으며 식염수(PBS) 대조군과 크게 다른 임상 결과가 보고되지 않았음을 보여준다. 따라서 이 연구에서는 MTD가 확립될 수 없었다. 혈청 사이토카인 수준은 전반적으로 매우 낮았으며, 특히 YS1646 균주를 사용한 인간 임상 시험에서 용량 제한 독성(DLT)에 기인한 사이토카인, 예를 들어 3 x 10^9 CFUs/원숭이 투여군(HED = 1.2 x 10^{10} CFUs/m^2)에서 IV 투역후 4시간째에 측정된 TNF-α(평균 농도 4.6 pg/mL), IL-6(평균 농도 376.9 pg/mL) 및 IL-1β(평균 농도 0.88 pg/mL)를 포함한 사이토카인의 경우에 그러하였다. IP-10/CXCL10(평균 농도 10,549.6 pg/mL) 및 MCP-1/CCL2(평균 농도 6247.7 pg/mL)의 혈청 사이토카인 수치만이 투여후 4시간째에 최고 투여량 군에서 높았고, 투여후 24시간째에 상승된 상태를 유지하였다. 이러한 분석물은 독성과 관련이 없으며 더 유리한 면역 프로파일을 나타낼 수 있다. 요약하면, 페이로드를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 것을 포함하여 본원에 제공된 면역자극성 박테리아는 NHP에서 내약성이 매우 우수하다. 따라서, 이러한 데이터로부터 인간에서 면역자극성 박테리아 균주의 높은 수준의 내약성이 있을 것이라고 추론할 수 있다.

투여 전 혈청 사이토카인 수준

		면역자극성 박테리아 균주 및 용량 (CFUs/NHP)				
		PBS 대조군	YS1646*Δasd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI* + p2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL15sc_T2A_STING N154S/R284G tazCTT			YS1646*Δasd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + NanoLuc® 플라스미드
		-	3 x 10^8 CFUs/NHP	1 x 10^9 CFUs/NHP	3 x 10^9 CFUs/NHP	3 x 10^8 CFUs/NHP
IFN-γ	평균 (pg/ml)	3.87	0.24	0.80	3.78	0.00
	± SD	0.00	0.00	0.78	0.00	0.00
IL-10	평균 (pg/ml)	0.08	0.03	0.05	0.09	0.08
	± SD	0.06	0.02	0.03	0.02	0.02
IL-12p70	평균 (pg/ml)	0.56	0.32	1.43	1.23	0.30
	± SD	0.27	0.16	1.87	1.08	0.21
IL-1β	평균 (pg/ml)	0.08	0.05	0.70	0.09	0.26
	± SD	0.00	0.05	1.15	0.12	0.00

[1485]

		면역자극성 박테리아 균주 및 용량 (CFUs/NHP)				
		PBS 대조군	YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI* + p2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL15sc_T2A_STING N154S/R284G tazCTT			YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + NanoLuc® 플라스미드
		-	3×10^8 CFUs/NHP	1×10^9 CFUs/NHP	3×10^9 CFUs/NHP	3×10^8 CFUs/NHP
IL-2	평균 (pg/ml)	0.00	2.29	0.00	17.32	0.00
	± SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-6	평균 (pg/ml)	0.38	0.41	1.01	2.56	0.79
	± SD	0.23	0.17	0.14	4.10	0.47
IP-10	평균 (pg/ml)	605.50	639.54	813.35	766.50	684.53
	± SD	154.57	54.59	248.99	297.89	46.50
MCP-1	평균 (pg/ml)	361.83	249.90	284.35	275.21	268.46
	± SD	11.71	28.90	65.43	210.65	65.80
TNF-α	평균 (pg/ml)	0.33	0.41	0.83	0.37	0.45
	± SD	0.15	0.48	0.55	0.13	0.00
IL-15	평균 (pg/ml)	11.39	9.05	8.25	9.54	13.03
	± SD	1.52	2.29	1.31	2.64	7.02

SD = 표준 편차

[1486]

혈청 사이토카인 수준, 투여 후 4 시간

		면역자극성 박테리아 균주 및 용량 (CFUs/NHP)				
		PBS 대조군	YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI* + p2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL15sc_T2A_STING N154S/R284G tazCTT			YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + NanoLuc® 플라스미드
		-	3×10^8 CFUs/NHP	1×10^9 CFUs/NHP	3×10^9 CFUs/NHP	3×10^8 CFUs/NHP
IFN-γ	평균 (pg/ml)	1.35	6.87	26.49	22.62	4.03
	± SD	1.09	5.48	34.96	21.59	2.51
IL-10	평균 (pg/ml)	0.068	0.481	0.508	0.586	0.387
	± SD	0.050	0.149	0.125	0.269	0.113
IL-12p70	평균 (pg/ml)	0.05	0.52	1.21	1.17	0.45

[1487]

		면역자극성 박테리아 균주 및 용량 (CFUs/NHP)				
		PBS 대조군	YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI* + p2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL15sc_T2A_STING N154S/R284G tazCTT			YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + NanoLuc® 플라스미드
		-	3×10^8 CFUs/NHP	1×10^9 CFUs/NHP	3×10^9 CFUs/NHP	3×10^8 CFUs/NHP
	± SD	0.01	0.36	1.03	1.12	0.06
IL-1β	평균 (pg/ml)	0.08	0.34	0.55	0.88	0.33
	± SD	0.04	0.14	0.16	0.62	0.13
IL-2	평균 (pg/ml)	0.00	0.52	0.11	10.33	0.00
	SD	0.00	0.00	0.00	11.24	0.00
IL-6	평균 (pg/ml)	3.0	95.3	116.7	376.9	34.8
	± SD	1.4	105.3	70.7	318.1	26.4
IP-10	평균 (pg/ml)	363.0	9529.3	11838.7	10549.6	11143.2
	± SD	19.6	4596.6	82.0	2362.7	1231.4
MCP-1	평균 (pg/ml)	475.5	5017.5	5642.4	6247.7	3700.4
	± SD	143.0	3755.6	1622.2	2492.8	2209.3
TNF-α	평균 (pg/ml)	0.1	1.8	3.4	4.6	1.1
	± SD	0.1	1.5	0.2	4.1	0.5
IL-15	평균 (pg/ml)	12.73	14.45	14.84	15.32	14.9
	± SD	2.5	4.07	3.29	3.91	3.48

SD = 표준 편차

[1488]

혈청 사이토카인 수준, 투여 후 24 시간

		면역자극성 박테리아 균주 및 용량 (CFUs/NHP)				
		PBS 대조군	YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI* + p2.1 CMV VCIP huIL-15Rα-IL15sc_T2A_STING N154S/R284G tazCTT			YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + NanoLuc® 플라스미드
		-	3×10^8 CFUs/NHP	1×10^9 CFUs/NHP	3×10^9 CFUs/NHP	3×10^8 CFUs/NHP
IFN-γ	평균 (pg/ml)	0.71	0.79	1.65	3.32	6.63
	± SD	0.83	0.51	2.15	3.13	0.97
IL-10	평균 (pg/ml)	0.0577	0.0906	0.0672	0.0988	0.1000
	± SD	0.0362	0.0428	0.0629	0.0631	0.0617
IL-12p70	평균 (pg/ml)	0.25	0.35	0.98	2.51	0.31
	± SD	0.03	0.22	1.38	2.50	0.11
IL-1β	평균 (pg/ml)	0.02	0.02	0.36	0.15	0.09
	± SD	0.02	0.00	0.57	0.04	0.03
IL-2	평균 (pg/ml)	0.00	0.00	0.00	3.19	0.00
	± SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-6	평균 (pg/ml)	0.6	8.0	5.3	19.8	3.0
	± SD	0.2	1.9	3.0	17.4	0.7
IP-10	평균 (pg/ml)	475.6	1579.7	2354.0	3638.2	2762.1
	± SD	180.7	339.5	1475.8	4036.5	1752.8
MCP-1	평균 (pg/ml)	266.5	340.1	258.2	525.7	393.1
	± SD	5.9	39.9	41.2	285.5	270.7
TNF-α	평균 (pg/ml)	0.1	0.2	0.4	0.4	0.5
	± SD	0.1	0.0	0.3	0.2	0.6
IL-15	평균 (pg/ml)	11.09	16.07	12.17	15.87	18.63
	± SD	2.51	4.26	1.56	4.83	2.81

SD = 표준 편차

[1489]

[1490] **실시예 39**

[1491] **티미딘 영양 요구체 균주**

[1492] *살모넬라 티피무리움* 필수 유전자 *thyA*는 DNA 합성의 핵심 효소인 티미딜레이트 신타제를 인코딩한다. 유전자의 결실 또는 돌연변이는 균주를 티미딘에 대한 영양요구성으로 만든다. 보완 기질의 결핍 시, 박테리아 세포 사멸이 일어나고, 티미딘 결핍 시 *thyA* 돌연변이체로부터 거대분자가 방출되지 않아(Loessner et al., FEMS Microbiol Lett. 265(1): 81-88 (2006)), PAMP의 잠재적 방출 및 선천적 염증 반응의 후속 활성화를 감소시킨다는 것이 실증되었다. 생체 내에서 복제할 수 없고 보충된 티미딘이 없을 때 빠르게 사멸하는 티미딘 영양 요구체를 생성하기 위해, 균주 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI*에서 *thyA*를 결실시켰다.

[1493] *thyA* 유전자(SEQ ID NO: 464; DC51_3078)를 함유하는 690 bp 영역은 Datsenko 및 Wanner의 방법(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6640-6645 (2000))의 변형을 사용하여 결실을 위해 표적화되었다. *thyA* 유전자를 파괴하기 위해 중첩 PCR에 의해 *thyA* 유전자 녹아웃 카세트를 작제하였다. 이 카세트에는 2개의 I-SceI 절단 부위 옆에 있는 카나마이신 저항성(Kan^R) 카세트와 재조합을 용이하게 하기 위해 5' 말단(345 bp)과 3' 말단(332 bp) 모두에 상동 영역이 포함되어 있다. Kan^R 카세트의 바로 5'에는 Kan^R 카세트의 3'에 있는 75 bp와 완벽하게 상동

인 75 bp의 DNA 서열이 있다. 이 반복 요소(*thyA* MHA)는 Kan^R 카세트의 절제 시 흉터 없는 결실을 남긴다.

[1494] 구체적으로, 하기 표의 서열을 참조하여 *thyA* 좌측 상동성 아암(arm) 서열을 프라이머 thya-1 및 thya-2를 사용하여 YS1646으로부터 증폭시키고, 프라이머 thya-1을 사용하여 Kan^R 카세트와 PCR 중첩시키고, scFv-*thyA* 우측 상동성 아암 서열을 프라이머 thya-3 및 thya-4를 사용하여 YS1646으로부터 증폭시키고, *thyA* MHA와 PCR 중첩시켰다(프라이머 loxp-4 및 thya-4를 사용하여 공급업체(IDT)로부터의 합성 gBlock 유전자 단편으로 제조됨).

표 3: *thyA* 유전자 KO 상동성 아암 길이 정보

유전자 명칭	상동성 아암 길이	
	LHA	RHA
thyA (SEQ ID NO: 464_	345 bp (VNP20009 로부터 증폭된 PCR)	332 bp (VNP20009 로부터 증폭된 PCR)

[1495]

표 4: *thyA* KO 프라이머 서열 정보

유전자	프라이머	프라이머 서열	프라이머 설명	SEQ ID NO.
thyA	thya-1	ccttcccagttgtatgagttggc	thyA LHA 및 KO 카세트를 증폭시키는 포워드 프라이머	471
	thya-2	CTGTTATCCCTAgaagcagctccagcctacacctgtgtgccttcatccagca	thyA LHA 를 증폭시키는 리버스 프라이머	472
	thya-3	gatgaaggcacacagtgaaattgaaggctatgatccgcac	thyA RHA 를 증폭시키는 포워드 프라이머	473
	thya-4	gttgccagccataaagtcctgtg	thyA RHA 및 KO 카세트를 증폭시키는 리버스 프라이머	474
	thya-5	ccatgctctttcctggctca	thyA KO 를 체크하는 fwd 프라이머	475
	thya-6	ctgacaaagcaccatgaaccg	thyA KO 를 체크하는 rev 프라이머	476
	FRT-3	gtgtaggctggagctgcttc	Kan 유전자 카세트를 증폭시키는 Fwd 프라이머	477
	loxp-4	ggcttcccaaccttaccagag	thyA MHA 및 RHA 를 중첩시키기 위한 Fwd 프라이머	478
	scFv-3	cataatctgggtccttggtctgc	Kan 유전자 카세트를 증폭시키고 Kan 유전자 카세트를 thyA LHA 와 중첩시키기 위한 리버스 프라이머	223

>*thyA* MHA gBlock 단편

주목: *thyA* KO 중간 상동성 아암

(ggcttcccaaccttaccagagggcgccccagctggcaattccgGGTACCggcaagTAGGGATAACAGGGTAA TgttaTCTGCAgaccaaggacccagattatgcagcaacacgtttcctgaggaaccatgaaacagtatttagaactgatgcaaaaa gtgctggatgaaggcacacagtgaaattgaaggctatgatccgcac; SEQ ID NO: 479)는 I-SceI 를 사용한 Kan 유전자 제거 동안 람다 레드 재조합 단계에 사용되었음

[1496]

[1497] 그 후에, 전체 길이 *thyA* 유전자 녹아웃 카세트를 프라이머 thya-1 및 thya-4(상기 표 참조)를 사용하는 중첩 PCR에 의해 작제하고, 겔 정제하고, 온도 민감성 람다 레드 재조합 플라스미드 pSL0304를 갖는 균주 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/F-Δ*purI*에 전기천공에 의해 도입하였다. 그 후에, 카나마이신 내성 유전자는 이전에 Yang and Yang(Applied and Environmental Microbiology, 80: 3826-3834 (2014))에 기재된 바와 같이 I-SceI/람다 레드 매개 재조합에 의해 치유되었고, 온도 민감성 플라스미드는 비- 허용 온도에서 성장에 의해 치유되었다. *thyA* 유전자 단편 녹아웃 서열은 프라이머 thya-5 및 thya-6(표 2)을 사용하여 PCR에 의해 확인되

었고, DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. 부모 균주 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/*F*-Δ*purI*의 생성된 돌연변이체 유도체를 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/*F*-Δ*purI*/Δ*thyA*로 표기하였다.

[1498] 티미딘 결실 균주를 250 μg/mL 티미딘이 보충된 DasGip 발효 시스템에서 6시간 동안 성장시켰고, 이어서 배양 물질을 주입 스톡을 위해 가공하였다. YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/*F*-Δ*purI*/Δ*thyA*를 250 μg/mL 티미딘(Sigma Aldrich T1895-1G) 및 50 μg/mL 디아미노피멜산의 존재 하에 배양하여 일렉트로컴피턴트 세포를 생성하였다. YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/*F*-Δ*purI*/Δ*thyA*를 플라스미드 ADN-86, ADN-870 또는 ADN-872(아래 표 참조)로 형질전환하여 균주 STST-321, STST-326 및 STST-328을 각각 생성하였다. 명시된 플라스미드(하기 표 참조)를 함유하는 STST-321, STST-326 및 STST-328로 표기된 YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/*F*-Δ*purI*/Δ*thyA* 균주를, 티미딘 보충 부재 하에 CRST-2000, YS1646Δ*asd*/Δ*FLG*/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/*F*-Δ*purI* 보유 플라스미드 ADN-838과 병렬로 250 μg/mL 티미딘 존재 하에 6시간 동안 DasGip 발효 시스템에서 1 L 규모로 성장시켰다.

STST-321	**ADN-865**	PurI del-CsgD-**Thy**A-pATI1.76 MTL EMCV IRES 오브알부민-SIY Myc HPRE bGHpA-ADN-865
STST-326	**ADN-870**	PurI del-CsgD-**Thy**A-pATI1.76 MTL EMCV IRES tPA 리더 4xSIINFEKYL HPRE bGHpA-ADN-870
STST-328	**ADN-872**	PurI del-CsgD-**Thy**A-pATI1.76 MTL tPA 리더 4xSIINFEKYL HPRE bGHpA-ADN-872
CRST-2000	**ADN-838**	PurI del-CsgD-pATI2.1 CMV VCIP IRES huIL-15cplex T2A hSTINGtCTT N154S+R284G HPRE bGHpA-ADN-838

[1499]

[1500] 발효 배양물은 발효 내내 OD_{600}에 대해 분석되었다. 티미딘 결실 균주의 성장은 CRST-2000 대조군과 비슷한 것으로 관찰되었다.

[1501] 티미딘 영양요구성을 확인하기 위해, 균주 STST-321, STST-326 및 STST-328의 성장을 대조군 CRST-2000과 비교하여 250 μg/mL 티미딘 보충이 있거나 없는 배지에서 평가하였다. 주입 스톡을 실온에서 해동하고 2.5 μL를 사용하여 투명한 바닥 96웰 플레이트의 3중 웰에서 250 μL 배지 +/- 티미딘을 접종하였다; Spectramax 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)에서 OD_{600}으로 37℃에서 진탕하면서 12시간 동안 성장을 평가하였다. 티미딘 결실 균주를 250 μg/mL 티미딘 보충 유무에 관계없이 브로쓰에서 성장시켰고, OD_{600}을 12시간 동안 15분 간격으로 모니터링하였다.

[1502] 결과는 티미딘 보충의 부재 하에 STST-321, STST-326 및 STST-328에 대해 어떠한 성장도 관찰되지 않은 반면, CRST-2000은 정지기까지 견실한 성장을 실증하였음을 보여준다. 250 μg/mL의 티미딘 보충이 있는 경우, STST-321, STST-326 및 STST-328은 CRST-2000과 유사한 성장 프로파일을 가진 정지기로 성장하여 티미딘에 대한 정확하고 제어된 영양요구성을 보여준다.

[1503] **실시예 40**

[1504] **IRF3, IFNα2, 및 IFN-β 발현 카세트의 최적화된 발현**

[1505] 인간 IRF3 S396D 또는 마우스 IRF3 S388D, 또는 인간 또는 마우스 IFNα2 또는 인간 또는 마우스 IFN-β의 조합을 포함하는 플라스미드(여기서 이시스트론 구조는 T2A 펩타이드를 포함함)를 단일 발현물 대조군에 대한 각각 인코딩된 페이로드/생성물의 발현에 대해 시험하였다.

[1506] HEK293T STING Null Cells(293-DualTM Null Cells; InvivoGen)는 내인성 STING을 포함하지 않고 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP)를 발현하며 내인성 IFN-자극 반응 요소(ISRE) 프로모터의 제어를 받으며, 여기서 ISRE의 코딩 서열은 녹인(knock-in) 기술을 사용하는 SEAP ORF로 대체되어 사용되었다. 따라서 STING 활성은 유형 I IFN 유도 SEAP 생산을 모니터링하여 평가된다. 293-DualTM Null Cells는 또한 내인성 IFN-β 프로모터의 제어를 받는 분비 루시퍼라제인 Lucia™ 루시퍼라제를 발현한다; IFN-β의 코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여 Lucia™ 루시퍼라제 ORF로 대체되었다. 이를 통해 IFN-β의 발현을 모니터링하여 STING 활성을 평가할 수 있다. 이러한 세포를 사용하여 STING 활성은 ISRE 유도 SEAP 생산 및/또는 Lucia™ 루시페라아제의 IFN-β 의존적 발현을 모니터링하여 평가할 수 있다. 2개의 리포터 단백질인 SEAP 및 Lucia™ 루시퍼라제는 각각 QUANTI-Blue™ 및 QUANTI Luc™ 검출 시약(InvivoGen)과 같은 표준 분석 및 검출 시약을 사용하여 세포 상층액에서 측정할 수 있다.

[1507] 세포를 웰당 200,000개의 세포로 폴리-L-리신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 시딩하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 인큐베이션하여 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날 각 플라스미드 DNA 300 ng과 CMV-GFP 벡터(즉,

CMV 프로모터의 제어 하에 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 벡터) 40 ng을 무혈청 배지에 희석시키고 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였으며, 이때 형질주입되지 않은 웰은 음성 대조군(2벌 중복)으로서 역할을 하였다. 각 시료의 세포 배양 상층액을 형질주입후 48시간째에 수집하였다.

[1508] 작제물의 활성은 ISRE-SEAP 및 IFN-β-Lucia™ 리포터 시스템을 사용하여 평가되었다. 유형 I 인터페론(IFN) 활성은 세포 상층액에서 유형 I IFN-자극된 SEAP 생산을 모니터링함으로써 평가되었다. SEAP 측정에 사용되는 QUANTI-Blue™ 시약(InvivoGen) 180 μL에 세포 배양 상층액 20 μL를 첨가하였다. 유형 I 인터페론 활성화는 650 nm의 흡광도 파장에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)에서 ISRE 유도 SEAP 활성을 측정하여 결정되었다. 유형 I 인터페론(IFN) 활성은 또한 세포 상층액에서 유형 I IFN-자극된 Lucia™ 루시페라제 생산을 모니터링하여 평가되었다. Lucia™ 루시퍼라제 활성 측정에 사용되는 QUANTI-Luc™ 시약(InvivoGen) 50 μL에 세포 배양 상층액 20 μL를 첨가하였다. 유형 I 인터페론 활성화는 발광 설정에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)에서 IFNβ-유도된 Lucia™ 루시퍼라제 활성을 측정하여 결정되었다.

[1509] **A. BMDC에서 마우스 IRF3, IFNα2, 및 IFNb의 형질주입으로 인한 사이토카인**

[1510] 마우스 IRF3 S388D, 마우스 IFNα2, 마우스 IFN-β를 포함하는 다양한 단일 발현 플라스미드 및 조합 플라스미드를 hSTING N154S/R284G tazCTT 플라스미드와 비교하였다. 발현 결과는 아래 표에 나와 있다. ISRE-SEAP 리포터 활성은 mIFNα2 T2A mIRF3 S388D 및 mIRF3 S388D T2A mIFNα2, 뿐만 아니라 모든 인간 작제물에서 hSTING N154S/R284G tazCTT보다 높다. IFNβ-루시아 리포터 활성은 인산유사 hIRF3 단독, hIFNα2 T2A hIRF3 S388D 및 hIRF3 S388D T2A hIFNα2에 대해 hSTING N154S/R284G tazCTT보다 높다. 이러한 결과는 높은 수준의 유형 I IFN 생산이 개별 유형 I IFN 신호 구성요소뿐만 아니라 구성 유형 I IFN 신호 구성요소의 조합을 발현함으로써 유도될 수 있음을 보여준다.

형질주입 효율에 의해 정규화된 마우스 및 인간 IRF3, IFNα2, 및 IFN-β 발현

	ISRE-SEAP (흡광도 / %GFP)		IFNβ-Lucia (발광 / %GFP)	
	평균	± SD	평균	± SD
비형질주입	ND	ND	ND	ND
1.76 CMV huSTING tazCTT DM	0.0228583	0.00085119	11.2064602	0.45461337
1.76 CMV mIFNα2	0.03989167	0.00145511	0.32920588	0.28396577
1.76 CMV mIFN-β	ND	ND	ND	ND
1.76 CMV mIRF3 S388D	0.01381649	0.00062722	5.20826023	0.36717461
1.76 CMV mIFNα2 T2A mIFN-β	0.01767895	0.00052589	ND	ND
1.76 CMV muIFNα2 T2A muIRF3 S388D	0.02566539	0.00030503	6.64847586	1.66829016
1.76 CMV muIRF3 S388D T2A muIFNα2	0.03512478	0.0016182	6.37450819	1.35199207
1.76 CMV huIFNα2	0.05600093	0.0009781	0.8808781	0.67044592
1.76 CMV huIRF3 S396D	0.03945822	0.00031064	42.716536	4.91527029
1.76 CMV huIFN-β	0.06714092	0.00393377	1.86574208	0.47553008
1.76 CMV huIFNα2 T2A huIFN-β	0.05854426	0.00151915	1.00891248	0.73015436
1.76 CMV huIFNα2 T2A huIRF3 S396D	0.06245151	0.0015994	18.8868229	2.54040139
1.76 CMV huIRF3 S396D T2A huIFNα2	0.06495505	0.00023288	18.8039985	3.32761255

[1511]

[1512] **B.**인간 IRF3 S396D 또는 마우스 IRF3 S388D, 또는 인간 또는 마우스 IFNα2, 또는 인간 또는 마우스 IFN-β, 및 이의 조합의 조합을 함유하는 플라스미드를 뮤린 1차 골수 유래 수지상 세포(BMDC)에서 형질주입에 의한 발현에 대해 시험하였으며, 여기서 이시스트론 작제물은 T2A 펩타이드를 함유한다.

[1513] 이를 시험하기 위해 Golden Ticket 뮤린골수를 분리하여 1.5 mL Eppendorf 튜브에 넣고 1200 RPM에서 5분 동안 회전시켜 골수 세포를 수집하였다. 세포를 RPMI-1640 + 10% FBS에서 1회 세척한 다음, RPMI-1640 + 10% FBS에

서 20 ng/ml GM-CSF를 포함하는 96-웰 TC 처리 플레이트에 접종하였다. 4일 후, 비부착성 세포를 웰에서 피펫팅하고 형질주입을 위해 96웰 플레이트에서 RPMI-1640 + 10% FBS에 웰당 2e5 세포로 다시 시딩하였다. 제조업체의 설명서에 따라 Viromer® RED를 사용하여 세포를 형질 감염시켰다. 간단히 말해서, 300 ng의 플라스미드 DNA와 "DNA 없음" 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고 0.08 μL의 Viromer® RED와 혼합하고 실온에서 15분 동안 배양하여 DNA/Viromer® RED가 복합체를 형성하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 96-웰 플레이트의 각 웰에 천천히 첨가하고(2벌 중복) 플레이트를 CO_2 인큐베이터에서 37℃로 인큐베이션하였다. 48시간에 상층액을 수합하고 제조업체의 프로토콜에 따라 유세포분석 기초 사이토카인 비드 어레이(CBA)를 사용하여 뮤린 IFNα, IFN-β, CXCL10(IP-10) 및 IL-6에 대해 분석하였다.

[1514] 마우스 IRF3 S388D, 마우스 IFNα2, 마우스 IFN-β를 인코딩하는 다양한 단일 발현 플라스미드 및 조합 플라스미드를 hSTING N154S/R284G tazCTT 플라스미드와 비교하였다. 아래 표에서 볼 수 있듯이 mIFNα2, mIFN-β 및 mIFNα2 T2A mIFN-β 구조를 사용한 형질주입은 hSTING N154S/R284G tazCTT보다 더 높은 수준의 IFN-α 및 IFN-β를 가졌다. mIFN-β 및 mIFNα2 T2A mIFN-β 작제물은 hSTING N154S/R284G tazCTT보다 CXCL10 수치가 더 높았다. mIRF3 S388D, mIFNα2 T2A mIRF3 S388D 및 mIRF3 S388D T2A mIFNα2 작제물은 모두 hSTING N154S/R284G tazCTT보다 IL-6 수치가 낮았다. 이러한 데이터는 발현된 유형 I IFN 구성요소의 단독 및 조합의 다중 조합을 통해 염증 유발 IL-6의 최소 유도와 함께 유형 I IFN 신호전달을 유도하는 능력을 실증한다. IFN-β 단독의 발현은 시험된 모든 표적의 가장 높은 유형 I IFN 활성을 유도한다.

BMDC 에서 마우스 IRF3, IFNα2, 및 IFN-β 의 형질주입으로 인한 사이토카인

	IFN-α		IFN-β		CXCL10		IL-6	
	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD	평균	± SD
DNA 없음	3.38	1.99	5.18	1.85	34.05	0.78	5.74	1.86
huSTING tazCTT N154S+R284G	72.07	26.35	62.18	13.68	7199.95	1468.73	183.82	50.88
mIFNα2	99.91	21.01	62.48	9.97	5524.30	303.77	174.86	39.07
mIFN-β	91.95	44.55	190.12	13.94	8178.50	1917.96	191.92	14.28
mIRF3 S388D	33.36	3.19	30.42	0.88	2428.30	414.51	90.29	12.83
mIFNα2 T2A mIFN-β	72.84	12.10	77.70	3.78	5226.50	795.07	202.70	17.23
muIFNα2 T2A muIRF3 S388D	20.82	6.37	21.49	3.13	2077.50	356.38	95.41	10.88
muIRF3 S388D T2A muIFNα2	43.72	15.15	32.72	3.39	3187.75	9.12	134.63	0.66

[1515]

[1516] **C. 마우스 IFNα2 T2A IFN-β는 뮤린 동소 유방암 모델에서 생체 내에서 발현된다.**

[1517] 이 실험을 위해, 6-8 주령의 암컷 BALB/c 마우스(군당 5마리)에게 EMT6 종양 세포(ATCC # CRL-2755)(100 μL PBS 중 $1x10^6$ 세포)를 왼쪽 유선 지방 패드에 접종하였다. 9일간 확립된 유선 종양(부피 약 100 mm^3)이 있는 마우스에게 mIFNα2 T2A mIFN-β를 인코딩하는 이시스트론 플라스미드를 함유하는 YS1646 *Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI*(대형 세정) 균주 $2 x10^7$ CFU의 단일 용량을 IV 주사하고, PBS 대조군과 비교하였다.

[1518] 액틴에 비하여 종양 mIFNα2 및 mIFN-β 발현 수준을 결정하여 종양 특이적 페이로드 전달을 평가하였다. IV 주사 후 4일째에 종양을 절제하고 1.2 mL의 RLT + 용해 완충액에서 TissueLyser II(Qiagen)를 사용하여 RNA 추출을 위해 처리하였다. 제조업체의 설명서에 따라 RNeasy® Plus Mini Kit(Qiagen)을 사용하여 RNA 분리를 위해 균질물을 수집하였다. 총 RNA 농도는 NanoDrop™ 2000 UV-Vis 분광광도계(Thermo Scientific)를 사용하여 측정하였다. 각 시료의 순도 또한 A_{260}/A_{230} 흡수 비율로 평가하였다. cDNA 합성은 CFX96™ 실시간 시스템(Bio-Rad) 및 iScript™ gDNA Clear cDNA 합성 키트(Bio-Rad)를 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 20 μL 반응에서 0.5-1 μg의 주형 RNA로부터 수행되었다. qPCR은 CFX96 실시간 시스템(Bio-Rad)으로 수행되었다. mIFNα2(qMmuCEP0043629), mIFNβ1(qMmuCEP0058870)에 대한 PrimePCR™ Probe Assay는 Bio-Rad에서 구입하였다. qPCR 반응(20 μL)은 SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix 또는 iQ Multiplex Powermix(Bio-Rad)를 사용하여 프로토콜별로 수행되었다. Bio-Rad CFX96 실시간 시스템의 표준 열순환 프로그램은 95℃에서 150초 동안 변성한 다음 95℃에서 15초 동안, 60℃에서 55초 동안 39주기로 구성되었다. 액틴 기준 mRNA(Bio-Rad, qMmuCEP0039589)를 사용하여 표적 mRNA의 정량화를 정규화하였다. ΔC_q는 표적 유전자와 기준 유전자 사이의 차

이로 계산되었다.

[1519] 값은 5 마리 마우스(PBS 군) 또는 3 마리 마우스(mIFNα2 + mIFN-β 군)의 평균으로 아래 표에 표시된다. PBS 대조군과 비교하여 mIFNα2 및 mIFN-β를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 YS1646*ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgDΔpurI*(크고 깔끔) 균주는 EMT6 종양에서 mIFNα2 및 mIFN-β 유전자의 발현을 유의하게 증가시켰다.

처리	PBS 대조군에 비해 평균 배수 발현	
	IFNα2	IFNβ1
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*purI*(large clean) 균주 + mIFNα2 + mIFN-β	5.37E+03	7.60E+00

[1520]

[1521] 종양으로의 플라스미드 전달 및 이후의 이종 유전자 발현 및 단백질 분비를 측정하기 위해 이러한 종양에서 mIFNα2 및 mIFN-β 단백질의 양을 측정하였다. 이를 위해 균질화된 종양에서 용해물을 수합하고 제조업체의 프로토콜에 따라 유세포분석 기초 사이토카인 비드 어레이(CBA)를 사용하여 단백질 발현을 평가하였다.

[1522] 아래 표에서 볼 수 있듯이 mIFNα2 및 mIFN-β를 인코딩하는 플라스미드를 포함하는 YS1646*ΔasdΔFLGΔpagPΔansBΔcsgDΔpurI*(크고 깔끔) 균주는 PBS 대조군 종양과 비교하여 종양 그램당 높은 수준의 mIFNα2 및 mIFN-β 단백질을 나타내었으며, 이는 mIFNα2 및 mIFN-β가 IV 투여 후 종양으로 강력하게 전달됨을 실증한다.

처리	종양 그램당 pg/ml	
	IFNα2	IFN-β
PBS	20497.6 ±6249	75.8 ±21
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*purI*(large clean) 균주 + mIFNα2 + mIFN-β	37538.5 ±3843	307.7 ±49

[1523]

[1524] **실시예 41**

[1525] **마우스 및 인간 세포에서 막 결합 인간 및 마우스 IL-12의 발현**

[1526] 마우스 막 결합된 IL-12p70(SEQ ID NO: 466)은 마우스 IL-12p40(SEQ ID NO: 399의 잔기 3009-4010)에 이어서 15개 아미노산 링커(SEQ ID NO: 480; GGGGSGGGGSGGGGS), 및 IL-12p35(SEQ ID NO: 399의 잔기 4056-4634)로 작제되었다. 뮤린 CD80(SEQ ID NO: 481; PPEDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTVFL)의 막횡단 및 세포질 부분은 이 서열을 따른다. 인간 막 결합 IL-12p70(SEQ ID NO:467)은 인간 IL-12p40 (SEQ ID NO: 482; MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS)과 뒤이어 15개 아미노산 링커 서열(GGGGSGGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 480) 및 인간 IL-12p35 (RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS, SEQ ID NO:483)로 작제되었다. 인간 CD80(SEQ ID NO: 484; DNLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV)의 막횡단 및 세포질 부분은 이 서열을 따른다.

[1527] HEK 세포를 웰당 200,000개의 세포로 폴리-L-리신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 시딩하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 인큐베이션하여 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날 각 플라스미드 DNA 300 ng과 CMV-GFP 벡터(즉, CMV 프로모터의 제어 하에 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 벡터) 40 ng을 무혈청 배지에 희석시키고 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였으며, 이때 형질주입되지 않은 웰은 음성 대조군 역할을 하였다(2벌 중복). 각 시료의 세포 배양 상층액을 형질주입후 48시간째에 수집하였다.

[1528] 작제물의 활성은 HEK-Blue IL-12(InvivoGen) 세포와 형질주입된 HEK 세포의 공동배양을 사용하여 평가되었다. 형질주입 24시간 후, 5e4 HEK 세포를 분리하고 96웰 TC 플레이트에 시딩하였다. 또한, 5e4 HEK-Blue IL-12 세포를 동일한 웰에 시딩하였다. 형질주입 48시간 후, 각각의 시료로부터의 세포 배양 상층액을 형질주입후 48시간째에 수집하였다. 인간 및 마우스 IL-12 생물활성은 수용체에 결합하는 IL-12의 다운스트림의 STAT-4 경로의

활성화를 측정하는 SEAP 리포터를 측정함으로써 결정되었다. IL-12 생물활성은 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)에서 흡광도 파장 650 nm에서 ISRE로 유도된 SEAP 활성을 측정하여 결정하였다.

[1529] 작제물의 발현 결과는 아래 표에 제공된다. 각각의 뮤린 및 인간 막 결합 IL-12p70은 HEK-Blue IL-12 세포에서 적어도 가용성 뮤린 및 인간 IL-12p70과 동일한 정도로 STAT4-SEAP 리포터를 활성화하였으며, 이로써 작제물의 기능을 확인하였다.

형질주입 효율에 의해 정규화된 마우스 및 인간 막 결합 IL-12p70 발현

	STAT4-SEAP (흡광도 / %GFP)	
	평균	± SD
비형질주입	ND	ND
muIL-12p70	0.1104	0.0024
huIL-12p70	0.1098	0.0031
muIL-12p70.B7	0.1166	0.0005
huIL-12p70.B7	0.2368	0.0057

[1530]

[1531] 막 결합된 IL-12p70 작제물을 유세포분석에 의해 형질주입된 HEK 세포의 표면에서의 발현에 대해 시험하였다. 상기와 동일한 조건을 사용하여 뮤린 또는 인간 IL-12p70으로 형질주입된 HEK 야생형 세포를 형질주입후 48시간째에 수합하였다. 세포를 PBS로 분리하고 V-바닥 96-웰 플레이트의 웰에 시딩하였다. 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 1회 세척하였다. 그 후에, 세포를 1:10으로 희석된 항-인간 IL-12p70 APC(Miltenyi) 또는 1:10으로 희석된 항-마우스 IL-12p70 APC(Miltenyi)를 함유하는 50 uL PBS + 2% FBS에 재현탁하고, 얼음 위에서 어둠 속에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고 PBS + 2% FBS에 1:6000 희석된 DAPI에 재현탁하였다. ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 유세포분석 데이터를 수집하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 형질주입되지 않은 세포의 1.67%만이 APC 양성인 반면, 막 결합된 인간 IL-12p70은 40.4% 양성이었고 막 결합된 뮤린 IL-12p70은 59.9%였다. 따라서, 이러한 막 결합된 IL-12 작제물은 인간 세포에서 잘 발현된다.

[1532] 인간 또는 뮤린 막 결합된 IL-12p70을 함유하는 플라스미드를 뮤린 1차 골수-유래 수지상 세포(BMDC)에서의 형질주입에 의한 발현에 대해 시험하였다. 야생형 뮤린 골수를 분리하여 1.5 mL Eppendorf 튜브에 넣고 1200 RPM에서 5분 동안 회전시켜 골수 세포를 수집하였다. 세포를 RPMI-1640 + 10% FBS에서 1회 세척한 다음, 96-웰 TC-처리 플레이트에서 20 ng/ml GM-CSF와 함께 RPMI-1640 + 10% FBS에 시딩하였다. 제3일에, 추가의 20 ng/ml GM-CSF와 함께 RPMI-1640 + 10% FBS를 세포에 첨가하였다. 6일 후에, 비부착성 세포를 웰로부터 피펫팅하고, 형질주입을 위해 96-웰 플레이트에서 RPMI-1640 + 10% FBS에 웰당 2e5개 세포로 재시딩하였다. Viromer® RED 형질주입 시약을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 세포를 형질주입하였다. 간략하게는, 300 ng의 플라스미드 DNA, 뿐만 아니라 "DNA 무함유"(형질주입 시약 단독) 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고, 0.08 μL의 Viromer® RED 형질주입 시약과 혼합하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여, DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되게 하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 (2벌 중복으로) 서서히 첨가하고, 플레이트를 37℃, CO_2 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 세포를 형질주입-후 48시간째에 수합하고, 유세포분석법을 사용하여 IL-12 표면 발현에 대해 검정하였다.

[1533] 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 1회 세척하였다. 그 후에, 세포를 1:10으로 희석된 항-인간 IL-12p70 APC(Miltenyi) 또는 1:10으로 희석된 항-마우스 IL-12p70 APC(Miltenyi), 1:200으로 희석된 CD11b PE, 1:200으로 희석된 ClassII APC-Cy7을 함유하는 50 μL PBS + 2% FBS에 재현탁시키고, 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고 PBS + 2% FBS에 1:6000으로 희석된 DAPI 염색에 재현탁하였다. ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 유세포분석 데이터를 수집하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 수지상 세포 집단에서 형질주입되지 않은 세포의 0.205% ± 0.021%와 VCIP IRES CMV NanoLuc 형질주입된 세포의 0.685% ± 0.262%만이 APC 양성인 반면, 막 결합 인간 IL-12p70은 6.14% ± 1.27% 양성이었고 막 결합 뮤린 IL-12p70은 2.64% ± 0.87% 양성이었다. 이러한 결과는 막 결합된 IL-12 작제물이 마우스 골수 수지상 세포 표면에서 배경을 능가하여 검출되었음을 보여준다.

[1534] 뮤린 막 결합 IL-12p70을 함유하는 플라스미드는 또한 뮤린 1차 골수-유래 대식세포(BMM)에서의 형질주입에 의한 발현에 대해 시험되었다. 야생형 뮤린 골수를 단리하고, 1.5 mL 에펜도르프 튜브 내로 플러쉬하고, 1200 RPM에서 5분 동안 회전시켜, 골수 세포를 수집하였다. 세포를 RPMI-1640 + 10% FBS에서 1회 세척한 다음, 24-웰 TC-처리 플레이트에서 20 ng/ml M-CSF와 함께 RPMI-1640 + 10% FBS에 시딩하였다. 3일 후, 배지를 흡인하고, 20 ng/ml M-CSF를 보충하였다. Viromer® RED 형질주입 시약을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 세포를 형질주입하였다. 간략하게는, 750 ng의 플라스미드 DNA, 뿐만 아니라 "DNA 무함유" 대조군을 제공된 완충액에 희석시키고, Viromer® RED 형질주입 시약과 혼합하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여, DNA/Viromer® RED 복합체가 형성되게 하였다. 그 후에, DNA/Viromer® RED 복합체를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 (2벌 중복으로) 서서히 첨가하고, 플레이트를 37℃, CO_2 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 세포를 형질주입-후 48시간째에 수합하고, 유세포분석법을 사용하여 IL-12 표면 발현에 대해 탈착시켰다.

[1535] 세포를 10 mM EDTA로 분리하고 PBS + 2% FBS로 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 1회 세척하였다. 그 후에, 세포를 1:10으로 희석된 항-인간 IL-12p70 APC(Miltenyi) 또는 1:200으로 희석된 항-마우스 IL-12p70 APC(Miltenyi), 1:200으로 희석된 CD11b PE, 및 1:200으로 희석된 ClassII APC-Cy7을 함유하는 50 uL PBS + 2% FBS에 재현탁시키고, 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고 PBS + 2% FBS에 1:6000 희석된 DAPI에 재현탁하였다. ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 유세포분석 데이터를 수집하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 형질주입되지 않은 세포의 0.01% ± 0.003%와 VCIP IRES CMV NanoLuc 형질주입된 세포의 0.36% ± 0.028%만이 APC 양성인 반면 막 결합 뮤린 IL-12p70은 1.945% ± 0.106%였다. 따라서, 이러한 막 결합된 IL-12 작제물은 배경 위의 마우스 골수 대식세포 표면에서 검출되었다.

[1536] **실시예 42**

[1537] **인간 세포로부터의 DLL3xCD3 이중특이적 T-세포 연계자의 발현**

[1538] 소세포 폐암에서 선택적으로 발현되는 델타 유사 리간드 3을 표적으로 하는 DLL3xCD3 이중특이적 T 세포 연계자(상표 BiTE®로 판매됨), 및 플래그 태그를 포함하는 CD3+ T 세포는 항-DLL3 항체 SC16.15, SC16.34 및 SC16.56의 아미노산 서열을 사용하여 설계되었으며, 예를 들어 국제 특허 공개 번호 WO 2017/031458 A2를 참조한다. 이 BiTE 작제물의 항-CD3 아암은 클론 145-2C11에서 설계되었다. 이러한 항체는 CMV 프로모터의 제어 하에 3' HPRE와 함께 pATI-1.76 벡터에 클로닝된 완전 뮤린 서열이다. 인간 투여를 위해 항체는 적절하게 인간화될 수 있다. 서열은 Sanger 시퀀싱으로 확인되었다.

[1539] 생성된 작제물의 서열은 하기와 같다:

[1540] **SC16.56 DLL3HLxCD3HL(SEQ ID NO: 485)**

[1541] 작제물은 SEQ ID NO: 485로 그리고 아래 표시된 바와 같이 마우스 IgGK 리더, SC16.56 VH, 15 아미노산 GS 링커, SC16.56 VL, 5 아미노산 링커, 145-2C11 VH, 15 아미노산 GS 링커, 145-2C11 VL, 및 플래그 태그를 이 순서로 포함한다:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	마우스 IgGK 리더
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGM NWVKQAPGKGLKWMAWINTYTGEPTYADDFKG RFAFSLETSASTASLQIINLKNEDTATYFCARIGDS SPSDYWGQGTTLTVSS	SC16.56 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVW YQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFAGSGYGTD FSFTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGGGTKLEIR	SC16.56 VL
GGGGS	5 아미노산 GS 링커
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGM HWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFT VSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWD KNYWGQGTMVTVSS	145-2C11 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD SSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	145-2C11 VL
DYKDDDDK	Flag 태그

[1542]

[1543] SC16.56 DLL3LHxCD3HL(SEQ ID NO: 486)

[1544] 작제물은 SEQ ID NO: 486으로 그리고 아래 표시된 바와 같이 마우스 IgGK 리더, SC16.56 VL, 15 아미노산 GS 링커, SC16.56 VH, 5 아미노산 링커, 145-2C11 VH, 15 아미노산 GS 링커, 145-2C11 VL, 및 플래그 태그를 이 순서로 포함한다:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	마우스 IgGK 리더
SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVW YQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFAGSGYGTD FSFTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGGGTKLEIR	SC16.56 VL
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGM NWVKQAPGKGLKWMAWINTYTGEPTYADDFKG RFAFSLETSASTASLQIINLKNEDTATYFCARIGDS SPSDYWGQGTTLTVSS	SC16.56 VH
GGGGS	5 아미노산 링커
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGM HWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFT VSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWD KNYWGQGTMVTVSS	145-2C11 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD SSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	145-2C11 VL
DYKDDDDK	Flag 태그

[1545]

[1546] SC16.15 DLL3HLxCD3HL(SEQ ID NO: 487)

[1547] 작제물은 SEQ ID NO: 487로 그리고 아래 표시된 바와 같이 마우스 IgGK 리더, SC16.15 VH, 15 아미노산 GS 링커, SC16.15 VL, 5 아미노산 링커, 145-2C11 VH, 15 아미노산 GS 링커, 145-2C11 VL, 및 플래그 태그를 이 순서로 포함한다:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	마우스 IgGK 리더
QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTRYWIH WIKQRPGQGLEWIGYINPTTVYTEFNQNFKDKATLT ADKSSTTASMQLSSLTSEDSAVYYCARGGSNFFDYW GQGTTLTVSS	SC16.15 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPASLAASVGETVAITCRASENIYYNLAWY QQKQGKSPQLLIYTANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSL KINSMQPEDSATYFCKQAYDVPPTFGGGTKLEIK	SC16.15 VL
GGGGS	5 아미노산 링커
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGM HWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFT VSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWD KNYWGQGTMVTVSS	145-2C11 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD SSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	145-2C11 VL
DYKDDDDK	Flag 태그

[1548]

[1549] SC16.15 DLL3LHxCD3HL(SEQ ID NO: 488)

[1550] 작제물은 SEQ ID NO: 488로 그리고 아래 표시된 바와 같이 마우스 IgGK 리더, SC16.15 VL, 15 아미노산 GS 링커, SC16.15 VH, 5 아미노산 링커, 145-2C11 VH, 15 아미노산 GS 링커, 145-2C11 VL, 및 플래그 태그를 이 순서로 포함한다:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	마우스 IgGK 리더
DIQMTQSPASLAASVGETVAITCRASENIYYNLAWY QQKQGKSPQLLIYTANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSL KINSMQPEDSATYFCKQAYDVPPTFGGGTKLEIK	SC16.15 VL
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTRYWIH WIKQRPGQGLEWIGYINPTTVYTEFNQNFKDKATLT ADKSSTTASMQLSSLTSEDSAVYYCARGGSNFFDYW GQGTTLTVSS	SC16.15 VH
GGGGS	5 아미노산 링커
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGM HWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFT VSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWD KNYWGQGTMVTVSS	마젠타 하이라이트는 145-2C11 VH 임
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD SSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	145-2C11 VL
DYKDDDDK	Flag 태그

[1551]

[1552] SC16.34 DLL3HLxCD3HL(SEQ ID NO: 489)

[1553] 작제물은 SEQ ID NO: 489로 그리고 아래 표시된 바와 같이 마우스 IgGK 리더, SC16.34 VH, 15 아미노산 GS 링커, SC16.34 VL, 5 아미노산 링커, 145-2C11 VH, 15 아미노산 GS 링커, 145-2C11 VL, 및 플래그 태그를 이 순

서로 포함한다:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	마우스 IgGK 리더
QIQLVQSGPELKRPGETVKISCKASGYTFTNYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTYTGDPTYADDFKGRF AFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARIGGNSPS DYWGQGTSLTVSS	SC16.34 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAW YQQKPGQSPKLLIYYASNRYSGVPDRFTGSGYGTDF TFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK	SC16.34 VL
GGGGS	5 아미노산 링커
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGM HWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFT VSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWD KNYWGQGTMVTVSS	145-2C11 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD SSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	145-2C11 VL
DYKDDDDK	

[1554]

[1555] SC16.34 DLL3LHxCD3HL(SEQ ID NO: 490)

[1556] 작제물은 SEQ ID NO: 490으로 그리고 아래 표시된 바와 같이 마우스 IgGK 리더, SC16.34 VL, 15 아미노산 GS 링커, SC16.34 VH, 5 아미노산 링커, 145-2C11 VH, 15 아미노산 GS 링커, 145-2C11 VL, 및 플래그 태그를 이 순서로 포함한다:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	마우스 IgGK 리더
SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAW YQQKPGQSPKLLIYYASNRYSGVPDRFTGSGYGTDF TFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK	SC16.34 VL
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
QIQLVQSGPELKRPGETVKISCKASGYTFTNYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTYTGDPTYADDFKGRF AFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARIGGNSPS DYWGQGTSLTVSS	SC16.34 VH
GGGGS	5 아미노산 링커,
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGM HWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFT VSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWD KNYWGQGTMVTVSS	145-2C11 VH
GGGGSGGGGSGGGGS	15 아미노산 GS 링커
DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD SSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	145-2C11 VL
DYKDDDDK	Flag 태그

[1557]

[1558] 1.5 x 10^6 HEK293T 세포를 폴리-L-리신으로 코팅된 6-웰 플레이트에 하루 전에 평판배양하여 80% 합류도를 달성하였다. 형질주입 당일, 3 μg의 DNA를 무혈청 배지에 희석시키고 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였다. 각 시료의 세포 배양 상층액을 48시간 배양 후 수집하였다. 일부 상층액을 10 kDa 스핀 컬럼(Millipore)에서 농축시켰다.

[1559] DLL3xCD3 BiTE 인코딩 플라스미드로 형질주입된 이러한 세포의 기능성은 표면에 DLL3을 갖는 SHP77 세포(ATCC)에 대한 세포 상의 DLL3xCD3 이중특이적 T-세포 연계자의 결합에 의해 입증되었다. 500,000개의 SHP77 세포를 V-바닥 96-웰 플레이트의 웰에 시딩하였다. 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 1회 세척하였다. 세포를 형질주입되지 않은 세포 또는 BiTE로 형질주입된 세포에 상응하는 농축된 HEK 상층액을 함

유하는 50 uL PBS + 2% FBS에 재현탁시켰다. 30분 후, 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 1:100 희석의 항-Flag 비오틴(Sigma) 또는 1:200 희석의 단백질 L 비오틴(Genscript)을 함유하는 50 uL PBS + 2% FBS에 재현탁하고, 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리에 의해 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 그 후에, 세포를 스트렙타비딘 APC(Biolegend)로 1:200 희석으로 염색하고 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 배양하였다.

[1560] 세포를 1300 RPM에서 3분 동안 원심분리하여 PBS + 2% FBS로 2회 세척하고 PBS + 2% FBS에 1:6000 희석된 DAPI에 재현탁하였다. ACEA NovoCyte® 유세포분석기(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 유세포분석 데이터를 수집하고 FlowJo™ 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[1561] 아래 표는 BiTE로 염색되고 단백질 L 또는 항-Flag 항체에 의해 검출되는 세포에 상응하는 APC 양성으로 게이팅된 양성 세포의 백분율을 제공한다. SC16.56 DLL3LHxCD3HL, SC16.34 DLL3HLxCD3HL 및 SC16.34 DLL3LHxCD3HL BiTE는 모두 SHP77 세포에서 유사하게 검출되지만 다른 BiTE는 검출되지 않는다. 따라서 SC16.56 DLL3LHxCD3HL, SC16.34 DLL3HLxCD3HL 및 SC16.34 DLL3LHxCD3HL은 DLL3에 결합된다.

DLL3xCD3 이중특이적 T-세포 연계자 DLL SHP77 세포를 발현하는 세포의 결합

		단백질 L 에 의해 검출되는 SHP77 에 결합하는 %	항-Flag 에 의해 검출되는 SHP77 에 결합하는 %
비형질주입	평균 (%)	ND	ND
SC16.56 DLL3HLxCD3HL BiTE	평균 (%)	ND	ND
SC16.56 DLL3LHxCD3HL BiTE	평균 (%)	36.4	20.9
SC16.15 DLL3HLxCD3HL BiTE	평균 (%)	ND	ND
SC16.15 DLL3LHxCD3HL BiTE	평균 (%)	ND	ND
SC16.34 DLL3HLxCD3HL BiTE	평균 (%)	36.6	19.6
SC16.34 DLL3LHxCD3HL BiTE	평균 (%)	36.4	20.1

[1562]

[1563] 발현된 DLL3xCD3 이중특이적 T-세포 연계자는 또한 ELISA로 DLL3 및 CD3에 대한 결합에 대해 평가되었다. 이 ELISA는 동일한 분석에서 DLL3 및 CD3에 결합하는 올바르게 접힌 DLL3xCD3 이중특이적 T 세포 연계자를 검출하기 위해 개발되었다. 인간 DLL3(R&D Systems)을 고단백질 결합 96-웰 플레이트에 1 ug/ml의 농도로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 ELISA 차단 완충액으로 웰을 차단하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하였다. DLL3xCD3 이중특이적 T-세포 연계자를 함유하는 HEK293T 세포 배양 상층액을 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 인간 IgG Fc 접합 CD3e를 웰에 첨가하고(Acro Biosystems) 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다시 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 HRP(호스래디쉬 퍼옥시다제) 결합 항인간 항체를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 검출 시약(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), Thermo Fisher Scientific)을 웰에 첨가하였다. 황산(BioLegend)으로 효소 반응을 정지시키고 광학 밀도를 450 nm에서 판독하였다.

[1564] 아래 표는 450 nm에서의 흡광도로 표시된 이 ELISA의 결과를 제공한다. 모든 SC16.56 DLL3LHxCD3HL, SC16.34 DLL3HLxCD3HL 및 SC16.34 DLL3LHxCD3HL BiTE 항체가 검출되었으며, 이는 이러한 BiTEs 항체가 완전히 기능함을 보여준다. SC16.34 DLL3LHxCD3HL은 이 ELISA에서 가장 높은 결합을 나타내지만, 세포 상층액이 이 분석에 사용되었기 때문에 이것이 이 이중특이적 T-세포 연계자의 더 높은 농도에서 기인하는지 또는 다른 3개의 이중특이적 T 세포 연계자와 비교하여 이의 표적에 대한 더 높은 친화력에서 기인하는지 구별할 수 없다. 별도의 실험에서, ANTI-FLAG M2 친화도 겔(Sigma)을 사용하여 이중특이적 T 세포 연계자를 정제하고 이 ELISA에서 실행하였다. SC16.34 DLL3LHxCD3HL은 ELISA 신호를 배경을 능가하여 나타내는 유일한 정제된 BiTE였다.

ELISA 에 의한 BiTE 결합

	450 nm 에서의 흡광도	
	평균	± SD
비형질주입	0.010	0.001
SC16.56 DLL3HLxCD3HL BiTE	0.007	0.002
SC16.56 DLL3LHxCD3HL BiTE	0.175	0.051
SC16.15 DLL3HLxCD3HL BiTE	0.002	0.001
SC16.15 DLL3LHxCD3HL BiTE	0.001	0.002
SC16.34 DLL3HLxCD3HL BiTE	0.253	0.026
SC16.34 DLL3LHxCD3HL BiTE	1.458	0.089

[1565]

[1566] **실시예 43**

[1567] **항-CTLA-4 scFv-Fc는 CD80/CTLA-4 및 CD86/CTLA-4 상호작용의 차단을 실증하고 인간 STING N154S/R284G tazCTT를 공동발현시킨다**

[1568] 인간 CTLA-4에 특이적인 scFv-Fc(각각 핵산 및 단백질 서열에 대해 SEQ ID NO: 427 및 428 참조)는 이필리무맙의 아미노산 서열을 사용하여 설계하였다. 이필리무맙은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 완전 인간 IgG1κ 모노클로날 항체(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2002/0086014 및 미국 특허 번호 6,984,720에서 10D1로 표기된 항체 참조)로, CD80(B7.1 또는 B7-1이라고도 함) 및 CD86(B7.2 또는 B7-2라고도 함)과의 CTLA-4와 면역 저해제 상호작용을 차단한다.

[1569] 이필리무맙 scFv 항체 단편(SEQ ID NO: 429 참조)을 생성하기 위해, 이필리무맙의 가변 경쇄(V_L) 및 가변 중쇄(V_H)를 20개 아미노산 길이의 글리신-세린(GS) 링커($(GGGGS)_4$)와 연결하였다. scFv-Fc 항체 단편(SEQ ID NO: 428 참조)을 생성하기 위해, 이필리무맙 scFv의 가변 중쇄를 힌지 영역에 있는 유리 시스테인의 세린으로의 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc에 연결하였다(SEQ ID NO: 428에서 위치 272). 리더 서열(METPAQLLFLLLLWLPDTTG; SEQ ID NO: 428의 잔기 1-20에 상응함)은 인간 면역글로불린 카파 가변 3-20(IGKV3-20) 단백질의 서열에서 유래되었다. 서열은 GenScript GenSmart™ 코돈 최적화 도구(ATGGAGACACCTGCCCAGCTGCTGTTCCTGCTGCTGCTGTGGCTGCCCGACACCACCGGC)를 사용하여 인간에 대해 코돈 최적화되었고; 서열은 SEQ ID NO: 491로 표시되어 있다.

[1570] 항-CTLA-4 scFv-Fc의 중화 능력은 CTLA-4와 이의 리간드, CD80 및 CD86 사이의 상호작용을 차단하는 항체 단편의 능력을 측정하기 위해 경쟁적 ELISA를 사용하여 결정되었다. HEK293T 세포를 적절한 시약:DNA 비율로 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)을 사용하여 항-CTLA-4 scFv-Fc 항체 단편 작제물을 인코딩하는 3 마이크로그램의 DNA로 형질주입하였다. 형질주입 48시간 후, HEK293T 무세포 배양 상층액을 수합하고, 여과하고, 경쟁 ELISA에 사용하여 항-CTLA-4 항체 단편의 차단 활성을 평가하였다.

[1571] 경쟁적 ELISA를 위해 인간 CD80 또는 CD86 재조합 단백질(R&D Systems)을 고단백질 결합 96-웰 플레이트에서 100 ng/ml의 농도로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 ELISA 차단 완충액으로 웰을 차단하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하였다. 각각의 항-CTLA-4 항체 단편을 포함하는 HEK293T 세포 배양 상층액을 10 ng/ml의 재조합 인간 CTLA-4-인간 IgG1 Fc 키메라(R&D Systems)와 혼합하고 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 HRP(호스래디쉬 퍼옥시다제) 결합 항-인간 IgG1 항체를 웰에 첨가하고(Jackson ImmunoResearch), 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 검출 시약(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), Thermo Fisher Scientific)을 웰에 첨가하였다. 황산(BioLegend)으로 효소 반응을 정지시키고 광학 밀도를 450 nm에서 판독하였다.

[1572] 경쟁 ELISA의 결과는 아래 표에 요약되어 있다. 항-CTLA-4 scFv-Fc는 CTLA-4와 CD86의 결합을 94.14% 차단하고 CTLA-4와 CD80의 결합을 83.46% 차단하였다. CTLA4 scFv-Fc는 CD80/CTLA-4 차단 활성과 비교하여 더 높은 정도의 CD86/CTLA-4 차단 활성을 가졌다.

경쟁적 ELISA 결과

		% CD86 차단 활성	% CD80 차단 활성
인간 항-CTLA-4 scFv-Fc	평균 (%)	94.14	83.46
	± SD	0.25	0.32

[1573]

[1574] 인간 항-CTLA4 scFv-Fc(SEQ ID NO: 427)는 혈관 내피 성장 인자 및 유형 1 콜라겐 유도적 단백질(VCIP) IRES를 포함하거나 포함하지 않는 huSTING N154S/R284G tazCTT를 사용하여 발현 벡터로 클로닝되었다. HEK293T STING Null Cells(293-DualTM Null Cells; InvivoGen)를 사용하였는데, 이는 내인성 STING을 함유하지 않고 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP)를 발현하며 내인성 IFN-자극 반응 요소(ISRE) 프로모터의 제어 하에 놓였으며, 여기서 ISRE의 코딩 서열은 녹인 기술을 사용하는 SEAP ORF로 대체된다. 따라서 STING 활성은 유형 I IFN 유도 SEAP 생산을 모니터링하여 평가된다. 293-DualTM Null Cells는 또한 내인성 IFN-β 프로모터의 제어를 받는 분비 루시퍼라제인 Lucia™ 루시퍼라제를 발현한다; IFN-β의 코딩 서열은 녹인 기술을 사용하여 Lucia™ 루시퍼라제 ORF로 대체되었다. 이를 통해 IFN-β의 발현을 모니터링하여 STING 활성을 평가할 수 있다. 이러한 세포를 사용하여 STING 활성은 ISRE 유도 SEAP 생산 및/또는 Lucia™ 루시페라아제의 IFN-β 의존적 발현을 모니터링하여 평가할 수 있다. 2개의 리포터 단백질인 SEAP 및 Lucia™ 루시퍼라제는 각각 QUANTI-Blue™ 및 QUANTI Luc™ 검출 시약(InvivoGen)과 같은 표준 분석 및 검출 시약을 사용하여 세포 상층액에서 측정할 수 있다.

[1575] 세포를 웰당 200,000개의 세포로 폴리-L-리신으로 코팅된 24-웰 플레이트에 시딩하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 밤새 인큐베이션하여 80% 합류도를 달성하였다. 이튿날 각 플라스미드 DNA 300 ng과 CMV-GFP 벡터(즉, CMV 프로모터의 제어 하에 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 벡터) 40 ng을 무혈청 배지에 희석시키고 FuGENE® 형질주입 시약(Promega)에 적절한 시약:DNA 비율로 첨가하였으며, 이때 형질주입되지 않은 웰이 음성 대조군으로서 역할을 하였다(2벌 중복). 각 시료의 세포 배양 상층액을 형질주입후 48시간째에 수집하였다.

[1576] huSTING N154S/R284G tazCTT 변이체의 STING 활성은 ISRE-SEAP 및 IFN-β-Lucia™ 리포터 시스템을 사용하여 평가되었다. 유형 I 인터페론(IFN) 활성(STING에 의해 유도됨)은 세포 상층액에서 유형 I IFN-자극된 SEAP 생산을 모니터링함으로써 평가되었다. SEAP 측정에 사용되는 QUANTI-Blue™ 시약(InvivoGen) 180 μL에 세포 배양 상층액 20 μL를 첨가하였다. 유형 I 인터페론 활성화는 650 nm의 흡광도 파장에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)에서 ISRE 유도 SEAP 활성을 측정하여 결정되었다. 유형 I 인터페론(IFN) 활성(STING에 의해 유도됨)은 또한 세포 상층액에서 유형 I IFN-자극된 Lucia™ 루시페라제 생성을 모니터링함으로써 평가되었다. Lucia™ 루시퍼라제 활성 측정에 사용되는 QUANTI-Luc™ 시약(InvivoGen) 50 μL에 세포 배양 상층액 20 μL를 첨가하였다. 유형 I 인터페론 활성화는 발광 설정에서 SpectraMax® M3 분광광도계(Molecular Devices)에서 IFNβ-유도된 Lucia™ 루시퍼라제 활성을 측정하여 결정되었다.

[1577] 세포 배양 상층액을 또한 인간 CTLA4 scFv-Fc의 발현에 대해 평가하였다. 인간 CTLA4(R&D Systems)를 고단백질 결합 96-웰 플레이트에 1 ug/ml의 농도로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 ELISA 차단 완충액로 웰을 차단하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하였다. 항-CTLA4 scFv-Fc를 함유하는 HEK293T 세포 배양 상층액을 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고, HRP(호스래디쉬 퍼옥시다제)-접합 항-인간 항체를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후에, 웰을 PBS 0.05% Tween-20으로 3회 세척하고 검출 시약(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), Thermo Fisher Scientific)을 웰에 첨가하였다. 황산(BioLegend)으로 효소 반응을 정지시키고 광학 밀도를 450 nm에서 판독하였다.

[1578] 인간 항-CTLA4 scFv-Fc + hSTING N154S/R284G tazCTT 구조의 발현 결과는 아래와 같다. 두 페이로드를 모두 포함하는 작제물은 각 단백질의 발현을 유지하였다. 인간 항-CTLA4 scFv-Fc T2A hSTING N154S/R284G tazCTT 작제물은 VCIP IRES 없이 더 나은 STING 활성을 가졌다. 항-CTLA4 scFv-Fc의 발현은 VCIP IRES가 없는 작제물로부터의 ELISA에 의해 더 높았으며, 이는 개별 표적이 개선된 발현을 위해 고유한 요소를 요구할 수 있음을 실증한다.

형질주입 효율에 의해 정규화된 인간 항-CTLA4 scFv-Fc + STING 발현

	ISRE-SEAP (흡광도 / %GFP)		IFNβ-Lucia (발광 / %GFP)		Hu 항-CTLA4 scFv-Fc (흡광도 / %GFP)	
	평균 (%)	± SD	평균 (%)	± SD	평균 (%)	± SD
비형질주입	ND	ND	ND	ND	ND	ND
hu 항-CTLA4 scFv-Fc	0.00006	0.00003	0.13	0.029	0.129	0.006
VCIP hu 항-CTLA4 scFv-Fc	0.0001	0.00008	ND	ND	0.080	0.009
huSTING N154S/R284G tazCTT	0.095	0.005	17.567	2.859	ND	ND
hu 항-CTLA4 scFv-Fc T2A hSTING N154S/R284G tazCTT	0.063	0.004	6.698	0.222	0.028	0.001
VCIP hu 항-CTLA4 scFv-Fc T2A hSTING N154S/R284G tazCTT	0.050	0.005	5.213	0.191	0.017	0.00003

[1579]

[1580] **실시예 44**

[1581] **대식세포의 박테리아 균주 감염은 MHC-I 분자에 의한 면역원성 펩타이드의 제시를 허용한다**

[1582] 이 실시예는 본원에 제공된 박테리아가 mRNA 전달 또는 플라스미드 DNA 전달로 항원 제시 세포를 박토펙트하고, 그 결과 발현된 생성물이 항원 제시 세포에 의해 제시됨을 보여준다. 이 증명에 사용된 항-SIINFEKL/H-2Kb 항체는 IC21 세포의 표면에서 MHC-1(H-2Kb)에 의해 제시될 때만 오브알부민 SIINFEKL[SEQ ID NO: 492] 펩타이드에 특이적으로 결합한다. 이는 STING + IL-15 수용체 복합체 + 암 항원을 인코딩하는 것과 같은 본원에 제공된 백신 균주가 면역 부재 종양을 치료할 수 있고, 네오아쥬반트 환경에서 암 백신으로 사용될 수 있고, 또한 예방적 백신화를 위한 병원성 항원을 제시하는 플랫폼으로서 사용될 수 있고, 예를 들어 MRSA, 만성 바이러스 간염 감염, 만성 피. 긴기발리스, HIV 및 다른 만성 감염, 뿐만 안리ㅏ 급성 감염과 같은 병원체 감염에 대한 치료제로 사용될 수 있음을 실증한다.

[1583] 위의 설명에서, 이 실시예의 실험은 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD*로 표기된 예시적인 균주에 의한 항원 제시 세포의 감염이 어떻게 주조직적합성 복합체 부류-I(MHC-I)에 의한 $CD8^+$ T 세포로의 면역원성 펩타이드의 제시를 유도하는지를 보여준다. 뇌심근염 바이러스(EMCV) 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 따르거나 따르지 않고 진핵생물 CMV 프로모터 및 원핵생물 MTL 프로모터 하에 닭 오브알부민을 인코딩하는 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주가 생성되었다. 닭 오브알부민은 모델 항원이고, 닭 오브알부민으로부터 유도된 면역-우성 SIINFEKL 펩타이드는 항원 제시 세포의 표면에서 마우스 H-2Kb MHC-I 분자에 의한 제시에 대해 모니터링되었다. 뮤린 복막 대식세포 세포주 IC21(ATCC)을 검정에서 항원 제시 세포로 사용하였다.

[1584] 96웰 편평한 바닥 플레이트의 웰당 50,000개의 IC21 세포를 100 ul RPMI 10% FBS에 시딩하고 37℃ 및 5% CO_2 인큐베이터에서 밤새 두었다. 이튿날, IC21 세포를 CMV 또는 MTL 프로모터의 조절 하에 닭 오브알부민을 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 YS1646*Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD* 균주로 감염시켰다. 배양된 세포에 박테리아 균주를 첨가하고 플레이트를 500 g에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다. 그 후에, 세포를 37℃에서 1시간 동안 배양하고 50 ug/ml의 최종 농도가 되도록 겐타마이신을 포함하는 배양 배지를 첨가하였다. 감염된 세포를 37℃ 및 5% CO_2 인큐베이터에서 7시간 동안 방치하였다. 감염 7시간 후, PBS 10 mM EDTA를 사용하여 IC21 세포를 탈착하고 항-뮤린 F4/80 APC-접합 항체 및 항-SIINFEKL/H-2Kb PE-접합 항체(둘 다 Biolegend)로 염색하고, ACEA Novocyte 유세포분석기를 사용하여 데이터를 획득하였다.

[1585] 항-SIINFEKL/H-2Kb 항체는 IC21 세포의 표면에서 MHC-1(H-2Kb)에 의해 제시될 때만 오브알부민 SIINFEKL 펩타이드에 특이적으로 결합한다. 감염 7시간 후 IC21 세포에 의한 H-2Kb/SIINFEKL 제시에 대한 평균 형광 강도를 측정하였다. 결과는 감염되지 않은 세포에 대해 오브알부민 인코딩 균주로 처리된 군에서 관찰된 순 평균 형광 강도(Net MFI)를 보여주는 아래 표에 제시되어 있다.

처리	비감염을 능가하는 순 평균 형광 (순 MFI)	SEM*
비감염	0	NA
CMV-오브알부민	606	54
MTL-IRES-오브알부민	632	3.5
MTL-오브알부민	384.5	42

*SEM = 평균의 표준 오차

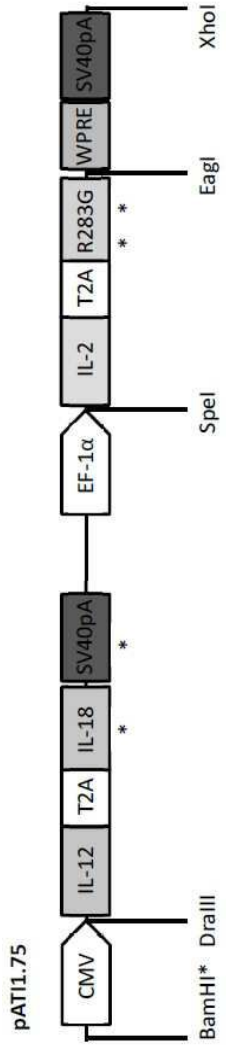
[1586]

[1587] 이 실시예는 YS1646 *Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD*와 같은 균주가 항원 제시 세포에 의해 처리되고 전달 시 $CD8^+$ T 세포에 제시되는 항원을 전달하여, 병원체 또는 암세포와 관련이 있거나 이로부터의 항원에 대한 T 세포 특이적 반응을 일으키는 능력을 보여준다.

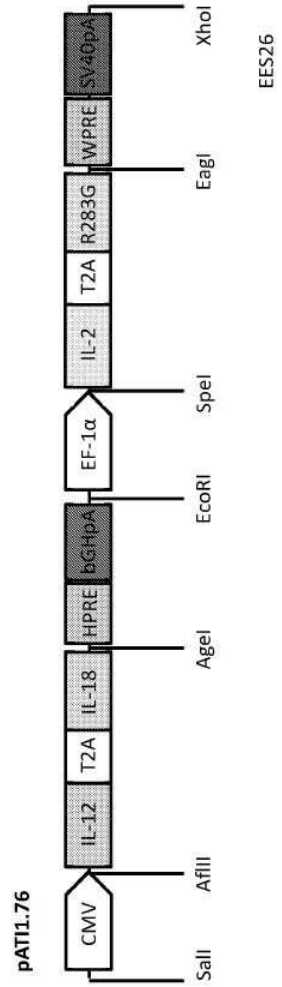
[1588] 변형이 당업자에게 명백할 것이기 때문에, 본 발명은 첨부된 청구범위에 의해서만 제한되는 것으로 의도된다.

도면

도면1a



도면1b


pATI1.76
CMV
IL-12
T2A
IL-18
HPRE
bGHpA
EF-1α
IL-2
T2A
R283G
WPRE
SV40pA
SalI
AflII
AgeI
EcoRI
SpeI
EagI
XhoI
EES26

도면1c


ADN-457 pATI1.76 CMV muIL-36γ DelCyt T2A muIL-12p70 P2A muOX40L HPRE bGHpA
AflII
AfeI
NheI
BmtI
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCTTAAGCGCTAGCGATTACGCCAAGCTCGGCCACCATGTATTCAATGCAACTTG
TGCGTTTACCCGCCATCCGCACATGCCACCCTCCAGATATATTCGTCTCTCGACCAAATCACTTGGCAGAATTCGCGATCGCTAATGCGGTTCGAGCCGGTGGTACATAAGTTACGTTGAAC
CMV 프로모터
1
M Y S M Q L
5
mIL-2 신호 서열
코작 서열

도면2

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 태즈메이니아 데빌 STING (SEQ ID NO:349):

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
                ||.|.||||||.|||.||||||.||||.|:..::.|||....||::|:.:
태즈메이니아      1 MPRSHLHPSIPQPRGWGAQKAACVLLSLCMAAVYILGESAAFTLQWLLFY   50

인간         51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
                ..::|:|||||.|...|||||.||.||::||||:.:::||:..|.:|.:|||
태즈메이니아     51 FTTVQVGLLLKGAYCLAEELYHIQSRHQGSYWQAIQACIHYPFQRISLLL  100

인간        101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  150
                ||.|||.:|.|...|..||..||||||.||:.:|||:.|..||||.||||
태즈메이니아     101 LSGYFYVTLSNKPNPSLTWTFALLGLSHALSFILGLQNLTSAEISEVCEK  150

인간        151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI  200
                .:.|||||||||||||:||||.||.||:.|||...::||.....||:|
태즈메이니아     151 RHLNVAHGLAWSYYIGYLKLILPGLQTRIQIYNQFNKDVLRSPEGHRLHI  200

인간        201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN  250
                |:||||.||||||.|||||:||.:|||...|.||||.|:|:||||::.|:
태즈메이니아     201 LIPLDCSVPDNLSQADPNIQFLQELPQHKLDRAGIKGRIYTNSIYKISED  250

인간        251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300
                ||.|..||||:||||||||||||.::|||||||||||||||||||||||.
태즈메이니아     251 GQPAEVCVLEFATPLQTLFAMSQDARAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILE  300

인간        301 DAPESQNNCRLIAYQEPADD--SSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKT  348
                ||||:::.|||:.||||.|.  |:||||:|:|||||||.:||..:|..:.
태즈메이니아     301 DAPEARDCCRLVVYQEPEDKAVSNFSLSKEILRHLRQERQEEFAIGPKRA  350

인간        349 SAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTD-FS   379
                ..|.::||:||||:||||||||:||.|||| |
태즈메이니아     351 MTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF-   381
```

도면3

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 마모셋 STING (SEQ ID NO:359):

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
                ||||||||||.|||||||:|||||||.||||||.|.|.||..||:||||
마모셋          1 MPHSSLHPSIPHPRGHGAQEAALVLLSVCLVTLWWLREAPEDILRFLVLH   50

인간         51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
                ||||||||||.:|||||||||:|:||:|||||.||||||||:|.||.||
마모셋         51 LASLQLGLLLNRLCSLAEELRHVHTRYQGSYWRAVRACLGCPIRLGAQLL  100

인간        101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  150
                ||||||..|||  |.|||||||||.||||||||||||||||||||||||||
마모셋         101 LSIYFYCFLPN--GRPFTWMLALLGFSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  148

인간        151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI  200
                .||||||||||||||||||..||||||||||.||:|||..||||||
마모셋         149 RNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGFQARIRTYNQHNNNVLRGPASQRLYI  198

인간        201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN  250
                |.||||||||||.||||||||||||||:|.|.|||||.|||:|||||||||
마모셋         199 LFPLDCGVPDNLSTADPNIRFLDKLPQETIDRAGIKGRVYTNSIYELLEN  248

인간        251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300
                |||||.|||||:||||||||||.||||||||||||||||||||||||||||
마모셋         249 GQRAGACVLEYASPLQTLFAMSQYGQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  298

인간        301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA  350
                ||||||||||||.|:||||.|||.||||||:||||||:||||||||||||.
마모셋         299 DAPESQNNCRLIVYEEPADGSSFLLSQEVLQHLRQEEEEEVTVGSLKTSE  348

인간        351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                |||||||||||||||||||||||||:|..
마모셋         349 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLF   377
```

도면4

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 소 STING (SEQ ID NO:360):

```
인간      1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
            ||||||||||.|||..|||||||||||||.||||||||::||::||||
소        1 MPHSSLHPSIPQPRGLRAQKAALVLLSACLVALWGLGEPPDYTLKWLVLH   50

인간     51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
            |||.|:|||:.|:|||||||.|:||||.|||||.|||||...:|.|||||
소       51 LASQQMGLLIKGICSLAEELCHVHSRYHGSYWRAVRACLCSSMRCGALLL  100

인간    101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  150
            ||.|||.||||....|||||||||||||||||:||||||:||:|||
소      101 LSCYFYCSLPNMADLPFTWMLALLGLSQALNILLGLQGLAPAEVSAICEK  150

인간    151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI  200
            .|||||||||||||||||||.|.|||:.|||.:|||.|:|||.|.||:|
소      151 RNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLPARIQIYNQFHNNTLQGAGSHRLHI  200

인간    201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN  250
            |.||||||||:|::||||||||.:||||:.|.||||.|||:|||||||||
소      201 LFPLDCGVPDDLNVADPNIRFLHELPQQSADRAGIKGRVYTNSIYELLEN  250

인간    251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300
            |||||.|||||||||||||||..:|||||||||||||||||||||||||
소      251 GQRAGVCVLEYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300

인간    301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA  350
            :||||||||||.|||||:.||||||||:|:||||||: |||:||.:|||.
소      301 NAPESQNNCRLIVYQEPAEGSSFSLSQEILQHLRQEER-EVTMGSTETSV  349

인간    351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
            :|.:|.:||||||||||:|||||||:|..
소      350 MPGSSVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF   378
```

도면5

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 고양이STING (SEQ ID NO:356):

```
인간      1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
            ||.:.||||||.|||.||||||||||:.||..||.|||.|:|||||||||
고양이    1 MPRTGLHPSIPRPRGMGAQKAALVLLAVCLAALWRLGESPDHTLRWLVLH   50

인간     51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
            |||||||||..|||.|.|||.|:||||:|||||.::|||||.|:|.|||||
고양이    51 LASLQLGLLFTGVCHLTEELCHLHSRYQGSYWRAMKACLGSPVRSGALLL  100

인간    101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  150
            ||.|||.:|| :...|||||||||||||||||.|:||||||:||||||
고양이    101 LSCYFYSTLP-STDLPFTWMLALLGLSQALNILLDLQGLAPAEVSAVCEK  149

인간    151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI  200
            .|||||||||||||||||||.|.||:.|.||.:|||:|||..|.||:|
고양이    150 KNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLPARVLTCNQLHNNILRGTGSHRLHI  199

인간    201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN  250
            |.|||||||::|:||||||||.:||||:.|.||||.|||:||:|.||||
고양이    200 LFPLDCGVPDDMSVADPNIRFLYELPQQSADRAGIKGRVYTNSVYALLEN  249

인간    251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300
            ||:||.|||||||||||||||..:|||||||||||||||||.||||||
고양이    250 GQQAGICVLEYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLEQAKLFCRILEDILA  299

인간    301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA  350
            |.||.|||||||.||||.:.|:||||||:||||||: ||||||:.||.
고양이    300 DTPECQNNCRLIVYQEPEEGSNFSLSQEILRHLRQEER-EVTVGSVGTSM  348

인간    351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
            |.:.|.:|||||.|||||||:|||||||..
고양이    349 VRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVF   377
```

도면6

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 타조 STING (SEQ ID NO:361):

```
인간          1 MPHSSLHPS------IPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTL   44
                |.|.|..||      ||..|...||.||.|||:.|...|:..|||..|..
타조          1 MAHESGTPSNPATPLIPKAREGRAQHAAYVLLALCAAALYLAGEPVVHIA   50

인간         45 RYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLR   94
                |....|..:||:|.||.|:|.|.||:.|:.:|:|||:.|.:.|||  .||
타조         51 RSFTSHFVALQIGALLKGICYLVEEIFHLETRHRGSFRRALSACL--HLR   98

인간         95 -RGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAE  143
                 ...|||:....|.:|.:....|....|.|..|.|.|.:.|||...:..|
타조         99 WHVTLLLVCGSAYVALLDGDEQPLGLHLGLACLCQLLILALGLHKPSAVE  148

인간        144 ISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGA  193
                ||.:.|:...||||||||||:|||::::||.|:..:....:...|:|...
타조        149 ISEMSERSKQNVAHGLAWSYYVGYLKIVLPRLKESMENIGRTNPNMLAHK  198

인간        194 VSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNS  243
                .:.:|:|||:||.|.:.|:|..||.||::...||:.|...||.|.|||.|:
타조        199 ETWKLHILVPLSCNICDDLEKADSNIQYAMDLPETTLTRAGTKKRVYRNT  248

인간        244 IYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCR  293
                :|: :::..:...||:|||||||:|:||||...|.||||||:||||||.|
타조        249 LYK-IKDEDKFRFCVVEYATPLQSLYAMSQDECAAFSREDRIEQAKLFYR  297

인간        294 TLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTV  343
                |||:||..|.|.....|||.|:|..:..:..||:|:||||:|:.:||.||
타조        298 TLEEILQSAKECAGTYRLIVYEESGEAETHFLSREILRHLQQQRQEEYTV  347

인간        344 --GSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                  |:|          .|.:..|.||..:.|.|||:|..
타조        348 CDGTL----------CSTDLSLQISESDLPQPLRSDCL   375
```

도면7

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 따오기 STING (SEQ ID NO:362):

```
인간          1 ---MPHSSLHPS---IPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTL   44
                   .|....||:   ||..||..||.|..:||:.|...|:..|||...:.
따오기        1 MSQEPQWLSHPTALLIPKARGGRAQHAVYLLLALCAAVLYLAGEPLVPSA   50

인간         45 RYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLR   94
                |.|:.|..:||:|:||.|.|.||||:.|:.||:.||:||.:.||.  |||
따오기       51 RSLISHFMALQIGVLLKGTCYLAEEIFHLQSRHHGSFWRALSACF--PLR   98

인간         95 RGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEI  144
                ...|:||.....|......|.|...|.|..|.|.|.:.|||...:..|:
따오기       99 WHGLMLLVCGSAYVALLEDGQPLGLHLGLASLCQLLILALGLHKPSAVEM  148

인간        145 SAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAV  194
                |.:.|:...||||||||||:|||:::||.::..:..:::...|:|....
따오기      149 SEMSERSKQNVAHGLAWSYYVGYLKIVLPRVKKSMEEFSRANPNVLARRE  198

인간        195 SQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSI  244
                :.:|:||:||.|.|.|:|..||.||::|..||:.|...||.|.|||.:|:
따오기      199 TWKLHILVPLSCDVYDDLEKADSNIQYLMDLPETTLTRAGTKKRVYKHSL  248

인간        245 YELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRT  294
                |.:.:.|.:...|.:|||||||:|:|||...|.||||||||||||.||
따오기      249 YTIRDEGNKLWHCAVEYATPLQSLYAMSQDEYAAFSREDRLEQAKLFYRT  298

인간        295 LEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVG  344
                ||:||..:.|.....|||.|:|..:..:.|||:::|.||||:..||.||.
따오기      299 LEEILKGSKECAGTYRLIVYEESGEAETHSLSRDILWHLRQQCHEEYTVY  348

인간        345 SLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                .......|||:..|.|..|.||..:.|.|||:|.
따오기      349 EGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQPLRSDC-   382
```

도면8

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 실러캔스 (SEQ ID NO: 363을 갖는 변이체) STING:

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
                ....::...||.|||:.|.:.|..:::..|:.||.....::.|..:.||
실러캔스      1 FGLQNMSAIIPQPRGNRANQMAYFIITVILMLLWIFRNIMDNVLEVIALH   50

인간         51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
                :..||...::.|:|:.|||:.|:..||.||||:.:.|||.........::
실러캔스     51 ILLLQGAAIMKGICNFAEEVNHVQPRYGGSYWKALEACLNLSKYDVMKIV  100

인간        101 LS--IYFYYSLPNAVGPPFTWMLALL--GLSQALNILLGLKGLAPAEISA  146
                .:  :::::|....|    .|.|.||  .|...||.:||:...:|.|:|.
실러캔스    101 FAGVLWWHFSSSLFV----VWFLHLLVSCLCHLLNNVLGVLKPSPVEVSE  146

인간        147 VCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQ  196
                :.|:....||||||||||:|||:|:||||:.||::||..:.|||:...:.
실러캔스    147 IYERNRIGVAHGLAWSYYLGYLKLVLPELEDRIKSYNVSHGNLLKHKETW  196

인간        197 RLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYE  246
                ||:|||||.|.:.|||:..|.||.|||.|.:...:.||||.|.|.:|:|:
실러캔스    197 RLHILLPLSCSIFDNLADVDSNIEFLDNLSELQINRAGIKGRSYKHSLYQ  246

인간        247 LLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLE  296
                :|:..:|...|:|||||||::|..||:.:.|.|::|||||.|||.|||:
실러캔스    247 VLDEDKRPHYCILEYATPLKSLLEMSKEASAEFTKEDRLEQTKLFYRTLK  296

인간        297 DILADAPESQNNCRLIAY--QEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVG  344
                |||.::.|.:...||:.|  :|.:..|.| ||:|:||||.|::|||..:.
실러캔스    297 DILDNSQECRGRFRLVIYDGREDSGKSHF-LSKELLRHLNQQQKEEYFMS  345

인간        345 SLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                ........|||.:|.||:|:||..:.|..|:....
실러캔스    346 EQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVC   380
```

도면9

인간 STING (SEQ ID NO:306) 및 제브라피쉬 STING (SEQ ID NO:348):

```
인간          1 ---------MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPE   41
                         :|.:.....:.|..|.|    .|.|..|.|:......|
제브라피쉬    1 MSVMGEDALVPRARSRLPVMCAAGLG----FLTLAVAWLLDSDKFSE---   43

인간         42 HTLRYLVLHLASLQLGLLLNG----VCSLAEELR-HIHSRYRGSYWRTVR   86
                    ....:..||:|..    :|.|||||. |...||.|......|
제브라피쉬   44 --------RAGIIAFGLMLERFIYCICLLAEELLFHSRQRYHGRMSEIFR   85

인간         87 ACLGCPLRRGA--LLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQAL----  130
                ||.     ||:  |.:.:|:.              ||.|.|:|.::
제브라피쉬   86 ACF-----RGSGILGMCAIFL--------------MLMLGGVSFSVKQWS  116

인간        131 --NIL---------LGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLR  169
                  |::          ||:.|.||.|||.:||....|||||||||:|||||:
제브라피쉬  117 HFNLMCAGYMLLNSLGVLGPAPVEISEICEAKKMNVAHGLAWSFYIGYLK  166

인간        170 LILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNI  219
                .:||.|:..:|.|::.     ....|.||:|||||:..||......|.|:
제브라피쉬  167 FLLPALEVNVREYSRR-----ERLSSPRLHILLPLNARVPSKPEEEDTNV  211

인간        220 RFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLF  269
                .|.:.||....|.||::.|.|:||:|::..|.: ..:|:|||||||.||:
제브라피쉬  212 VFHENLPDLKLDRAGVRKRSYTNSVYKITHNNE-TFSCILEYATPLLTLY  260

인간        270 AMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPAD  319
                .|||.|.|||...:|.:|..||.|||..||.::.|.:|..|||...:...
제브라피쉬  261 QMSQESSAGFGERERKQQVLLFYRTLSQILDNSLECRNRYRLILLNDEHT  310

인간        320 DSSFSLSQEVLRHLRQEE--------------KEEVTVGSLKTSAVPST-  354
                .....||:|:.::|:|::               .||..||:. ..|:.:|
제브라피쉬  311 GDPHYLSRELFQNLKQQDGEIFMDPTNEVHPVPEEGPVGNC-NGALQATF  359

인간        355 --STMSQEPELLISGMEKPLPLR------TDFS---------   379
                  ..||.||.|:.|   :|..||      ||:.
제브라피쉬  360 HEEPMSDEPTLMFS---RPQSLRSEPVETTDYFNPSSAMKQN   398
```

도면10

인간 STING (SEQ ID NO:305) 및 야생돼지 STING (SEQ ID NO:365):

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
                ||:||||||||.|||..||.||||||.||||.||||||.||:|||:||||
야생돼지      1 MPYSSLHPSIPQPRGLRAQVAALVLLGACLVALWGLGELPEYTLRWLVLH   50

인간         51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
                |||.|:|||:.|:||||||||.|:||||:.||||..|||||||:|.|||||
야생돼지     51 LASQQIGLLVKGLCSLAEELCHVHSRYQSSYWRAARACLGCPIRCGALLL  100

인간        101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  150
                ||.|||:|:.:..|.|..||||||||||||||||:.|||||:||:|||
야생돼지    101 LSCYFYFSIRDKAGLPLPWMLALLGLSQALNILLGLQHLAPAEVSAICEK  150

인간        151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI  200
                .||||||||||||||||||||.|:|||:.|||.:.|:|.|..:.||:|
야생돼지    151 RNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLRARIQAYNQRHKNVLGGIGNHRLHI  200

인간        201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLEN  250
                |.||||||||:||:||||||||.:||||:.|||||.|||:|||||||||
야생돼지    201 LFPLDCGVPDDLSVADPNIRFLHELPQQSADRAGIKGRVYTNSIYELLEN  250

인간        251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300
                ||.||.|||.||||||||||||..:|||||||||||||||||||||||||
야생돼지    251 GQPAGVCVLGYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300

인간        301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA  350
                ||||:|||||||.||||.:.:.|||||||:||||||||: |||:||.:||.
야생돼지    301 DAPEAQNNCRLIVYQEPTEGGSFSLSQEILRHLRQEER-EVTMGSAETSV  349

인간        351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                ||::||:||||||||||||:|||||:|..
야생돼지    350 VPTSSTLSQEPELLISGMEQPLPLRSDIF   378
```

도면11

인간 STING (SEQ ID NO:305) 및 박쥐 STING (SEQ ID NO:366):

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQK-AALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVL   49
                |.|||||||:|.|||..|:. ||.|||..||..||..|:|.|:|||.|||
박쥐          1 MSHSSLHPSVPRPRGRRARNIAAFVLLIVCLAALWLSGKPSEYTLRCLVL   50

인간         50 HLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALL   99
                ||||.|||||.|.||.||||||.||||||:|:|||.|||||.||:|.|.:|
박쥐         51 HLASQQLGLLSNRVCYLAEELSHIHSRYQGNYWRAVRACLSCPIRFGVVL  100

인간        100 LLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCE  149
                |:|.:||.||||....|.|||||.||||:||||||||:||.|||:|.|||
박쥐        101 LVSFFFYTSLPNIDDLPLTWMLAHLGLSEALNILLGLRGLTPAEVSTVCE  150

인간        150 KGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLY  199
                :.:||||||||||||||||||.|:||||.||||.:.|.|:|..|.|||
박쥐        151 QRHFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLRARIHTYNQLHGNTLQGVGSHRLY  200

인간        200 ILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLE  249
                ||.||||||.|:||.||||||||.:|||:|:.||||||:|||:||:|||||
박쥐        201 ILFPLDCGVLDDLSAADPNIRFLRELPRQSSDRAGIKNRVYTNSVYELLE  250

인간        250 NGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDIL  299
                .|:..||||||||||||||||.::|||||:||||||||||||||.|||
박쥐        251 KGKPVGTCVLEYATPLQTLFAMSQDARAGFSQEDRLEQAKLFCRTLADIL  300

인간        300 ADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTS  349
                ||.||||.:||||.||||.::|.|||||.:|:||||||||||||::.|.
박쥐        301 ADDPESQKSCRLIVYQEPTEESDFSLSQAILKHLRQEEKEEVTVGTVGTY  350

인간        350 AVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                ..|.:||:.|||||||||::|||||||..
박쥐        351 EAPGSSTLHQEPELLISGMDQPLPLRTDIF   380
```

도면12

인간 STING (SEQ ID NO:305) 및 바다소 STING (SEQ ID NO:367):

```
인간          1 ---MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYL   47
                   ||||||||||..||||.||||.|||.||||.||.|||||.|||::|
바다소        1 MVEMPHSSLHPSIPRHRGHGIQKAAFVLLVACLVALWELGEPPGHTLQWL   50

인간         48 VLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGA   97
                |..||||||||||..:|||||||.|:||||:.||||.||||:|||:||||
바다소       51 VCQLASLQLGLLLKVICSLAEELCHVHSRYQSSYWRAVRACMGCPIRRGA  100

인간         98 LLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAV  147
                |||||.|||:..||....|.||.||||||.||:||||.|:||.||||||:
바다소      101 LLLLSCYFYFCFPNMADLPLTWTLALLGLLQAMNILLSLQGLTPAEISAI  150

인간        148 CEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQR  197
                |||.|.||||||||||||||||||.||.|||.||..:||:|||..|||
바다소      151 CEKRNLNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLQDRIRIYNLQHNNMLRGTGSQR  200

인간        198 LYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYEL  247
                |:||.|||||||::||:||.|||||.|||||:.|.||||.|||:||:|:|
바다소      201 LHILFPLDCGVPNDLSVADANIRFLQKLPQQSADCAGIKGRVYTNSVYQL  250

인간        248 LENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLED  297
                ||:||.||.|||||||||||||||..:|||||||||||||||||||||||
바다소      251 LEHGQPAGICVLEYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLEQAKLFCRTLED  300

인간        298 ILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLK  347
                |||||||.|||||||.|||.|:.||||||||:||||||||:|||||||:.
바다소      301 ILADAPEYQNNCRLIVYQESAEGSSFSLSQEILRHLRQEEREEVTVGSVG  350

인간        348 TSAV-----PSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                ||.|     ||||::||||:|||||||:|||||||..
바다소      351 TSVVPSPSSPSTSSLSQEPKLLISGMEQPLPLRTDVF   387
```

도면13

인간 STING (SEQ ID NO:305) 및 은상어 STING (SEQ ID NO:368):

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLS--ACLVTLWGLGEPPEHTLRYLV   48
                     :..|||.|||..|....|:|:|  |||..:|.    .|::.::::|
은상어        1 -----MSDSIPRPRGKVATYVGLILMSGLACLYFML----TPDYHIKFIV   41

인간         49 LHLASLQL-----GLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPL   93
                ..:|. ||     .|.|..:|...|||.|..:||:.|:.|.:.|.|...
은상어       42 QQVAQ-QLIVSFFALCLLRLCEFVEELGHKQTRYQNSWVRALNASLDWK-   89

인간         94 RRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNI---------LL  134
                :.|..||:|:.|.:.||......:    |:..:.|.:::         :.
은상어       90 KYGFCLLISLLFNWVLPYEKHMSY----AVPTVGQTISLTCFCVLFLKVF  135

인간        135 GLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQ  184
                .|..|:||:||.:.|....||||||||||:|||::||:|.:|..|::
은상어      136 QLDVLSPAQISEISETNKCNVAHGLAWSYYLGYLKIVLPKLEEKINQYHR  185

인간        185 HYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAG  234
                .|.|:|: ...::||||:|..|.|.|.|...|.||.|...||:...||||
은상어      186 EYGNVLQ-QKGKKLYILIPFSCKVLDKLEKVDTNIVFYQNLPELLVDRAG  234

인간        235 IKDRVYSNSIYELL-ENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSRED  283
                ||.|.|.:|||.:. :..|:...|:|||||||::||.|:..|.|.||:|.
은상어      235 IKSRSYKHSIYLIYDQKKQQPHHCILEYATPLRSLFEMTNDSAAAFSKEQ  284

인간        284 RLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFS---LSQEVL  330
                ||:|||||.|||:.||.:.||...:.|||.|.:..:.:...   :|:|:|
은상어      285 RLDQAKLFYRTLKSILNNVPEVTGSYRLIPYDDDLEGAELGPHFVSEEIL  334

인간        331 RHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS  379
                :|:|||..|....   :.|....|..||.||.|:||  :.|.|||:...
은상어      335 KHMRQELTEYPVA---EPSNANETDCMSSEPHLMIS--DDPKPLRSYCP  378
```

도면14

인간 STING (SEQ ID NO:305) 및 마우스 STING (SEQ ID NO:369):

```
인간          1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
                ||:|:|||:||.||||.::..||:.|.|.|:.||...:||.|||:||.||
마우스        1 MPYSNLHPAIPRPRGHRSKYVALIFLVASLMILWVAKDPPNHTLKYLALH   50

인간         51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
                |||.:|||||..:|.|||||.|:.|||:||||:.||||||||:...|::|
마우스       51 LASHELGLLLKNLCCLAEELCHVQSRYQGSYWKAVRACLGCPIHCMAMIL  100

인간        101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  150
                ||.|||: |.|.....:||..||.|.::|::||||:.|.|||:|||||:
마우스      101 LSSYFYF-LQNTADIYLSWMFGLLVLYKSLSMLLGLQSLTPAEVSAVCEE  149

인간        151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI  200
                ...|||||||||||||||||.||||||.:||.:||:|.||.|:||||
마우스      150 KKLNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLQARIRMFNQLHNNMLSGAGSRRLYI  199

인간        201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLEN  250
                |.||||||||||:.||||||.|.||||..||||||:||||||:||:|||
마우스      200 LFPLDCGVPDNLSVVDPNIRFRDMLPQQNIDRAGIKNRVYSNSVYEILEN  249

인간        251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA  300
                ||.||.|:||||||||||||.::|||||||||||||||||||:||.
마우스      250 GQPAGVCILEYATPLQTLFAMSQDAKAGFSREDRLEQAKLFCRTLEEILE  299

인간        301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA  350
                |.|||:||||||.||||.|.:||||||||||:|||||||||:.:..||.
마우스      300 DVPESRNNCRLIVYQEPTDGNSFSLSQEVLRHIRQEEKEEVTMNAPMTSV  349

인간        351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                .|..|.:||||.||||||::|||||||..
마우스      350 APPPSVLSQEPRLLISGMDQPLPLRTDLI   378
```

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING - RECTIFICATION

<110> Glickman, Laura Hix

Peterson, Bret Nicholas

Kehoe, Haixing

Iannello, Alexandre Charles Michel

Thanos, Christopher D.

<120> IMMUNOSTIMULATORY BACTERIA-BASED VACCINES, THERAPEUTICS,

AND RNA DELIVERY PLATFORMS

<130> 62131-1708PC

<140> PCT/US21/45832

<141> 2021-08-12

<150> 63/188,443

<151> 2021-05-13

<150> 63/064,869

<151> 2020-08-12

<150> 17/320,200

<151> 2021-05-13

<160> 495

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human PD-L1 shRNA target 1

<400> 1

gtagagtatg gtagcaata 19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human PD-L1 shRNA target 2

<400> 2

gccgactaca agcgaatta 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human PD-L1 shRNA target 3

<400> 3

gacaagcagt gaccatcaa 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human PD-L1 shRNA target 4

<400> 4

gaatcaacac aacaactaa 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human PD-L1 shRNA target 5

<400> 5

gcacatcctc caaatgaaa 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human PD-L1 shRNA target 6

<400> 6

gtagcactga cattcatct 19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human CTNNB1 shRNA target 1

<400> 7

gacagactgc cttcaaatt 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human CTNNB1 shRNA target 2

<400> 8

gcagctggaa ttctttcta 19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human CTNNB1 shRNA target 3

<400> 9

gactaccagt tgtggttaa 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human CTNNB1 shRNA target 4

<400> 10

ggacacagca gcaatttgt 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human CTNNB1 shRNA target 5

<400> 11

ggatgttcac aaccgaatt 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human CTNNB1 shRNA target 6

<400> 12

gccacaagat tacaagaaa 19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 1

<400> 13

gccaggtgag gaagttcta 19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 2

<400> 14

gagctggctc ctggtgaat 19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 3

<400> 15

gctgagaaca ctggatcta 19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 4

<400> 16

gaagaatgcc agagaaata 19

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 5

<400> 17

ggacacaaat gatatcaca 19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 6

<400> 18

ggagtatgcc agcattcag 19

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human Trex1 shRNA target 1

<400> 19

gcagcgcatg ggcgtcaat 19

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human Trex1 shRNA target 2

<400> 20

ggcccaagga agagctata 19

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human Trex1 shRNA target 3

<400> 21

gcaccatcag gcccatgta 19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human Trex1 shRNA target 4

<400> 22

gccacaacca ggaacacta 19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human Trex1 shRNA target 5

<400> 23

gcaggggtac caaggatct 19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human Trex1 shRNA target 6

<400> 24

gccacactgt atggactat 19

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VISTA shRNA target 1

<400> 25

gatgtgacct tctacaaga 19

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VISTA shRNA target 2

<400> 26

gaccaccatg gcaacttct 19

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VISTA shRNA target 3

<400> 27

ggtgcagaca ggcaaagat 19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VISTA shRNA target 4

<400> 28

gtgcctgcat cgtaggaat 19

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VISTA shRNA target 5

<400> 29

gcaacattca agggattga 19

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VISTA shRNA target 6

<400> 30

gtccctgact ctccaaact 19

<210> 31

<211> 870

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> programmed death-ligand 1 (PD-L1), isoform 1

<400> 31

atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60

gtcacggttc ccaaggacct atatgtggta gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120

aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180

gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc 240

tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300

atcacagatg tgaaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360

gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaga 420

attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggctac 480

cccaaggccg aagtcatctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540

accaccaatt ccaagagaga ggagaagctt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600

acaacaacta atgagatttt ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaaccat 660

acagctgaat tggtcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720

ttggtaattc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt 780

ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840

aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg 870

<210> 32

<211> 2343

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CTNNB1 (Beta-catenin), isoform 1

<400> 32

atggctactc aagctgattt gatggagttg gacatggcca tggaaccaga cagaaaagcg 60

gctgttagtc actggcagca acagtcttac ctggactctg gaatccattc tggtgccact 120

accacagctc cttctctgag tggtaaaggc aatcctgagg aagaggatgt ggatacctcc 180

caagtcctgt atgagtggga acagggattt tctcagtcct tcactcaaga acaagtagct 240

gatattgatg gacagtatgc aatgactcga gctcagaggg tacgagctgc tatgttccct 300

gagacattag atgagggcat gcagatccca tctacacagt ttgatgctgc tcatcccact 360

aatgtccagc gtttggctga accatcacag atgctgaaac atgcagttgt aaacttgatt 420

aactatcaag atgatgcaga acttgccaca cgtgcaatcc ctgaactgac aaaactgcta 480

aatgacgagg accaggtggt ggttaataag gctgcagtta tggtccatca gctttctaaa 540

aaggaagctt ccagacacgc tatcatgcgt tctcctcaga tggtgtctgc tattgtacgt 600

accatgcaga atacaaatga tgtagaaaca gctcgttgta ccgctgggac cttgcataac 660

ctttcccatc atcgtgaggg cttactggcc atctttaagt ctggaggcat tcctgccctg 720

gtgaaaatgc ttggttcacc agtggattct gtgttgtttt atgccattac aactctccac 780

aacctttttat tacatcaaga aggagctaaa atggcagtgc gtttagctgg tgggctgcag 840

aaaatggttg ccttgctcaa caaaacaaat gttaaattct tggctattac gacagactgc 900

cttcaaattt tagcttatgg caaccaagaa agcaagctca tcatactggc tagtggtgga 960

ccccaagctt tagtaaatat aatgaggacc tatacttacg aaaaactact gtggaccaca 1020

agcagagtgc tgaaggtgct atctgtctgc tctagtaata agccggctat tgtagaagct 1080

ggtggaatgc aagctttagg acttcacctg acagatccaa gtcaacgtct tgttcagaac 1140

tgtctttgga ctctcaggaa tctttcagat gctgcaacta aacaggaagg gatggaaggt 1200

ctccttggga ctcttgttca gcttctgggt tcagatgata taaatgtggt cacctgtgca 1260

gctggaattc tttctaacct cacttgcaat aattataaga acaagatgat ggtctgccaa 1320

gtgggtggta tagaggctct tgtgcgtact gtccttcggg ctggtgacag ggaagacatc 1380

actgagcctg ccatctgtgc tcttcgtcat ctgaccagcc gacaccaaga agcagagatg 1440

gcccagaatg cagttcgcct tcactatgga ctaccagttg tggttaagct cttacaccca 1500

ccatcccact ggcctctgat aaaggctact gttggattga ttcgaaatct tgccctttgt 1560

cccgcaaatc atgcaccttt gcgtgagcag ggtgccattc cacgactagt tcagttgctt 1620

gttcgtgcac atcaggatac ccagcgccgt acgtccatgg gtgggacaca gcagcaattt 1680

gtggaggggg tccgcatgga agaaatagtt gaaggttgta ccggagccct tcacatccta 1740

gctcgggatg ttcacaaccg aattgttatc agaggactaa ataccattcc attgtttgtg 1800

cagctgcttt attctcccat tgaaaacatc caaagagtag ctgcaggggt cctctgtgaa 1860

cttgctcagg acaaggaagc tgcagaagct attgaagctg agggagccac agctcctctg 1920

acagagttac ttcactctag gaatgaaggt gtggcgacat atgcagctgc tgttttgttc 1980

cgaatgtctg aggacaagcc acaagattac aagaaacggc tttcagttga gctgaccagc 2040

tctctcttca gaacagagcc aatggcttgg aatgagactg ctgatcttgg acttgatatt 2100

ggtgcccagg gagaacccct tggatatcgc caggatgatc ctagctatcg ttcttttcac 2160

tctggtggat atggccagga tgccttgggt atggacccca tgatggaaca tgagatgggt 2220

ggccaccacc ctggtgctga ctatccagtt gatgggctgc cagatctggg gcatgcccag 2280

gacctcatgg atgggctgcc tccaggtgac agcaatcagc tggcctggtt tgatactgac 2340

ctg 2343

<210> 33

<211> 1512

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> signal regulatory protein alpha (SIRP-alpha)

isoform 1

<400> 33

atggagcccg ccggcccggc ccccggccgc ctcgggccgc tgctctgcct gctgctcgcc 60

gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 120

aagtccgtgt tggttgcagc tggagagaca gccactctgc gctgcactgc gacctctctg 180

atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga attaatctac 240

aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta acaactgttt cagacctcac aaagagaaac 300

aacatggact tttccatccg catcggtaac atcaccccag cagatgccgg cacctactac 360

tgtgtgaagt tccggaaagg gagccccgat gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact 420

gagctgtctg tgcgcgccaa accctctgcc cccgtggtat cgggccctgc ggcgagggcc 480

acacctcagc acacagtgag cttcacctgc gagtcccacg gcttctcacc cagagacatc 540

accctgaaat ggttcaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagaccaa cgtggacccc 600

gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct gacccgcgag 660

gacgttcact ctcaagtcat ctgcgaggtg gcccacgtca ccttgcaggg ggaccctctt 720

cgtgggactg ccaacttgtc tgagaccatc cgagttccac ccaccttgga ggttactcaa 780

cagcccgtga gggcagagaa ccaggtgaat gtcacctgcc aggtgaggaa gttctacccc 840

cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaaacgtgt cccggacaga aacggcctca 900

accgttacag agaacaagga tggtacctac aactggatga gctggctcct ggtgaatgta 960

tctgcccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccaggtgg agcatgacgg gcagccagcg 1020

gtcagcaaaa gccatgacct gaaggtctca gcccacccga aggagcaggg ctcaaatacc 1080

gccgctgaga acactggatc taatgaacgg aacatctata ttgtggtggg tgtggtgtgc 1140

accttgctgg tggccctact gatggcggcc ctctacctcg tccgaatcag acagaagaaa 1200

gcccagggct ccacttcttc tacaaggttg catgagcccg agaagaatgc cagagaaata 1260

acacaggaca caaatgatat cacatatgca gacctgaacc tgcccaaggg gaagaagcct 1320

gctccccagg ctgcggagcc caacaaccac acggagtatg ccagcattca gaccagcccg 1380

cagcccgcgt cggaggacac cctcacctat gctgacctgg acatggtcca cctcaaccgg 1440

acccccaagc agccggcccc caagcctgag ccgtccttct cagagtacgc cagcgtccag 1500

gtcccgagga ag 1512

<210> 34

<211> 1108

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TREX1 isoform 1

<400> 34

aatgggccct ggagctcgca gacagggcag gattgtgcag ggaaggcctg agatgtgctt 60

ctgcccaccc cctaccccac tccctcccct tcggatctta acactgggca ctcacacacc 120

caccccatgc tcctctccag gctcagcagc aggtacgtac ccaaccatgg gctcgcaggc 180

cctgcccccg gggcccatgc agaccctcat ctttttcgac atggaggcca ctggcttgcc 240

cttctcccag cccaaggtca cggagctgtg cctgctggct gtccacagat gtgccctgga 300

gagccccccc acctctcagg ggccacctcc cacagttcct ccaccaccgc gtgtggtaga 360

caagctctcc ctgtgtgtgg ctccggggaa ggcctgcagc cctgcagcca gcgagatcac 420

aggtctgagc acagctgtgc tggcagcgca tgggcgtcaa tgttttgatg acaacctggc 480

caacctgctc ctagccttcc tgcggcgcca gccacagccc tggtgcctgg tggcacacaa 540

tggtgaccgc tacgacttcc ccctgctcca agcagagctg gctatgctgg gcctcaccag 600

tgctctggat ggtgccttct gtgtggatag catcactgcg ctgaaggccc tggagcgagc 660

aagcagcccc tcagaacacg gcccaaggaa gagctatagc ctaggcagca tctacactcg 720

cctgtatggg cagtcccctc cagactcgca cacggctgag ggtgatgtcc tggccctgct 780

cagcatctgt cagtggagac cacaggccct gctgcggtgg gtggatgctc acgccaggcc 840

tttcggcacc atcaggccca tgtatggggt cacagcctct gctaggacca agccaagacc 900

atctgctgtc acaaccactg cacacctggc cacaaccagg aacactagtc ccagccttgg 960

agagagcagg ggtaccaagg atcttcctcc agtgaaggac cctggagccc tatccaggga 1020

ggggctgctg gccccactgg gtctgctggc catcctgacc ttggcagtag ccacactgta 1080

tggactatcc ctggccacac ctggggag 1108

<210> 35

<211> 933

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> V-domain Ig suppressor of T cell activation
(VISTA)

<400> 35

atgggcgtcc ccacggccct ggaggccggc agctggcgct ggggatccct gctcttcgct 60

ctcttcctgg ctgcgtccct aggtccggtg gcagccttca aggtcgccac gccgtattcc 120

ctgtatgtct gtcccgaggg gcagaacgtc accctcacct gcaggctctt gggccctgtg 180

gacaaagggc acgatgtgac cttctacaag acgtggtacc gcagctcgag gggcgaggtg 240

cagacctgct cagagcgccg gcccatccgc aacctcacgt tccaggacct tcacctgcac 300

catggaggcc accaggctgc caacaccagc cacgacctgg ctcagcgcca cgggctggag 360

tcggcctccg accaccatgg caacttctcc atcaccatgc gcaacctgac cctgctggat 420

agcggcctct actgctgcct ggtggtggag atcaggcacc accactcgga gcacagggtc 480

catggtgcca tggagctgca ggtgcagaca ggcaaagatg caccatccaa ctgtgtggtg 540

tacccatcct cctcccagga tagtgaaaac atcacggctg cagccctggc tacgggtgcc 600

tgcatcgtag gaatcctctg cctccccctc atcctgctcc tggtctacaa gcaaaggcag 660

gcagcctcca accgccgtgc ccaggagctg gtgcggatgg acagcaacat tcaagggatt 720

gaaaaccccg gctttgaagc ctcaccacct gcccagggga tacccgaggc caaagtcagg 780

cacccccctgt cctatgtggc ccagcggcag ccttctgagt ctgggcggca tctgctttcg 840

gagcccagca ccccccctgtc tcctccaggc cccggagacg tcttcttccc atccctggac 900

cctgtccctg actctccaaa ctttgaggtc atc 933

<210> 36

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence for huPD-L1

<400> 36

gtagagtatg gtagcaatat ctagagtatt gctaccatac tctac 45

<210> 37

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence for huCTNNB1

<400> 37

gacagactgc cttcaaattt ctagagaatt tgaaggcagt ctgtc 45

<210> 38

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence for huSIRPalpha

<400> 38

gccaggtgag gaagttctat ctagagtaga acttcctcac ctggc 45

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence for huTREX1

<400> 39

gcagcgcatg ggcgtcaatt ctagagattg acgcccatgc gctgc 45

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence for huVISTA

<400> 40

gaccaccatg gcaacttctt ctagagagaa gttgccatgg tggtc 45

<210> 41

<211> 3220

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6 vector

<400> 41

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720

tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780

gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840

aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900

ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960

agtttttct cgagtagcta gagaattcat ggtaatagcg atgactaata cgtagatgta 1020

ctgccaagta ggaaagtccc ataaggtcat gtactgggca taatgccagg cgggccattt 1080

accgtcattg acgtcaatag ggggcgtact tggcatatga tacacttgat gtactgccaa 1140

gtgggcagtt taccgtaaat agtccaccca ttgacgtcaa tggaaagtcc ctattggcgt 1200

tactatggga acatacgtca ttattgacgt caatgggcgg gggtcgttgg gcggtcagcc 1260

aggcgggcca tttaccgtaa gttatgtaac gcggaactcc atatatgggc tatgaactaa 1320

tgaccccgta attgattact attaataact agacccagct ttcttgtaca aagttggcat 1380

tataagaaag cattgcttat caatttgttg caacgaacag gtcactatca gtcaaaataa 1440

aatcattatt tgccatccag ctgatatccc ctatagtgag tcgtattaca tggtcatagc 1500

tgtttcctgg cagctctggc ccgtgtctca aaatctctga tgttacattg cacaagataa 1560

aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata caaggggtgt 1620

tatgagccat attcaacggg aaacgtcgag gccgcgatta aattccaaca tggatgctga 1680

tttatatggg tataaatggg ctcgcgataa tgtcgggcaa tcaggtgcga caatctatcg 1740

cttgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag gtagcgttgc 1800

caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg acggaattta tgcctcttcc 1860

gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca ctgcgatccc 1920

cggaaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa atattgttga 1980

tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt gtccttttaa 2040

cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg gtttggttga 2100

tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctgtt gaacaagtct ggaaagaaat 2160

gcataaactt ttgccattct caccggattc agtcgtcact catggtgatt tctcacttga 2220

taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgtatt gatgttggac gagtcggaat 2280

cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc ctcggtgagt tttctccttc 2340

attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat cctgatatga ataaattgca 2400

gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta atcagaattg gttaattggt tgtaacactg 2460

gcagagcatt acgctgactt gacgggacgg cgcaagctca tgaccaaaat cccttaacgt 2520

gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 2580

agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 2640

ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 2700

cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 2760

gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc 2820

cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 2880

gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 2940

caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 3000

aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct 3060

tccagggggа aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 3120

gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 3180

ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 3220

<210> 42

<211> 3802

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6-H1 Vector

<400> 42

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg tttttgtcga cagatctggc gcgccatagt ggccagcggc 840

cgcaggtaag ccagcccagg cctcgccctc cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt 900

agcctgcatc cagggacagg ccccagccgg gtgctgacac gtccacctcc atctcttcct 960

caggtctgcc cgggtggcat ccctgtgacc cctccccagt gcctctcctg gccctggaag 1020

ttgccactcc agtgcccacc agccttgtcc taataaaatt aagttgcatc attttgtctg 1080

actaggtgtc cttctataat attatggggt ggaggggggt ggtatggagc aaggggccca 1140

agttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 1200

cacaaataaa gcatttttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt 1260

atcttatcat gtctggatcc aaggtcgggc aggaagaggg cctatttccc atgattcctt 1320

catatttgca tatacgatac aaggctgtta gagagataat tagaattaat ttgactgtaa 1380

acacaaagat attagtacaa aatacgtgac gtagaaagta ataatttctt gggtagtttg 1440

cagttttaaa attatgtttt aaaatggact atcatatgct taccgtaact tgaaagtatt 1500

tcgatttctt ggctttatat atcttgtgga aaggacgaaa ctagtttttt ctcgagtagc 1560

tagagaattc atggtaatag cgatgactaa tacgtagatg tactgccaag taggaaagtc 1620

ccataaggtc atgtactggg cataatgcca ggcgggccat ttaccgtcat tgacgtcaat 1680

aggggggcgta cttggcatat gatacacttg atgtactgcc aagtgggcag tttaccgtaa 1740

atagtccacc cattgacgtc aatggaaagt ccctattggc gttactatgg gaacatacgt 1800

cattattgac gtcaatgggc gggggtcgtt gggcggtcag ccaggcgggc catttaccgt 1860

aagttatgta acgcggaact ccatatatgg gctatgaact aatgaccccg taattgatta 1920

ctattaataa ctagacccag ctttcttgta caaagttggc attataagaa agcattgctt 1980

atcaatttgt tgcaacgaac aggtcactat cagtcaaaat aaaatcatta tttgccatcc 2040

agctgatatc ccctatagtg agtcgtatta catggtcata gctgtttcct ggcagctctg 2100

gcccgtgtct caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac 2160

aataaaactg tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg 2220

ggaaacgtcg aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg 2280

ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgcttgtatg ggaagcccga 2340

tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga 2400

gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat 2460

ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccggaaaaa cagcattcca 2520

ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg cagtgttcct 2580

gcgccggttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg 2640

tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 2700

cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt 2760

ctcaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga 2820

ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga 2880

tcttgccatc ctatggaact gcctcggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 2940

tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga 3000

tgagtttttc taatcagaat tggttaattg gttgtaacac tggcagagca ttacgctgac 3060

ttgacgggac ggcgcaagct catgaccaaa atcccttaac gtgagttacg cgtcgttcca 3120

ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 3180

cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 3240

tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 3300

tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 3360

tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 3420

tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac 3480

gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 3540

acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 3600

ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg 3660

gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 3720

ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 3780

ggccttttgc tggccttttg ct 3802

<210> 43

<211> 3263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6-shPDL1-shRNA Vector

<400> 43

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720

tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780

gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840

aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900

ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960

aggtagagta tggtagcaat atctagagta ttgctaccat actctacttt tttcgagtag 1020

ctagagaatt catggtaata gcgatgacta atacgtagat gtactgccaa gtaggaaagt 1080

cccataaggt catgtactgg gcataatgcc aggcgggcca tttaccgtca ttgacgtcaa 1140

taggggggcgt acttggcata tgatacactt gatgtactgc caagtgggca gtttaccgta 1200

aatagtccac ccattgacgt caatggaaag tccctattgg cgttactatg ggaacatacg 1260

tcattattga cgtcaatggg cgggggtcgt tgggcggtca gccaggcggg ccatttaccg 1320

taagttatgt aacgcggaac tccatatatg ggctatgaac taatgacccc gtaattgatt 1380

actattaata actagaccca gctttcttgt acaaagttgg cattataaga aagcattgct 1440

tatcaatttg ttgcaacgaa caggtcacta tcagtcaaaa taaaatcatt atttgccatc 1500

cagctgatat cccctatagt gagtcgtatt acatggtcat agctgtttcc tggcagctct 1560

ggcccgtgtc tcaaaatctc tgatgttaca ttgcacaaga taaaaatata tcatcatgaa 1620

caataaaact gtctgcttac ataaacagta atacaagggg tgttatgagc catattcaac 1680

gggaaacgtc gaggccgcga ttaaattcca acatggatgc tgatttatat gggtataaat 1740

gggctcgcga taatgtcggg caatcaggtg cgacaatcta tcgcttgtat gggaagcccg 1800

atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca aaggtagcgt tgccaatgat gttacagatg 1860

agatggtcag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct tccgaccatc aagcatttta 1920

tccgtactcc tgatgatgca tggttactca ccactgcgat ccccggaaaa acagcattcc 1980

aggtattaga agaatatcct gattcaggtg aaaatattgt tgatgcgctg gcagtgttcc 2040

tgcgccggtt gcattcgatt cctgtttgta attgtccttt taacagcgat cgcgtatttc 2100

gtctcgctca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggt tgatgcgagt gattttgatg 2160

acgagcgtaa tggctggcct gttgaacaag tctggaaaga aatgcataaa cttttgccat 2220

tctcaccgga ttcagtcgtc actcatggtg atttctcact tgataacctt atttttgacg 2280

aggggaaatt aataggttgt attgatgttg gacgagtcgg aatcgcagac cgataccagg 2340

atcttgccat cctatggaac tgcctcggtg agttttctcc ttcattacag aaacggcttt 2400

ttcaaaaata tggtattgat aatcctgata tgaataaatt gcagtttcat ttgatgctcg 2460

atgagttttt ctaatcagaa ttggttaatt ggttgtaaca ctggcagagc attacgctga 2520

cttgacggga cggcgcaagc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagttac gcgtcgttcc 2580

actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 2640

gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg 2700

atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 2760

atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 2820

ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 2880

gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa 2940

cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 3000

tacagcgtga gcattgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 3060

cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct 3120

ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 3180

gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc 3240

tggccttttg ctggcctttt gct 3263

<210> 44

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6-shPDL1-H1-shCTNNB1 Vector

<400> 44

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg acagactgcc ttcaaatttc tagagaattt gaaggcagtc 840

tgtctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620
accatactct actttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210

> 45

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6-shPDL1-H1-shSIRPalpha Vector

<400> 45

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg ccaggtgagg aagttctatc tagagtagaa cttcctcacc 840

tggctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140

aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380

tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440

caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500

tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620

accatactct actttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680

tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740

ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800

actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860

attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920

ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980

tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100

caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160

gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820

aaagaaatgc ataaacttttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 46

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6-shPDL1-H1-shTREX1

<400> 46

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg cagcgcatgg gcgtcaattc tagagattga cgcccatgcg 840

ctgctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140

aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380

tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440

caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500

tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620

accatactct actttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680

tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740

ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800

actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860

attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920

ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980

tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100

caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160

gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820

aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc caggggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 47

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> pEQU6-shPDL1-H1-shVISTA

<400> 47

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg accaccatgg caacttcttc tagagagaag ttgccatggt 840

ggtctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140

aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380

tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440

caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500

tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620

accatactct actttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680

tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740

ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800

actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860

attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920

ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980

tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100

caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160

gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820

aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 48

<211> 1104

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> Strain LT2 Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
(asd)

<400> 48

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggaatggtcg gctctgttct catgcaacgc 60

atggtagagg agcgcgattt cgacgctatt cgccctgttt tcttttctac ctcccagttt 120

ggacaggcgg cgcccacctt cggcgacacc tccaccggca cgctacagga cgcttttgat 180

ctggatgcgc taaaagcgct cgatatcatc gtgacctgcc agggcggcga ttataccaac 240

gaaatttatc caaagctgcg cgaaagcgga tggcagggtt actggattga tgcggcttct 300

acgctgcgca tgaaagatga tgccattatt attctcgacc cggtcaacca ggacgtgatt 360

accgacggcc tgaacaatgg cgtgaagacc tttgtgggcg gtaactgtac cgttagcctg 420

atgttgatgt cgctgggcgg tctctttgcc cataatctcg ttgactgggt atccgtcgcg 480

acctatcagg ccgcctccgg cggcggcgcg cgccatatgc gcgagctgtt aacccagatg 540

ggtcagttgt atggccatgt cgccgatgaa ctggcgacgc cgtcttccgc aattcttgat 600

attgaacgca aagttacggc attgacccgc agcggcgagc tgccggttga taactttggc 660

gtaccgctgg cgggaagcct gatcccctgg atcgacaaac agctcgataa cggccagagc 720

cgcgaagagt ggaaaggcca ggcggaaacc aacaagattc tcaatactgc ctctgtgatt 780

ccggttgatg gtttgtgtgt gcgcgtcggc gcgctgcgct gtcacagcca ggcgttcacc 840

atcaagctga aaaaagaggt atccattccg acggtggaag aactgctggc ggcacataat 900

ccgtgggcga aagtggtgcc gaacgatcgt gatatcacta tgcgcgaatt aaccccggcg 960

gcggtgaccg gcacgttgac tacgccggtt ggtcgtctgc gtaagctgaa catggggcca 1020

gagttcttgt cggcgtttac cgtaggcgac cagttgttat ggggcgccgc cgagccgctg 1080

cgtcgaatgc tgcgccagtt ggcg 1104

<210> 49

<211> 861

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> Strain LT2 TSX

<400> 49

atgaaaaaaa ctttactcgc agtcagcgca gcgctggcgc tcacctcatc ttttactgct 60

aacgcagcag aaaatgatca gccgcagtat ttgtccgact ggtggcacca gagcgtaaac 120

gtggtaggca gctaccatac ccgtttctcg ccgaaattga acaacgacgt ctatctggaa 180

tatgaagcat ttgccaaaaa agactggttt gatttctacg gctatatcga tattcccaaa 240

acctttgatt ggggtaacgg caacgataaa ggtatctggt ccgacggttc tccgctgttc 300

atggaaatcg aaccgcgttt ctcaattgat aagctgaccg gcgcagacct gagcttcggc 360

ccgtttaaag agtggtattt cgccaacaac tacatctacg atatgggcga taacaaagcc 420

agccgccaga gcacgtggta tatgggtctg gggaccgata tcgacaccgg cctgccgatg 480

ggtctgtcgc tgaacgtgta tgcgaaatat cagtggcaaa actacggcgc gtccaatgaa 540

aacgaatggg acggctaccg tttcaaagtg aaatacttcg tccccatcac cgatctgtgg 600

ggcggtaaac tgagctatat cggctttacc aactttgact ggggatctga tttaggcgac 660

gatccgaacc gtaccagcaa ctccatcgct tccagccata tcctggcgct gaactacgat 720

cactggcact actcggtcgt tgcgcgttac ttccataacg gcggacagtg gcagaatggc 780

gcaaaactga actggggcga cggcgatttc agcgcgaaat ctaccggctg gggcggctac 840

ctggtcgtgg gttacaactt c 861

<210> 50

<211> 864

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> programmed cell death protein 1 (PD-1)

<400> 50

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180

gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480

aggccagccg gccagttcca aaccctggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc 540

ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600

ggagccaggc gcaccggcca gcccctgaag gaggacccct cagccgtgcc tgtgttctct 660

gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccggagcc ccccgtgccc 720

tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtctttc ctagcggaat gggcacctca 780

tcccccgccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840

gatggacact gctcttggcc cctc 864

<210> 51

<211> 933

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> programmed cell death protein 2 (PD-2), isoform 1

<400> 51

atggctgccg ccggggccag gcctgtggag ctgggcttcg ccgagtcggc gccggcgtgg 60

cgactgcgca gcgagcagtt ccccagcaag gtgtatgcgc cgctgcctgg ccgcccggac 120

gccttccacc gctgcatctt cctcttctgc tgccgcgagc agccgtgctg tgccggcctg 180

cgagttttta ggaatcaact acccaggaaa aacgattttt actcatatga gccaccttct 240

gagaatcctc ccccagaaac aggagaatca gtgtgtctcc agcttaagtc tggtgctcat 300

ctctgcaggg tttgtggctg tttaggcccc aaaacgtgct ccagatgcca caaagcatat 360

tactgcagca aggagcatca gaccctagac tggagattgg gacataagca ggcttgtgca 420

caaccagatc atctggacca tataattcca gaccacaact tccttttcc agaatttgaa 480

attgtaatag aaacagaaga tgagattatg cctgaggttg tggaaaagga agattactca 540

gagattatag ggagcatggg tgaagcactt gaggaagaac tggattccat ggcaaaacat 600

gaatccaggg aagataaaat ttttcagaag tttaaaactc agatagccct tgaaccagaa 660

cagattctta gatatggcag aggtattgcc cccatctgga tttctggtga aaatattcct 720

caagaaaagg atattccaga ttgcccctgt ggtgccaaga gaatattgga attccaggtc 780

atgcctcagc tcctaaacta cctgaaggct gacagactgg gcaagagcat tgactggggc 840

atcctggctg tcttcacctg tgctgagagc tgcagcttgg gtactggcta tacagaagaa 900

tttgtgtgga agcaggatgt aacagataca ccg 933

<210> 52

<211> 819

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> programmed death-ligand 2 (PD-L2), isoform 1

<400> 52

atgatcttcc tcctgctaat gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat agcagcttta 60

ttcacagtga cagtccctaa ggaactgtac ataatagagc atggcagcaa tgtgaccctg 120

gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 180

aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 240

cccctaggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 300

caatgcataa tcatctatgg ggtcgcctgg gactacaagt acctgactct gaaagtcaaa 360

gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc ctaaaggttc cagaaacaga tgaggtagag 420

ctcacctgcc aggctacagg ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt 480

cctgccaaca ccagccactc caggacccct gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540

cgcctaaagc caccccctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac tcacgtgagg 600

gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcagatgg aacccaggac ccatccaact 660

tggctgcttc acattttcat cccctcctgc atcattgctt tcattttcat agccacagtg 720

atagccctaa gaaaacaact ctgtcaaaag ctgtattctt caaaagacac aacaaaaaga 780

cctgtcacca caacaaagag ggaagtgaac agtgctatc 819

<210> 53

<211> 669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
(CTLA-4), isoform 1

<400> 53

atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcagctga acctggctac caggacctgg 60

ccctgcactc tcctgttttt tcttctcttc atccctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120

gcccagcctg ctgtggtact ggccagcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180

gcatctccag gcaaagccac tgaggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc tgacagccag 240

gtgactgaag tctgtgcggc aacctacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300

tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcactatcca aggactgagg 360

gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgtacccacc gccatactac 420

ctgggcatag gcaacggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480

gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggt tgtttttta tagctttctc 540

ctcacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa gccctcttac aacaggggtc 600

tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttatttatt 660

cccatcaat 669

<210> 54

<211> 969

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD47 transcript variant 1

<400> 54

atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta 60

ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 120

tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt 180

aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctctaaaca agtccactgt ccccactgac 240

tttagtagtg caaaaattga agtctcacaa ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg 300

gataagagtg atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 360

agagaaggtg aaacgatcat cgagctaaaa tatcgtgttg tttcatggtt ttctccaaat 420

gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt 480

ggtattaaaa cacttaaata tagatccggt ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt 540

gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc attgttggag ccattctttt cgtcccaggt 600

gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggtttaattg tgacttctac agggatatta 660

atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc 720

atattggtta ttcaggtgat agcctatatc ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt 780

gcggcgtgta taccaatgca tggccctctt ctgatttcag gtttgagtat cttagctcta 840

gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggctt ccaatcagaa gactatacaa 900

cctcctagga aagctgtaga ggaacccctt aatgcattca aagaatcaaa aggaatgatg 960

aatgatgaa 969

<210> 55

<211> 1209

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 1

<400> 55

atggcacacg ctatggaaaa ctcctggaca atcagtaaag agtaccatat tgatgaagaa 60

gtgggctttg ctctgccaaa tccacaggaa aatctacctg atttttataa tgactggatg 120

ttcattgcta aacatctgcc tgatctcata gagtctggcc agcttcgaga aagagttgag 180

aagttaaaca tgctcagcat tgatcatctc acagaccaca agtcacagcg ccttgcacgt 240

ctagttctgg gatgcatcac catggcatat gtgtggggca aaggtcatgg agatgtccgt 300

aaggtcttgc caagaaatat tgctgttcct tactgccaac tctccaagaa actggaactg 360

cctcctattt tggtttatgc agactgtgtc ttggcaaact ggaagaaaaa ggatcctaat 420

aagcccctga cttatgagaa catggacgtt ttgttctcat ttcgtgatgg agactgcagt 480

aaaggattct tcctggtctc tctattggtg gaaatagcag ctgcttctgc aatcaaagta 540

attcctactg tattcaaggc aatgcaaatg caagaacggg acactttgct aaaggcgctg 600

ttggaaatag cttcttgctt ggagaaagcc cttcaagtgt ttcaccaaat ccacgatcat 660

gtgaacccaa aagcattttt cagtgttctt cgcatatatt tgtctggctg gaaaggcaac 720

ccccagctat cagacggtct ggtgtatgaa aggttctggg aagacccaaa ggagtttgca 780

gggggcagtg caggccaaag cagcgtcttt cagtgctttg acgtcctgct gggcatccag 840

cagactgctg gtggaggaca tgctgctcag ttcctccagg acatgagaag atatatgcca 900

ccagctcaca ggaacttcct gtgctcatta gagtcaaatc cctcagtccg tgagtttgtc 960

ctttcaaaag gtgatgctgg cctgcgggaa gcttatgacg cctgtgtgaa agctctggtc 1020

tccctgagga gctaccatct gcaaatcgtg actaagtaca tcctgattcc tgcaagccag 1080

cagccaaagg agaataagac ctctgaagac ccttcaaaac tggaagccaa aggaactgga 1140

ggcactgatt taatgaattt cctgaagact gtaagaagta caactgagaa atccctttg 1200

aaggaaggt 1209

<210> 56

<211> 1260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 2

<400> 56

atgttgcatt ttcattatta tgatacttca aacaaaataa tggagcccca cagaccgaat 60

gtgaagacag cagtgccatt gtctttggaa agctatcaca tatctgaaga gtatggcttt 120

cttcttccag attctctgaa agaacttcca gatcattata ggccttggat ggaaattgcc 180

aacaaacttc ctcaattgat tgatgctcac cagcttcaag ctcatgtgga caagatgccc 240

ctgctgagct gccagttcct gaagggtcac cgggagcagc gcctggccca cctggtcctg 300

agcttcctca ccatgggtta tgtctggcag gaaggagagg cgcagcctgc agaggtcctg 360

ccaaggaatc ttgcccttcc atttgtcgaa gtctccagga acttggggct ccctcctatc 420

ctggtccact cagacttggt gctgacgaac tggaccaaaa aagatccaga cggattcctg 480

gaaattggga acctggagac catcatctca tttcctgggg gagagagcct gcatggtttt 540

atactggtga ctgctttggt agagaaagaa gcagtgcctg ggataaaggc tcttgttcag 600

gccacgaatg ctatcttgca gcccaaccag gaggccctgc tccaagccct gcagcgactg 660

agactgtcta ttcaggacat caccaaaacc ttaggacaga tgcatgatta tgtagatcca 720

gacatatttt atgcaggcat ccggatcttt ctctctggat ggaaagacaa cccagcaatg 780

cctgcagggc tgatgtatga aggagtttcc caagagcccc tgaaatactc cggcgggagt 840

gcagctcaga gcacagtgct tcatgccttt gatgagttct taggcattcg tcatagcaag 900

gaaagtggtg actttctgta cagaatgagg gattacatgc ctccttccca taaggccttc 960

atagaagaca tccactcagc accttccctg agggactaca tcctgtcatc tggacaggac 1020

cacttgctga cagcttataa ccagtgtgtg caggccctgg cagagctgcg gagctatcac 1080

atcaccatgg tcaccaaata cctcatcaca gctgcagcca aggcaaagca tgggaagcca 1140

aaccatctcc cagggcctcc tcaggcttta aaagacaggg gcacaggtgg aaccgcagtt 1200

atgagctttc ttaagagtgt cagggataag accttggagt caatccttca cccacgtggt 1260

<210> 57

<211> 2310

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> signal transducer and activator of transcription 3

(STAT3)

<400> 57

atggcccaat ggaatcagct acagcagctt gacacacggt acctggagca gctccatcag 60

ctctacagtg acagcttccc aatggagctg cggcagtttc tggccccttg gattgagagt 120

caagattggg catatgcggc cagcaaagaa tcacatgcca ctttggtgtt tcataatctc 180

ctgggagaga ttgaccagca gtatagccgc ttcctgcaag agtcgaatgt tctctatcag 240

cacaatctac gaagaatcaa gcagtttctt cagagcaggt atcttgagaa gccaatggag 300

attgcccgga ttgtggcccg gtgcctgtgg gaagaatcac gccttctaca gactgcagcc 360

actgcggccc agcaaggggg ccaggccaac caccccacag cagccgtggt gacggagaag 420

cagcagatgc tggagcagca ccttcaggat gtccggaaga gagtgcagga tctagaacag 480

aaaatgaaag tggtagagaa tctccaggat gactttgatt tcaactataa aaccctcaag 540

agtcaaggag acatgcaaga tctgaatgga aacaaccagt cagtgaccag gcagaagatg 600

cagcagctgg aacagatgct cactgcgctg gaccagatgc ggagaagcat cgtgagtgag 660

ctggcggggc ttttgtcagc gatggagtac gtgcagaaaa ctctcacgga cgaggagctg 720

gctgactgga agaggcggca acagattgcc tgcattggag gcccgcccaa catctgccta 780

gatcggctag aaaactggat aacgtcatta gcagaatctc aacttcagac ccgtcaacaa 840

attaagaaac tggaggagtt gcagcaaaaa gtttcctaca aaggggaccc cattgtacag 900

caccggccga tgctggagga gagaatcgtg gagctgttta gaaacttaat gaaaagtgcc 960

tttgtggtgg agcggcagcc ctgcatgccc atgcatcctg accggcccct cgtcatcaag 1020

accggcgtcc agttcactac taaagtcagg ttgctggtca aattccctga gttgaattat 1080

cagcttaaaa ttaaagtgtg cattgacaaa gactctgggg acgttgcagc tctcagagga 1140

tcccggaaat ttaacattct gggcacaaac acaaaagtga tgaacatgga agaatccaac 1200

aacggcagcc tctctgcaga attcaaacac ttgaccctga gggagcagag atgtgggaat 1260

gggggccgag ccaattgtga tgcttccctg attgtgactg aggagctgca cctgatcacc 1320

tttgagaccg aggtgtatca ccaaggcctc aagattgacc tagagaccca ctccttgcca 1380

gttgtggtga tctccaacat ctgtcagatg ccaaatgcct gggcgtccat cctgtggtac 1440

aacatgctga ccaacaatcc caagaatgta aacttttta ccaagccccc aattggaacc 1500

tgggatcaag tggccgaggt cctgagctgg cagttctcct ccaccaccaa gcgaggactg 1560

agcatcgagc agctgactac actggcagag aaactcttgg gacctggtgt gaattattca 1620

gggtgtcaga tcacatgggc taaattttgc aaagaaaaca tggctggcaa gggcttctcc 1680

ttctgggtct ggctggacaa tatcattgac cttgtgaaaa agtacatcct ggccctttgg 1740

aacgaagggt acatcatggg ctttatcagt aaggagcggg agcgggccat cttgagcact 1800

aagcctccag gcaccttcct gctaagattc agtgaaagca gcaaagaagg aggcgtcact 1860

ttcacttggg tggagaagga catcagcggt aagacccaga tccagtccgt ggaaccatac 1920

acaaagcagc agctgaacaa catgtcattt gctgaaatca tcatgggcta taagatcatg 1980

gatgctacca atatcctggt gtctccactg gtctatctct atcctgacat tcccaaggag 2040

gaggcattcg gaaagtattg tcggccagag agccaggagc atcctgaagc tgacccaggt 2100

agcgctgccc catacctgaa gaccaagttt atctgtgtga caccaacgac ctgcagcaat 2160

accattgacc tgccgatgtc cccccgcact ttagattcat tgatgcagtt tggaaataat 2220

ggtgaaggtg ctgaaccctc agcaggaggg cagtttgagt ccctcacctt tgacatggag 2280

ttgacctcgg agtgcgctac ctcccccatg 2310

<210> 58

<211> 1575

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> lymphocyte-activation gene 3 (LAG3)

<400> 58

atgtgggagg ctcagttcct gggcttgctg tttctgcagc cgctttgggt ggctccagtg 60

aagcctctcc agccaggggc tgaggtcccg gtggtgtggg cccaggaggg ggctcctgcc 120

cagctcccct gcagccccac aatccccctc caggatctca gccttctgcg aagagcaggg 180

gtcacttggc agcatcagcc agacagtggc ccgcccgctg ccgcccccgg ccatcccctg 240

gcccccggcc ctcacccggc ggcgccctcc tcctgggggc ccaggccccg ccgctacacg 300

gtgctgagcg tgggtcccgg aggcctgcgc agcgggaggc tgcccctgca gccccgcgtc 360

cagctggatg agcgcggccg gcagcgcggg gacttctcgc tatggctgcg cccagcccgg 420

cgcgcggacg ccggcgagta ccgcgccgcg gtgcacctca gggaccgcgc cctctcctgc 480

cgcctccgtc tgcgcctggg ccaggcctcg atgactgcca gccccccagg atctctcaga 540

gcctccgact gggtcatttt gaactgctcc ttcagccgcc ctgaccgccc agcctctgtg 600

cattggttcc ggaaccgggg ccagggccga gtccctgtcc gggagtcccc ccatcaccac 660

ttagcggaaa gcttcctctt cctgccccaa gtcagcccca tggactctgg gccctggggc 720

tgcatcctca cctacagaga tggcttcaac gtctccatca tgtataacct cactgttctg 780

ggtctggagc ccccaactcc cttgacagtg tacgctggag caggttccag ggtggggctg 840

ccctgccgcc tgcctgctgg tgtggggacc cggtctttcc tcactgccaa gtggactcct 900

cctgggggag gccctgacct cctggtgact ggagacaatg gcgactttac ccttcgacta 960

gaggatgtga gccaggccca ggctgggacc tacacctgcc atatccatct gcaggaacag 1020

cagctcaatg ccactgtcac attggcaatc atcacagtga ctcccaaatc ctttgggtca 1080

cctggatccc tggggaagct gctttgtgag gtgactccag tatctggaca agaacgcttt 1140

gtgtggagct ctctggacac cccatcccag aggagtttct caggaccttg gctggaggca 1200

caggaggccc agctcctttc ccagccttgg caatgccagc tgtaccaggg ggagaggctt 1260

cttggagcag cagtgtactt cacagagctg tctagcccag gtgcccaacg ctctgggaga 1320

gccccaggtg ccctcccagc aggccacctc ctgctgtttc tcatccttgg tgtcctttct 1380

ctgctccttt tggtgactgg agcctttggc tttcaccttt ggagaagaca gtggcgacca 1440

agacgatttt ctgccttaga gcaagggatt caccctccgc aggctcagag caagatagag 1500

gagctggagc aagaaccgga gccggagccg gagccggaac cggagcccga gcccgagccc 1560

gagccggagc agctc 1575

<210> 59

<211> 903

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> T cell immunoglobulin and mucin-domain

containing-3 (TIM-3)

<400> 59

atgttttcac atcttccctt tgactgtgtc ctgctgctgc tgctgctact acttacaagg 60

tcctcagaag tggaatacag agcggaggtc ggtcagaatg cctatctgcc ctgcttctac 120

accccagccg ccccagggaa cctcgtgccc gtctgctggg gcaaaggagc ctgtcctgtg 180

tttgaatgtg gcaacgtggt gctcaggact gatgaaaggg atgtgaatta ttggacatcc 240

agatactggc taaatgggga tttccgcaaa ggagatgtgt ccctgaccat agagaatgtg 300

actctagcag acagtgggat ctactgctgc cggatccaaa tcccaggcat aatgaatgat 360

gaaaaattta acctgaagtt ggtcatcaaa ccagccaagg tcacccctgc accgactcgg 420

cagagagact tcactgcagc ctttccaagg atgcttacca ccaggggaca tggcccagca 480

gagacacaga cactggggag cctccctgat ataaatctaa cacaaatatc cacattggcc 540

aatgagttac gggactctag attggccaat gacttacggg actctggagc aaccatcaga 600

ataggcatct acatcggagc agggatctgt gctgggctgg ctctggctct tatcttcggc 660

gctttaattt tcaaatggta ttctcatagc aaagagaaga tacagaattt aagcctcatc 720

tctttggcca acctccctcc ctcaggattg gcaaatgcag tagcagaggg aattcgctca 780

gaagaaaaca tctataccat tgaagagaac gtatatgaag tggaggagcc caatgagtat 840

tattgctatg tcagcagcag gcagcaaccc tcacaacctt tgggttgtcg ctttgcaatg 900

cca 903

<210> 60

<211> 732

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

(TIGIT), isoform 1

<400> 60

atgcgctggt gtctcctcct gatctgggcc caggggctga ggcaggctcc cctcgcctca 60

ggaatgatga caggcacaat agaaacaacg gggaacattt ctgcagagaa aggtggctct 120

atcatcttac aatgtcacct ctcctccacc acggcacaag tgacccaggt caactgggag 180

cagcaggacc agcttctggc catttgtaat gctgacttgg ggtggcacat ctccccatcc 240

ttcaaggatc gagtggcccc aggtcccggc ctgggcctca ccctccagtc gctgaccgtg 300

aacgatacag gggagtactt ctgcatctat cacacctacc ctgatgggac gtacactggg 360

agaatcttcc tggaggtcct agaaagctca gtggctgagc acggtgccag gttccagatt 420

ccattgcttg gagccatggc cgcgacgctg gtggtcatct gcacagcagt catcgtggtg 480

gtcgcgttga ctagaaagaa gaaagccctc agaatccatt ctgtggaagg tgacctcagg 540

agaaaatcag ctggacagga ggaatggagc cccagtgctc cctcaccccc aggaagctgt 600

gtccaggcag aagctgcacc tgctgggctc tgtggagagc agcggggaga ggactgtgcc 660

gagctgcatg actacttcaa tgtcctgagt tacagaagcc tgggtaactg cagcttcttc 720

acagagactg gt 732

<210> 61

<211> 1065

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> GALECTIN-9/LGALS9, isoform 1

<400> 61

atggccttca gcggttccca ggctccctac ctgagtccag ctgtcccctt ttctgggact 60

attcaaggag gtctccagga cggacttcag atcactgtca atgggaccgt tctcagctcc 120

agtggaacca ggtttgctgt gaactttcag actggcttca gtggaaatga cattgccttc 180

cacttcaacc ctcggtttga agatggaggg tacgtggtgt gcaacacgag gcagaacgga 240

agctgggggc ccgaggagag gaagacacac atgcctttcc agaaggggat gcccctttgac 300

ctctgcttcc tggtgcagag ctcagatttc aaggtgatgg tgaacgggat cctcttcgtg 360

cagtacttcc accgcgtgcc cttccaccgt gtggacacca tctccgtcaa tggctctgtg 420

cagctgtcct acatcagctt ccagaacccc cgcacagtcc ctgttcagcc tgccttctcc 480

acggtgccgt tctcccagcc tgtctgtttc ccacccaggc ccaggggcg cagacaaaaa 540

cctcccggcg tgtggcctgc caacccggct cccattaccc agacagtcat ccacacagtg 600

cagagcgccc ctggacagat gttctctact cccgccatcc cacctatgat gtacccccac 660

cccgcctatc cgatgccttt catcaccacc attctgggag ggctgtaccc atccaagtcc 720

atcctcctgt caggcactgt cctgcccagt gctcagaggt tccacatcaa cctgtgctct 780

gggaaccaca tcgccttcca cctgaacccc cgttttgatg agaatgctgt ggtccgcaac 840

acccagatcg acaactcctg ggggtctgag gagcgaagtc tgccccgaaa aatgcccttc 900

gtccgtggcc agagcttctc agtgtggatc ttgtgtgaag ctcactgcct caaggtggcc 960

gtggatggtc agcacctgtt tgaatactac catcgcctga ggaacctgcc caccatcaac 1020

agactggaag tgggggggcga catccagctg acccatgtgc agaca 1065

<210> 62

<211> 720

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> LIGHT/TNSF14

<400> 62

atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagtg tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60

ttcacgaggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120

ggtctcttgc tgttgctgat gggggccggg ctggccgtcc aaggctggtt cctcctgcag 180

ctgcactggc gtctaggaga gatggtcacc cgcctgcctg acggacctgc aggctcctgg 240

gagcagctga tacaagagcg aaggtctcac gaggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300

gccaactcca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca gctgggcctg 360

gccttcctga ggggcctcag ctaccacgat ggggcccttg tggtcaccaa agctggctac 420

tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgctggg cctggccagc 480

accatcaccc acggcctcta caagcgcaca ccccgctacc ccgaggagct ggagctgttg 540

gtcagccagc agtcaccctg cggacgggcc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600

agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggaga aggtggtcgt ccgtgtgctg 660

gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggtctt acttcggggc tttcatggtg 720

<210> 63

<211> 849

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HVEM/TNSFR14 (receptor for LIGHT ligand)

<400> 63

atggagcctc ctggagactg ggggcctcct ccctggagat ccacccccaa aaccgacgtc 60

ttgaggctgg tgctgtatct caccttcctg ggagcccccc gctacgcccc agctctgccg 120

tcctgcaagg aggacgagta cccagtgggc tccgagtgct gccccaagtg cagtccaggt 180

tatcgtgtga aggaggcctg cggggagctg acgggcacag tgtgtgaacc ctgccctcca 240

ggcacctaca ttgcccacct caatggccta agcaagtgtc tgcagtgcca aatgtgtgac 300

ccagccatgg gcctgcgcgc gagccggaac tgctccagga cagagaacgc cgtgtgtggc 360

tgcagcccag gccacttctg catcgtccag gacggggacc actgcgccgc gtgccgcgct 420

tacgccacct ccagcccggg ccagagggtg cagaagggag gcaccgagag tcaggacacc 480

ctgtgtcaga actgcccccc ggggaccttc tctcccaatg ggaccctgga ggaatgtcag 540

caccagacca agtgcagctg gctggtgacg aaggccggag ctgggaccag cagctcccac 600

tgggtatggt ggtttctctc agggagcctc gtcatcgtca ttgtttgctc cacagttggc 660

ctaatcatat gtgtgaaaag aagaaagcca aggggtgatg tagtcaaggt gatcgtctcc 720

gtccagcgga aaagacagga ggcagaaggt gaggccacag tcattgaggc cctgcaggcc 780

cctccggacg tcaccacggt ggccgtggag gagacaatac cctcattcac ggggaggagc 840

ccaaaccac 849

<210> 64

<211> 660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<400> 64

atgctcaggc tgctcttggc tctcaactta ttcccttcaa ttcaagtaac aggaaacaag 60

attttggtga agcagtcgcc catgcttgta gcgtacgaca atgcggtcaa ccttagctgc 120

aagtattcct acaatctctt ctcaagggag ttccgggcat cccttcacaa aggactggat 180

agtgctgtgg aagtctgtgt tgtatatggg aattactccc agcagcttca ggtttactca 240

aaaacggggt tcaactgtga tgggaaattg ggcaatgaat cagtgacatt ctacctccag 300

aatttgtatg ttaaccaaac agatatttac ttctgcaaaa ttgaagttat gtatcctcct 360

ccttacctag acaatgagaa gagcaatgga accattatcc atgtgaaagg gaaacacctt 420

tgtccaagtc ccctatttcc cggaccttct aagccctttt gggtgctggt ggtggttggt 480

ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg 540

agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg 600

cccacccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc 660

<210> 65

<211> 1578

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> carcinoembryonic antigen-related cell adhesion
molecule 1 (CEACAM1, or CD66a)

<400> 65

atggggcacc tctcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gcttctgctc 60

acagcctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc 120

atgccattca atgttgcaga ggggaaggag gttcttctcc ttgtccacaa tctgccccag 180

caacttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 240

ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg caaacagcgg tcgagagaca 300

atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcaccc agaatgacac aggattctac 360

accctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggaca gttccatgta 420

tacccggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag 480

gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 540

aacaatcaga gcctcccggt cagtcccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600

actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggaccctatg agtgtgaaat acagaaccca 660

gtgagtgcga accgcagtga cccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 720

accatttccc cttcagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctcctgctat 780

gcagcctcta acccacctgc acagtactcc tggcttatca atggaacatt ccagcaaagc 840

acacaagagc tctttatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 900

gccaataact cagtcactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgag 960

ctaagtccag tagtagcaaa gccccaaatc aaagccagca agaccacagt cacaggagat 1020

aaggactctg tgaacctgac ctgctccaca aatgacactg gaatctccat ccgttggttc 1080

ttcaaaaacc agagtctccc gtcctcggag aggatgaagc tgtcccaggg caacaccacc 1140

ctcagcataa accctgtcaa gagggaggat gctgggacgt attggtgtga ggtcttcaac 1200

ccaatcagta agaaccaaag cgaccccatc atgctgaacg taaactataa tgctctacca 1260

caagaaaatg gcctctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg 1320

gttgctctga tagcagtagc cctggcatgt tttctgcatt tcgggaagac cggcagggca 1380

agcgaccagc gtgatctcac agagcacaaa ccctcagtct ccaaccacac tcaggaccac 1440

tccaatgacc cacctaacaa gatgaatgaa gttacttatt ctaccctgaa ctttgaagcc 1500

cagcaaccca cacaaccaac ttcagcctcc ccatccctaa cagccacaga aataatttat 1560

tcagaagtaa aaaagcag 1578

<210> 66

<211> 864

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD80/B7-1

<400> 66

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60

cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120

gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180

caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240

atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300

attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360

tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420

gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480

atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540

gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600

agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660

ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720

gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780

tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840

agaagggaaa gtgtacgccc tgta 864

<210> 67

<211> 995

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD86/B7-2

<400> 67

cagccaaaat ggatccccag tgcactatgg gactgagtaa cattctcttt gtgatggcct 60

tcctgctctc tggtgctgct cctctgaaga ttcaagctta tttcaatgag actgcagacc 120

tgccatgcca atttgcaaac tctcaaaacc aaagcctgag tgagctagta gtattttggc 180

aggaccagga aaacttggtt ctgaatgagg tatacttagg caaagagaaa tttgacagtg 240

ttcattccaa gtatatgggc cgcacaagtt ttgattcgga cagttggacc ctgagacttc 300

acaatcttca gatcaaggac aagggcttgt atcaatgtat catccatcac aaaaagccca 360

caggaatgat tcgcatccac cagatgaatt ctgaactgtc agtgcttgct aacttcagtc 420

aacctgaaat agtaccaatt tctaatataa cagaaaatgt gtacataaat ttgacctgct 480

catctataca cggttaccca gaacctaaga agatgagtgt tttgctaaga accaagaatt 540

caactatcga gtatgatggt attatgcaga aatctcaaga taatgtcaca gaactgtacg 600

acgtttccat cagcttgtct gtttcattcc ctgatgttac gagcaatatg accatcttct 660

gtattctgga aactgacaag acgcggcttt tatcttcacc tttctctata gagcttgagg 720

accctcagcc tcccccagac cacattcctt ggattacagc tgtacttcca acagttatta 780

tatgtgtgat ggttttctgt ctaattctat ggaaatggaa gaagaagaag cggcctcgca 840

actcttataa atgtggaacc aacacaatgg agagggaaga gagtgaacag accaagaaaa 900

gagaaaaaat ccatatacct gaaagatctg atgaagccca gcgtgttttt aaaagttcga 960

agacatcttc atgcgacaaa agtgatacat gtttt 995

<210> 68

<211> 1095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD244/2B4

<400> 68

atgctggggc aagtggtcac cctcatactc ctcctgctcc tcaaggtgta tcagggcaaa 60

ggatgccagg gatcagctga ccatgtggtt agcatctcgg gagtgcctct tcagttacaa 120

ccaaacagca tacagacgaa ggttgacagc attgcatgga agaagttgct gccctcacaa 180

aatggatttc atcacatatt gaagtgggag aatggctctt tgccttccaa tacttccaat 240

gatagattca gttttatagt caagaacttg agtcttctca tcaaggcagc tcagcagcag 300

gacagtggcc tctactgcct ggaggtcacc agtatatctg gaaaagttca gacagccacg 360

ttccaggttt ttgtatttga taaagttgag aaaccccgcc tacaggggca ggggaagatc 420

ctggacagag ggagatgcca agtggctctg tcttgcttgg tctccaggga tggcaatgtg 480

tcctatgctt ggtacagagg gagcaagctg atccagacag cagggaacct cacctacctg 540

gacgaggagg ttgacattaa tggcactcac acatatacct gcaatgtcag caatcctgtt 600

agctgggaaa gccacaccct gaatctcact caggactgtc agaatgccca tcaggaattc 660

agattttggc cgtttttggt gatcatcgtg attctaagcg cactgttcct tggcaccctt 720
gcctgcttct gtgtgtggag gagaaagagg aaggagaagc agtcagagac cagtcccaag 780
gaatttttga caatttacga agatgtcaag gatctgaaaa ccaggagaaa tcacgagcag 840
gagcagactt ttcctggagg ggggagcacc atctactcta tgatccagtc ccagtcttct 900
gctcccacgt cacaagaacc tgcatataca ttatattcat taattcagcc ttccaggaag 960
tctggatcca ggaagaggaa ccacagccct tccttcaata gcactatcta tgaagtgatt 1020
ggaaagagtc aacctaaagc ccagaaccct gctcgattga gccgcaaaga gctggagaac 1080
tttgatgttt attcc 1095

<210> 69
<211> 1251
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> CD155/PVR
<400> 69
atggcccgag ccatggccgc cgcgtggccg ctgctgctgg tggcgctact ggtgctgtcc 60
tggccacccc caggaaccgg ggacgtcgtc gtgcaggcgc ccacccaggt gcccggcttc 120
ttgggcgact ccgtgacgct gccctgctac ctacaggtgc ccaacatgga ggtgacgcat 180
gtgtcacagc tgacttgggc gcggcatggt gaatctggca gcatggccgt cttccaccaa 240
acgcagggcc ccagctattc ggagtccaaa cggctggaat tcgtggcagc cagactgggc 300
gcggagctgc ggaatgcctc gctgaggatg ttcgggttgc gcgtagagga tgaaggcaac 360

tacacctgcc tgttcgtcac gttcccgcag ggcagcagga gcgtggatat ctggctccga 420
gtgcttgcca agccccagaa cacagctgag gttcagaagg tccagctcac tggagagcca 480
gtgcccatgg cccgctgcgt ctccacaggg ggtcgcccgc cagcccaaat cacctggcac 540
tcagacctgg gcgggatgcc caatacgagc caggtgccag ggttcctgtc tggcacagtc 600
actgtcacca gcctctggat attggtgccc tcaagccagg tggacggcaa gaatgtgacc 660
tgcaaggtgg agcacgagag ctttgagaag cctcagctgc tgactgtgaa cctcaccgtg 720
tactaccccc cagaggtatc catctctggc tatgataaca actggtacct tggccagaat 780
gaggccaccc tgacctgcga tgctcgcagc aacccagagc ccacaggcta taattggagc 840

acgaccatgg gtcccctgcc acccctttgct gtggcccagg gcgcccagct cctgatccgt 900

cctgtggaca aaccaatcaa cacaacttta atctgcaacg tcaccaatgc cctaggagct 960

cgccaggcag aactgaccgt ccaggtcaaa gagggacctc ccagtgagca ctcaggcatg 1020

tcccgtaacg ccatcatctt cctggttctg ggaatcctgg tttttctgat cctgctgggg 1080

atcgggattt atttctattg gtccaaatgt tcccgtgagg tcctttggca ctgtcatctg 1140

tgtccctcga gtacagagca tgccagcgcc tcagctaatg ggcatgtctc ctattcagct 1200

gtgagcagag agaacagctc ttcccaggat ccacagacag agggcacaag g 1251

<210

> 70

<211> 1614

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD122/nectin-2

<400> 70

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatctccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300

gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540

gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660

agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacaggcggc 1080

atcatcgggg gcatcatcgc cgccatcatt gctactgctg tggctgccac gggcatcctt 1140

atctgccggc agcagcggaa ggagcagacg ctgcaggggg cagaggagga cgaagacctg 1200

gagggacctc cctcctacaa gccaccgacc ccaaaagcga agctggaggc acaggagatg 1260

ccctcccagc tcttcactct gggggcctcg gagcacagcc cactcaagac cccctacttt 1320

gatgctggcg cctcatgcac tgagcaggaa atgcctcgat accatgagct gcccaccttg 1380

gaagaacggt caggaccctt gcaccctgga gccacaagcc tggggtcccc catcccggtg 1440

cctccagggc cacctgctgt ggaagacgtt tccctggatc tagaggatga ggagggggag 1500

gaggaggaag agtatctgga caagatcaac cccatctatg atgctctgtc ctatagcagc 1560

ccctctgatt cctaccaggg caaaggcttt gtcatgtccc gggccatgta tgtg 1614

<210> 71

<211> 1008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD226 antigen

<400> 71

atggattatc ctactttact tttggctctt cttcatgtat acagagctct atgtgaagag 60

gtgctttggc atacatcagt tccctttgcc gagaacatgt ctctagaatg tgtgtatcca 120

tcaatgggca tcttaacaca ggtggagtgg ttcaagatcg ggacccagca ggattccata 180

gccattttca gccctactca tggcatggtc ataaggaagc cctatgctga gagggtttac 240

tttttgaatt caacgatggc ttccaataac atgactcttt tctttcggaa tgcctctgaa 300

gatgatgttg gctactattc ctgctctctt tacacttacc cacagggaac ttggcagaag 360

gtgatacagg tggttcagtc agatagtttt gaggcagctg tgccatcaaa tagccacatt 420

gtttcggaac ctggaaagaa tgtcacactc acttgtcagc ctcagatgac gtggcctgtg 480

caggcagtga ggtgggaaaa gatccagccc cgtcagatcg acctcttaac ttactgcaac 540

ttggtccatg gcagaaattt cacctccaag ttcccaagac aaatagtgag caactgcagc 600

cacggaaggt ggagcgtcat cgtcatcccc gatgtcacag tctcagactc ggggctttac 660

cgctgctact tgcaggccag cgcaggagaa aacgaaacct tcgtgatgag attgactgta 720

gccgagggta aaaccgataa ccaatatacc ctctttgtgg ctggagggac agttttattg 780

ttgttgtttg ttatctcaat taccaccatc attgtcattt tccttaacag aaggagaagg 840

agagagagaa gagatctatt tacagagtcc tgggatacac agaaggcacc caataactat 900

agaagtccca tctctaccag tcaacctacc aatcaatcca tggatgatac aagagaggat 960

atttatgtca actatccaac cttctctcgc agaccaaaga ctagagtt 1008

<210> 72

<211> 545

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD160 antigen

<400> 72

ggatgctgtt ggaacccggc agaggctgct gtgccctggc catcctgctg gcaattgtgg 60

acatccagtc tggtggatgc attaacatca ccagctcagc ttcccaggaa ggaacgcgac 120

taaacttaat ctgtactgta tggcataaga aagaagaggc tgaggggttt gtagtgtttt 180

tgtgcaagga caggtctgga gactgttctc ctgagaccag tttaaaacag ctgagactta 240

aaagggatcc tgggatagat ggtgttggtg aaatatcatc tcagttgatg ttcaccataa 300

gccaagtcac accgttgcac agtgggacct accagtgttg tgccagaagc cagaagtcag 360

gtatccgcct tcagggccat tttttctcca ttctattcac agagacaggg aactacacag 420

tgacgggatt gaaacaaaga caacaccttg agttcagcca taatgaaggc actctcagtt 480

caggcttcct acaagaaaag gtctgggtaa tgctggtcac cagccttgtg gcccttcaag 540

ctttg 545

<210> 73

<211> 264

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human U6 RNA Pol III promoter

<400> 73

aaggtcgggc aggaagaggg cctatttccc atgattcctt catatttgca tatacgatac 60

aaggctgtta gagagataat tagaattaat ttgactgtaa acacaaagat attagtacaa 120

aatacgtgac gtagaaagta ataatttctt gggtagtttg cagttttaaa attatgtttt 180

aaaatggact atcatatgct taccgtaact tgaaagtatt tcgatttctt ggctttatat 240

atcttgtgga aaggacgaaa ctag 264

<210> 74

<211> 99

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human H1 RNA Pol III promoter

<400> 74

atatttgcat gtcgctatgt gttctgggaa atcaccataa acgtgaaatg tctttggatt 60

tgggaatctt ataagttctg tatgagacca ctccctagg 99

<210> 75

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence targeting muPD-L1

<400> 75

ccggccgaaa tgatacacaa ttcgactcga gtcgaattgt gtatcatttc ggtttttg 58

<210> 76

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence targeting muSIRPA

<400> 76

ccggccacaa ctggaatgtc ttcatctcga gatgaagaca ttccagttgt ggttttt 57

<210> 77

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence targeting muTREX1, clone 1

<400> 77

ccggacaacc aacctaaggc cacatctcga gatgtggcct taggttggtt gttttttg 58

<210> 78

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence targeting muTREX1, clone 2

<400> 78

ccggcctaga tggtaccttc tgtgtctcga gacacagaag gtaccatcta ggtttttg 58

<210> 79

<211> 3966

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector1-human shTREX1-1_shPDL1-1

<400> 79

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccct aaaggaacca attcagtcga gaattggtac 600

catatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat 660

ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actccctagg cagcgcatgg gcgtcaattc 720

tagagattga cgcccatgcg ctgctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc 780

ggccgcaggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag 840

agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt 900

cctcaggtct gcccgggtgg catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg 960

aagttgccac tccagtgccc accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt 1020

ctgactaggt gtccttctat aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc 1080

ccaagttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 1140

tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 1200

tgtatcttat catgtctgga tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc 1260

cttcatattt gcatatacga tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg 1320

taaacacaaa gatattagta caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt 1380

ttgcagtttt aaaattatgt tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt 1440

atttcgattt cttggcttta tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta 1500

gcaatatcta gagtattgct accatactct actttttcg agtagctaga gaattcatgg 1560

taatagcgat gactaatacg tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt 1620

actgggcata atgccaggcg ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg 1680

gcatatgata cacttgatgt actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt 1740

gacgtcaatg gaaagtccct attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca 1800

atgggcgggg gtcgttgggc ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc 1860

ggaactccat atatgggcta tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag 1920

ccatccagct gatatcccat ggtcatagct gtttcctggc agctctggcc cgtgtctcaa 1980

aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat aaaactgtct 2040

gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc 2100

ggaatggtcg gctctgttct catgcaacgc atggtagagg agcgcgattt cgacgctatt 2160

cgccctgttt tcttttctac ctcccagttt ggacaggcgg cgcccacctt cggcgacacc 2220

tccaccggca cgctacagga cgcttttgat ctggatgcgc taaaagcgct cgatatcatc 2280

gtgacctgcc agggcggcga ttataccaac gaaatttatc caaagctgcg cgaaagcgga 2340

tggcagggtt actggattga tgcggcttct acgctgcgca tgaaagatga tgccattatt 2400

attctcgacc cggtcaacca ggacgtgatt accgacggcc tgaacaatgg cgtgaagacc 2460

tttgtgggcg gtaactgtac cgttagcctg atgttgatgt cgctgggcgg tctctttgcc 2520

cataatctcg ttgactgggt atccgtcgcg acctatcagg ccgcctccgg cggcggcgcg 2580

cgccatatgc gcgagctgtt aacccagatg ggtcagttgt atggccatgt cgccgatgaa 2640

ctggcgacgc cgtcttccgc aattcttgat attgaacgca aagttacggc attgacccgc 2700

agcggcgagc tgccggttga taactttggc gtaccgctgg cgggaagcct gatcccctgg 2760

atcgacaaac agctcgataa cggccagagc cgcgaagagt ggaaaggcca ggcggaaacc 2820

aacaagattc tcaatactgc ctctgtgatt ccggttgatg gtttgtgtgt gcgcgtcggc 2880

gcgctgcgct gtcacagcca ggcgttcacc atcaagctga aaaaagaggt atccattccg 2940

acggtggaag aactgctggc ggcacataat ccgtgggcga aagtggtgcc gaacgatcgt 3000

gatatcacta tgcgcgaatt aaccccggcg gcggtgaccg gcacgttgac tacgccggtt 3060

ggtcgtctgc gtaagctgaa catggggcca gagttcttgt cggcgtttac cgtaggcgac 3120

cagttgttat ggggcgccgc cgagccgctg cgtcgaatgc tgcgccagtt ggcgtagtca 3180

gaattggtta attggttgta acactggcag agcattacgc tgacttgacg ggacggcgca 3240

agctcatgac caaaatccct taacgtgagt tacgcgtcgt tccactgagc gtcagacccc 3300

gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg 3360

caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 3420

ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 3480

tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg 3540

ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 3600

tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 3660

cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga 3720

gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 3780

ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 3840

gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg 3900

agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct 3960

tttgct 3966

<210> 80

<211> 3972

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector2-mouse shTREX1-1_shPDL1-1

<400> 80

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccct aaaggaacca attcagtcga gaattggtac 600

catatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat 660

ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actccctaga caaccaacct aaggccacat 720

ctcgagatgt ggccttaggt tggttgtttt tttcgacaga tctggcgcgc catagtggcc 780

agcggccgca ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 840

tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 900

cttcctcagg tctgcccggg tggcatccct gtgacccctc cccagtgcct ctcctggccc 960

tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat aaaattaagt tgcatcattt 1020

tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag gggggtggta tggagcaagg 1080

ggcccaagtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 1140

aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 1200

caatgtatct tatcatgtct ggatccaagg tcgggcagga agagggccta tttcccatga 1260

ttccttcata tttgcatata cgatacaagg ctgttagaga gataattaga attaatttga 1320

ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa tttcttgggt 1380

agtttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa tggactatca tatgcttacc gtaacttgaa 1440

agtatttcga tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaaactag ccgaaatgat 1500

acacaattcg actcgagtcg aattgtgtat catttcggtt ttttcgagta gctagagaat 1560

tcatggtaat agcgatgact aatacgtaga tgtactgcca agtaggaaag tcccataagg 1620

tcatgtactg ggcataatgc caggcgggcc atttaccgtc attgacgtca ataggggggcg 1680

tacttggcat atgatacact tgatgtactg ccaagtgggc agtttaccgt aaatagtcca 1740

cccattgacg tcaatggaaa gtccctattg gcgttactat gggaacatac gtcattattg 1800

acgtcaatgg gcgggggtcg ttgggcggtc agccaggcgg gccatttacc gtaagttatg 1860

taacgcggaa ctccatatat gggctatgaa ctaatgaccc cgtaattgat tactattaat 1920

aactagccat ccagctgata tcccatggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccgtg 1980

tctcaaaatc tctgatgtta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa 2040

ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga aaaatgttgg ttttatcggc 2100

tggcgcggaa tggtcggctc tgttctcatg caacgcatgg tagaggagcg cgatttcgac 2160

gctattcgcc ctgttttctt ttctacctcc cagtttggac aggcggcgcc caccttcggc 2220

gacacctcca ccggcacgct acaggacgct tttgatctgg atgcgctaaa agcgctcgat 2280

atcatcgtga cctgccaggg cggcgattat accaacgaaa tttatccaaa gctgcgcgaa 2340

agcggatggc agggttactg gattgatgcg gcttctacgc tgcgcatgaa agatgatgcc 2400

attattattc tcgacccggt caaccaggac gtgattaccg acggcctgaa caatggcgtg 2460

aagacctttg tgggcggtaa ctgtaccgtt agcctgatgt tgatgtcgct gggcggtctc 2520

tttgcccata atctcgttga ctgggtatcc gtcgcgacct atcaggccgc ctccggcggc 2580

ggcgcgcgcc atatgcgcga gctgttaacc cagatgggtc agttgtatgg ccatgtcgcc 2640

gatgaactgg cgacgccgtc ttccgcaatt cttgatattg aacgcaaagt tacggcattg 2700

acccgcagcg gcgagctgcc ggttgataac tttggcgtac cgctggcggg aagcctgatc 2760

ccctggatcg acaaacagct cgataacggc cagagccgcg aagagtggaa aggccaggcg 2820

gaaaccaaca agattctcaa tactgcctct gtgattccgg ttgatggttt gtgtgtgcgc 2880

gtcggcgcgc tgcgctgtca cagccaggcg ttcaccatca agctgaaaaa agaggtatcc 2940

attccgacgg tggaagaact gctggcggca cataatccgt gggcgaaagt ggtgccgaac 3000

gatcgtgata tcactatgcg cgaattaacc ccggcggcgg tgaccggcac gttgactacg 3060

ccggttggtc gtctgcgtaa gctgaacatg gggccagagt tcttgtcggc gtttaccgta 3120

ggcgaccagt tgttatgggg cgccgccgag ccgctgcgtc gaatgctgcg ccagttggcg 3180

tagtcagaat tggttaattg gttgtaacac tggcagagca ttacgctgac ttgacgggac 3240

ggcgcaagct catgaccaaa atcccttaac gtgagttacg cgtcgttcca ctgagcgtca 3300

gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc 3360

tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 3420

ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt 3480

ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 3540

gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 3600

ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg 3660

tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 3720

cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 3780

agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 3840

agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 3900

gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc 3960

tggccttttg ct 3972

<210> 81

<211> 1281

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> aroA

<400> 81

atggaatccc tgacgttaca acccatcgcg cgggtcgatg gcgccattaa tttacctggc 60

tccaaaagtg tttcaaaccg tgctttgctc ctggcggctt tagcttgtgg taaaaccgct 120

ctgacgaatc tgctggatag cgatgacgtc cgccatatgc tcaatgccct gagcgcgttg 180

gggatcaatt acacccttтc tgccgatcgc acccgctgtg atatcacggg taatggcggc 240

gcattacgtg cgccaggcgc tctggaactg tttctcggta atgccggaac cgcgatgcgt 300

ccgttagcgg cagcgctatg tctggggcaa aatgagatag tgttaaccgg cgaaccgcgt 360

atgaaagagc gtccgatagg ccatctggtc gattcgctgc gtcagggcgg ggcgaatatt 420

gattacctgg agcaggaaaa ctatccgccc ctgcgtctgc gcggcggttt taccggcggc 480

gacattgagg ttgatggtag cgtttccagc cagttcctga ccgctctgct gatgacggcg 540

ccgctggccc ctaaagacac aattattcgc gttaaaggcg aactggtatc aaaaccttac 600

atcgatatca cgctaaattt aatgaaaacc tttggcgtgg agatagcgaa ccaccactac 660

caacaatttg tcgtgaaggg aggtcaacag tatcactctc caggtcgcta tctggtcgag 720

ggcgatgcct cgtcagcgtc ctattttctc gccgctgggg cgataaaagg cggcacggta 780

aaagtgaccg gaattggccg caaaagtatg cagggcgata ttcgttttgc cgatgtgctg 840

gagaaaatgg gcgcgaccat tacctggggc gatgatttta ttgcctgcac gcgcggtgaa 900

ttgcacgcca tagatatgga tatgaaccat attccggatg cggcgatgac gattgccacc 960

acggcgctgt ttgcgaaagg aaccacgacg ttgcgcaata tttataactg gcgagtgaaa 1020

gaaaccgatc gcctgttcgc gatggcgacc gagctacgta aagtgggcgc tgaagtcgaa 1080

gaagggcacg actatattcg tatcacgccg ccggcgaagc tccaacacgc ggatattggc 1140

acgtacaacg accaccgtat ggcgatgtgc ttctcactgg tcgcactgtc cgatacgcca 1200

gttacgatcc tggaccctaa atgtaccgca aaaacgttcc ctgattattt cgaacaactg 1260

gcgcgaatga gtacgcctgc c 1281

<210> 82

<211> 1094

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> aroC

<400> 82

acggagccgt gatggcagga aacacaattg gacaactctt tcgcgtaacc actttcggcg 60

aatcacacgg gctggcgctt gggtgtatcg tcgatggcgt gccgcccggc atcccgttga 120

cggaggccga tctgcaacac gatctcgaca gacgccgccc cggcacctcg cgctatacta 180

cccagcgccg cgaaccggac caggtaaaaa ttctctccgg cgtgtttgat ggcgtgacga 240

ccggcaccag cattggccta ctgattgaaa acaccgatca gcgctcgcag gactacagcg 300

cgattaaaga tgtttttcgt ccgggacacg cggattacac ctatgagcag aaatacggcc 360

tgcgcgatta ccgtggcggt ggacgttctt ccgcgcgtga aaccgcgatg cgcgtagcgg 420

caggggcgat cgccaagaaa tacctggcgg aaaagttcgg catcgaaatc cgcggctgcc 480

tgacccagat gggcgacatt ccgctggaga ttaaagactg gcgtcaggtt gagcttaatc 540

cgttcttttg tcccgatgcg gacaaacttg acgcgctgga cgaactgatg cgcgcgctga 600

aaaaagaggg tgactccatc ggcgcgaaag tgacggtgat ggcgagcggc gtgccggcag 660

ggcttggcga accggtattt gaccgactgg atgcggacat cgcccatgcg ctgatgagca 720

ttaatgcggt gaaaggcgtg gagatcggcg aaggatttaa cgtggtggcg ctgcgcggca 780

gccagaatcg cgatgaaatc acggcgcagg gttttcagag caaccacgct ggcggcatcc 840

tcggtggcat cagtagcggg caacacattg tggcgcatat ggcgctgaaa cctacctcca 900

gcattaccgt gccgggacgt acgatcaacc gggcaggtga agaagtcgaa atgatcacca 960

aagggcgcca cgatccgtgt gtggggattc gcgcagtgcc gatcgcagaa gccatgctgg 1020

cgatcgtgct gatggatcac ctgctgcgcc atcgggcaca gaatgcggat gtaaagacag 1080

agattccacg ctgg 1094

<210> 83

<211> 767

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> aroD

<400> 83

aagggtacca aatgaaaacc gtaactgtaa gagatctcgt ggttggcgaa ggcgcgccaa 60

agatcattgt gtcgctaatg ggaaaaacca ttaccgatgt gaaatcggaa gcactcgcct 120

accgtgaagc ggatttcgat attctggagt ggcgcgttga ccattttgcc aacgtgacaa 180

cggcggaaag cgtacttgag gccgccggcg ccatccggga gattattacc gataaaccct 240

tgctatttac cttccgcagc gcgaaagaag gcggcgaaca ggcgctaacc accggacagt 300

atatcgatct gaatcgtgca gcggttgaca gcggtctggt cgatatgatc gatcttgagc 360

tttttaccgg cgacgatgag gtgaaagcca ccgtcggcta tgctcatcaa cacaatgttg 420

cggtgatcat gtctaaccat gattttcata aaacgcccgc agcggaagag attgttcagc 480

gtctgcgtaa aatgcaggaa ctgggcgctg atattccgaa gatcgccgtc atgccacaga 540

ctaaagccga tgtcctgacc ttacttaccg ccactgtaga aatgcaggag cgctatgcgg 600

atcgtccgat tattaccatg tcgatgtcga aaaccggggt aatatctcgt cttgccggcg 660

aagtgttcgg ttctgcggca acgtttggcg cggtgaaaaa agcatctgcg ccgggacaaa 720

tatcggtagc cgatctgcgt accgtattaa ctatattgca ccaggcg 767

<210> 84

<211> 684

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> PhoP

<400> 84

aagggagaag agatgatgcg cgtactggtt gtagaggata atgcattatt acgccaccac 60

ctgaaggttc agctccagga ttcaggtcac caggtcgatg ccgcagaaga tgccagggaa 120

gctgattact accttaatga acaccttccg gatatcgcta ttgtcgattt aggtctgccg 180

gatgaagacg gcctttcctt aatacgccgc tggcgcagca gtgatgtttc actgccggtt 240

ctggtgttaa ccgcgcgcga aggctggcag gataaagtcg aggttctcag ctccggggcc 300

gatgactacg tgacgaagcc attccacatc gaagaggtaa tggcgcgtat gcaggcgtta 360

atgcgccgta atagcggtct ggcctcccag gtgatcaaca tcccgccgtt ccaggtggat 420

ctctcacgcc gggaattatc cgtcaatgaa gaggtcatca aactcacggc gttcgaatac 480

accattatgg aaacgcttat ccgtaacaac ggtaaagtgg tcagcaaaga ttcgctgatg 540

cttcagctgt atccggatgc ggaactgcgg gaaagtcata ccattgatgt tctcatgggg 600

cgtctgcgga aaaaaataca ggcccagtat ccgcacgatg tcattaccac cgtacgcgga 660

caaggatatc tttttgaatt gcgc 684

<210> 85

<211> 1461

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> PhoQ

<400> 85

atgaataaat ttgctcgcca ttttctgccg ctgtcgctgc gggttcgttt tttgctggcg 60

acagccggcg tcgtgctggt gctttctttg gcatatggca tagtggcgct ggtcggctat 120

agcgtaagtt ttgataaaac cacctttcgt ttgctgcgcg gcgaaagcaa cctgttttat 180

accctcgcca aatgggaaaa taataaaatc agcgttgagc tgcctgaaaa tctggacatg 240

caaagcccga ccatgacgct gatttacgat gaaacgggca aattattatg gacgcagcgc 300

aacattccct ggctgattaa aagcattcaa ccggaatggt taaaaacgaa cggcttccat 360

gaaattgaaa ccaacgtaga cgccaccagc acgctgttga gcgaagacca ttccgcgcag 420

gaaaaactca aagaagtacg tgaagatgac gatgatgccg agatgaccca ctcggtagcg 480

gtaaatattt atcctgccac ggcgcggatg ccgcagttaa ccatcgtggt ggtcgatacc 540

attccgatag aactaaaacg ctcctatatg gtgtggagct ggttcgtata cgtgctggcc 600

gccaatttac tgttagtcat tcctttactg tggatcgccg cctggtggag cttacgccct 660

atcgaggcgc tggcgcggga agtccgcgag cttgaagatc atcaccgcga aatgctcaat 720

ccggagacga cgcgtgagct gaccagcctt gtgcgcaacc ttaatcaact gctcaaaagc 780

gagcgtgaac gttataacaa ataccgcacg accctgaccg acctgacgca cagtttaaaa 840

acgccgctcg cggttttgca gagtacgtta cgctctttac gcaacgaaaa gatgagcgtc 900

agcaaagctg aaccggtgat gctggaacag atcagccgga tttcccagca gatcggctat 960

tatctgcatc gcgccagtat gcgcggtagc ggcgtgttgt taagccgcga actgcatccc 1020

gtcgcgccgt tgttagataa cctgatttct gcgctaaata aagtttatca gcgtaaaggg 1080

gtgaatatca gtatggatat ttcaccagaa atcagttttg tcggcgagca aaacgacttt 1140

gtcgaagtga tgggcaacgt actggacaac gcttgtaaat attgtctgga gtttgtcgag 1200

atttcggctc gccagaccga cgatcatttg catattttcg tcgaagatga cggcccaggc 1260

attccccaca gcaaacgttc cctggtgttt gatcgcggtc agcgcgccga taccctacga 1320

ccaggacaag gcgtggggct ggctgtcgcg cgcgagatta cggaacaata cgccgggcag 1380

atcattgcca gcgacagtct gctcggtggc gcccgtatgg aggtcgtttt tggccgacag 1440

catcccacac agaaagagga a 1461

<210> 86

<211> 2731

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> Adenylate cyclase (cyaA)

<400> 86

tctttcttta cggtcaatga gcaaggtgtt aaattgatca cgttttagac cattttttcg 60

tcggtattag ataaaaatat gcaggcgaga aagggtaacg gttatttttg acatacggtt 120

tatcccgaat ggcgacggtc aagtactgac ctgcaccatg acgggtagca acatcaggcg 180

atacgtcttg tacctctata ttgagactct gaaacagaga ctggatgcca taaatcaact 240

gcgtgtggat cgcgcgcttg ctgccatggg acccgctttt cagcaggttt acagtcttct 300

gccgacatta ttgcactatc accatccact gatgccgggt taccttgatg gtaacgttcc 360

cagcggtatt tgcttctaca cgcctgatga aacccaacgc cactatctga acgaacttga 420

gctgtaccgc ggtatgacgc cgcaggaccc gccgaagggc gagctgccga ttaccggcgt 480

ttacaccatg ggcagcacct cctcggtcgg gcagagctgc tcgtccgacc tggatatctg 540

ggtgtgccat cagtcctggc tcgacggcga agagcgtcag ttgctgcaac gtaagtgtag 600

cctgctggaa agctgggccg cctcgcttgg cgttgaggtg agcttcttcc tgatcgacga 660

gaaccgtttc cgccataacg aaagcggcag tctgggcggg gaagactgtg gttctacgca 720

gcatatcctg ttgcttgatg agttttatcg taccgctgtg cgcctggccg ggaagcgtat 780

cctgtggagt atggtgccgt gcgacgaaga agagcattac gacgactatg tcatgacgct 840

ctatgcgcag ggcgtattaa cgccaaacga atggctggat ctgggggggct taagctcgct 900

ctccgccgaa gagtactttg gcgccagcct gtggcagcta tacaagagca ttgactcgcc 960

gtacaaagcg gtgctgaaaa cgctgctgct ggaagcctat tcatgggaat atcctaaccc 1020

acgtctgctg gcgaaagata ttaaacaacg tctgcatgac ggtgaaatcg tatcgtttgg 1080

actcgatccc tactgcatga tgctggaacg ggtcactgaa tacctgacgg cgattgaaga 1140

tccgacgcgg ctggatttag tccgccgctg cttttacctg aaagtgtgcg agaaattaag 1200

tcgcgagcgt gcctgcgtag gctggcgtcg ggaagtatta agccagttag tcagcgagtg 1260

gggatgggac gacgcgcgtc tgaccatgct cgataatcgc gcaaactgga aaatcgatca 1320

ggtgcgcgaa gcccacaacg aattgctcga cgccatgatg caaagctatc gtaatctgat 1380

tcgctttgcg cggcgcaaca acctcagcgt gagtgccagc ccgcaggata tcggcgtact 1440

gacgcgtaag ctgtacgcgg cttttgaagc gttgccgggt aaagtcacgc tggtgaaccc 1500

gcagatatcg ccggatctgt ccgagccgaa tttaaccttt atccatgtgc cgccgggacg 1560

cgccaaccgt tcaggctggt atctctacaa ccgcgcgccg aacatggatt ccatcatcag 1620

ccatcagccg ctggaatata accgttatct taataagctg gtcgcgtggg cgtggttcaa 1680

cggcctgctg acgtcgcgaa cgcatctgtt tattaagggc aacggtattg tcgacctgcc 1740

taagttacag gagatggtcg ccgatgtttc gcaccatttc ccgctgcgct tgcctgctcc 1800

gacgccgaaa gcgctctaca gcccctgtga aattcgccat ctggcgatta tcgttaacct 1860

cgaatatgac ccgacggcgg cgtttcgcaa taaagtggtc cattttgact tccgtaagct 1920

ggacgttttc agctttggcg aagagcaaaa ctgtctgata ggcagtatcg acttgttata 1980

tcgcaactcg tggaacgaag tgcgtactct gcactttaac ggcgagcagg cgatgatcga 2040

agcgctgaaa acgattctgg ggaaaatgca ccaggatgcc gcgccgccgg atagcgtgga 2100

ggtgttctgc tacagtcagc atcttcgcgg cctgattcgc acccgtgtgc agcaactggt 2160

ctccgaatgt attgagctac gtctttccag cacccgtcag gagaccggtc gcttcaaggc 2220

gctgcgggtt tccgggcaga cgtgggggct attcttcgaa cgcttgaatg tctcggtgca 2280

gaagctggag aacgctatcg aattctacgg cgcgatttcg cataacaagc tgcacgggct 2340

gtcggtacag gtggaaacca accaggtgaa attgccgtca gtggtggatg gcttcgccag 2400

cgaagggatt atccagttct tctttgaaga aacaggcgat gagaaaggct ttaacattta 2460

tattctggat gaaagtaacc gggcggaagt atatcaccac tgcgaaggta gcaaggaaga 2520

actggtgcgc gacgtcagtc gcttctattc gtcatcgcac gatcgcttca cgtatggctc 2580

cagttttatc aactttaacc tgccgcagtt ctaccagata gtgaaaaccg atggccgcgc 2640

gcaggtgatc ccattccgta cgcagcctat caacaccgtg ccgccagcaa accaggatca 2700

tgacgcgccg ctattgcagc agtatttttc g 2731

<210> 87

<211> 826

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> cAMP-activated global transcriptional regulator
(crp)

<400> 87

aagctatgct aaaacagaca agatgctaca gtaatacatt gacgtactgc atgtatgcag 60

aggacatcac attacaggct acaatctatt ttcgtagccc ccttcccagg tagcgggaag 120

tatatttttg caaccccaga gacagtgccg ttttctggct ctggagacag cttataacag 180
aggataaccg cgcatggtgc ttggcaaacc gcaaacagac ccgactcttg aatggttctt 240
gtctcattgc cacattcata agtacccgtc aaagagcacg ctgattcacc agggtgaaaa 300
agcagaaacg ctgtactaca tcgttaaagg ctccgtggca gtgctgatca aagatgaaga 360
agggaaagaa atgatccttt cttatctgaa tcagggtgat tttattggtg aactgggcct 420
gtttgaagaa ggccaggaac gcagcgcctg ggtacgtgcg aaaaccgcat gtgaggtcgc 480
tgaaatttcc tacaaaaaat ttcgccaatt aatccaggtc aacccggata ttctgatgcg 540
cctctcttcc cagatggctc gtcgcttaca agtcacctct gaaaaagtag gtaacctcgc 600

cttccttgac gtcaccgggc gtatcgctca gacgctgctg aatctggcga aacagcccga 660
tgccatgacg cacccggatg ggatgcagat caaaatcact cgtcaggaaa tcggccagat 720
cgtcggctgc tcccgcgaaa ccgttggtcg tattttgaaa atgctggaag atcaaaacct 780
gatctccgcg catggcaaga ccatcgtcgt ctacggcacc cgttaa 826

<210> 88
<211> 1566
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS), isoform 1
<400> 88

atgcagcctt ggcacggaaa ggccatgcag agagcttccg aggccggagc cactgccccc 60
aaggcttccg cacggaatgc caggggcgcc ccgatggatc ccaccgagtc tccggctgcc 120

cccgaggccg ccctgcctaa ggcgggaaag ttcggccccg ccaggaagtc gggatcccgg 180
cagaaaaaga gcgccccgga cacccaggag aggccgcccg tccgcgcaac tggggcccgc 240
gccaaaaagg cccctcagcg cgcccaggac acgcagccgt ctgacgccac cagcgcccct 300
ggggcagagg ggctggagcc tcctgcggct cgggagccgg ctctttccag ggctggttct 360
tgccgccaga ggggcgcgcg ctgctccacg aagccaagac ctccgcccgg gccctgggac 420
gtgcccagcc ccggcctgcc ggtctcggcc cccattctcg tacggaggga tgcggcgcct 480
ggggcctcga agctccgggc ggttttggag aagttgaagc tcagccgcga tgatatctcc 540
acggcggcgg ggatggtgaa aggggttgtg gaccacctgc tgctcagact gaagtgcgac 600

tccgcgttca gaggcgtcgg gctgctgaac accgggagct actatgagca cgtgaagatt 660

tctgcaccta atgaatttga tgtcatgttt aaactggaag tccccagaat tcaactagaa 720

gaatattcca acactcgtgc atattacttt gtgaaattta aaagaaatcc gaaagaaaat 780

cctctgagtc agtttttaga aggtgaaata ttatcagctt ctaagatgct gtcaaagttt 840

aggaaaatca ttaaggaaga aattaacgac attaaagata cagatgtcat catgaagagg 900

aaaagaggag ggagccctgc tgtaacactt cttattagtg aaaaaatatc tgtggatata 960

accctggctt tggaatcaaa aagtagctgg cctgctagca cccaagaagg cctgcgcatt 1020

caaaactggc tttcagcaaa agttaggaag caactacgac taaagccatt ttaccttgta 1080

cccaagcatg caaaggaagg aaatggtttc caagaagaaa catggcggct atccttctct 1140

cacatcgaaa aggaaatttt gaacaatcat ggaaaatcta aaacgtgctg tgaaaacaaa 1200

gaagagaaat gttgcaggaa agattgttta aaactaatga aatacctttt agaacagctg 1260

aaagaaaggt ttaaagacaa aaaacatctg gataaattct cttcttatca tgtgaaaact 1320

gccttctttc acgtatgtac ccagaaccct caagacagtc agtgggaccg caaagacctg 1380

ggcctctgct ttgataactg cgtgacatac tttcttcagt gcctcaggac agaaaaactt 1440

gagaattatt ttattcctga attcaatcta ttctctagca acttaattga caaaagaagt 1500

aaagaatttc tgacaaagca aattgaatat gaaagaaaca atgagtttcc agtttttgat 1560

gaattt 1566

<210> 89

<211> 1137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Stimulator of Interferon Genes (STING)(H232 Allele)

<400> 89

atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtccca ggggtcacgg ggcccagaag 60

gcagccttgg ttctgctgag tgcctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca 120

gagcacactc tccggtacct ggtgctccac ctagcctccc tgcagctggg actgctgtta 180

aacggggtct gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggta ccggggcagc 240

tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg 300

ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggtcg gcccgccctt cacttggatg 360

cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc 420

ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa gggaatttca acgtggccca tgggctggca 480

tggtcatatt acatcggata tctgcggctg atcctgccag agctccaggc ccggattcga 540

acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt 600

ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgaccc caacattcgc 660

ttcctggata aactgcccca gcagaccggt gaccatgctg gcatcaagga tcgggtttac 720

agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag 780

tacgccaccc ccttgcagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc 840

cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccgga cacttgagga catcctggca 900

gatgcccctg agtctcagaa caactgccgc ctcattgcct accaggaacc tgcagatgac 960

agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggcaggagga aaaggaagag 1020

gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtcccaagag 1080

cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag cccctccctc tccgcacgga tttctct 1137

<210> 90

<211> 972

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223

> lipid A biosynthesis myristoyltransferase (msbB)

<400> 90

ttatttgatg ggataaagat ctttacgctt atacggctga atctcgcctg gcttgcgggt 60

tttgagcagc ttcaggatcc aggtgtactg ttccggatgc gggccgacaa aaatttcgac 120

ctcttcgttc atccgtctgg cgatagtgtg gtcgtcagcc gtgagcagat cgtccattgg 180

cgggcgaatc tggatagtca ggcgatgcgt tttaccatta tacaccggga aaagcggtat 240

cacgcgtgcg cggcacactt tcatcagccg accaattgca ggcagcgtcg ctttgtatgt 300

cgcaaagaaa tcaacgaatt cactatgctc cgggccgtga tcctggtccg gcaggtagta 360

accccagtag ccctgacgaa cagactgaat aaagggttta atcccgtcat tacgcgcatg 420

caaacgtccg ccgaaacgcc gacgcactgt gttccagata tagtcaaaaa ccggattacc 480

ctgattatga aacatcgccg ccatttttg cccctgagag gccatcagca tggctggaat 540

gtcgacgccc cagccatgcg gtacgagaaa aatgactttt tcgtcgttac gacgcatctc 600

ctcgataatc tccagacctt cccagtcaac acgctgttga attttttttcg gaccgcgcat 660

cgccaactca gccatcatcg ccattgcctg tggcgcggtg gcgaacatct catcgacaat 720

cgcttcgcgc tcagcttcgc tacgctgcgg aaagcacaac gacagattaa ttagcgcccg 780

gcgacgagaa ctcttcccca gccgtccggc aaaacgcccc agcgtcgcca gcaaagggtc 840

gcggaatgat gccggtgtta atgcgatccc cgccattgcc gccgcgccca accaggcgcc 900

ccaatactgt ggatagcgaa aggatttttc gaattcaggg atatactcac tattattttt 960

tttggtttcc at 972

<210> 91

<211> 1038

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> Phosphoribosylaminoimidazole synthetase (purI)

<400> 91

ttattcaata accacacgct gttcggaatc agaggctttg atgataccga ttttccatgc 60

gttttcacct ttctcgttta gcagagcaag cgctttgtcc gcttccggag cggagagcgc 120

aatcaccatg ccgacgccgc agttaaaggt acggtacatt tcatgtcggc tgacattacc 180

ggcggtttgc agccaggtaa agatggcggg ccactgccag gacgactcat taattaccgc 240

ctgggtattc tccggcagaa cgcgcggaat attttcccaa aagcccccgc cggtgaggtg 300

ggcgatagcg tgtacatcga cgttttcaat cagttccaga accgatttta cgtagatacg 360

ggtcggttca agcagatgat cggccagcgg cttcccttcc agcagagtgg tttgtgggtc 420

gcagccgcta acgtcaataa ttttccgcac cagcgaatat ccattcgagt gcgggccgct 480

ggagccgagt gcaatcagca cgtcgccttc ggcaacccgg gagccgtcga tgatttctga 540

tttttcgact acgccgacgc agaaacccgc cacatcgtaa tcttcgccgt gatacatgcc 600

cggcatttcc gccgtctcgc cgccgaccag cgcgcagccg gattgcaggc agccttcggc 660

aataccgttg atcacgctgg cggcggtatc gacatccagt ttacccgtgg catagtaatc 720

gaggaaaaac agcggttccg cgccctgaac gaccagatcg tttacgcaca ttgccaccag 780

atcaataccg atagcgtcgt gacgctttaa gtccatcgcc aggcgaagtt tggtacctac 840

gccgtcagtg ccggaaacca gtaccggttc acgatatttt tgcggcaacg cgcacagcgc 900

accgaaaccg cccagaccgc ccataacctc cgggcggcga gttttcttca ctacgccttt 960

gattcgatca accagagcgt tacccgcatc aatatcgacg ccggcatctt tatagctaag 1020

agaggtctta tcggtcac 1038

<210> 92

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Survivin (SVN)/BIRC5, isoform 1

<400> 92

atgggtgccc cgacgttgcc ccctgcctgg cagccctttc tcaaggacca ccgcatctct 60

acattcaaga actggccctt cttggagggc tgcgcctgca ccccggagcg gatggccgag 120

gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagact tggcccagtg tttcttctgc 180

ttcaaggagc tggaaggctg ggagccagat gacgacccca tagaggaaca taaaaagcat 240

tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ccttggtgaa 300

tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattg caaaggaaac caacaataag 360

aagaaagaat ttgaggaaac tgcggagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc 420

atggat 426

<210> 93

<211> 285

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> araBAD promoter (pBAD)

<400> 93

aagaaaccaa ttgtccatat tgcatcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60

tctcgctaac caaaccggta accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca 120

aagccatgac aaaaacgcgt aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180

attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240

atcttacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccat 285

<210> 94

<211> 459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Interleukin 2 (IL-2)

<400> 94

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60

gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120

ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180

acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240

gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 300

agacccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 360

acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420

tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 459

<210> 95

<211> 567

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Interferon (IFN) alpha

<400> 95

atggcctcgc cctttgcttt actgatggtc ctggtggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60

tctctgggct gtgatctccc tgagacccac agcctggata acaggaggac cttgatgctc 120

ctggcacaaa tgagcagaat ctctccttcc tcctgtctga tggacagaca tgactttgga 180

tttccccagg aggagtttga tggcaaccag ttccagaagg ctccagccat ctctgtcctc 240

catgagctga tccagcagat cttcaacctc tttaccacaa aagattcatc tgctgcttgg 300

gatgaggacc tcctagacaa attctgcacc gaactctacc agcagctgaa tgacttggaa 360

gcctgtgtga tgcaggagga gagggtggga gaaactcccc tgatgaatgc ggactccatc 420

ttggctgtga agaaatactt ccgaagaatc actctctatc tgacagagaa gaaatacagc 480

ccttgtgcct gggaggttgt cagagcagaa atcatgagat ccctctcttt atcaacaaac 540

ttgcaagaaa gattaaggag gaaggaa 567

<210> 96

<211> 729

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD48, isoform 1

<400> 96

atgtgctcca gaggttggga ttcgtgtctg gctctggaat tgctactgct gcctctgtca 60

ctcctggtga ccagcattca aggtcacttg gtacatatga ccgtggtctc cggcagcaac 120

gtgactctga acatctctga gagcctgcct gagaactaca aacaactaac ctggttttat 180

actttcgacc agaagattgt agaatgggat tccagaaaat ctaagtactt tgaatccaaa 240

tttaaaggca gggtcagact tgatcctcag agtggcgcac tgtacatctc taaggtccag 300

aaagaggaca acagcaccta catcatgagg gtgttgaaaa agactgggaa tgagcaagaa 360

tggaagatca agctgcaagt gcttgaccct gtacccaagc ctgtcatcaa aattgagaag 420

atagaagaca tggatgacaa ctgttatctg aaactgtcat gtgtgatacc tggcgagtct 480

gtaaactaca cctggtatgg ggacaaaagg cccttcccaa aggagctcca gaacagtgtg 540

cttgaaacca cccttatgcc acataattac tccaggtgtt atacttgcca agtcagcaat 600

tctgtgagca gcaagaatgg cacggtctgc ctcagtccac cctgtaccct ggcccggtcc 660

tttggagtag aatggattgc aagttggcta gtggtcacgg tgcccaccat tcttggcctg 720

ttacttacc 729

<210> 97

<211> 1602

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD276/B7-H3, isoform 1

<400> 97

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca 120

ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240

gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300

gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360

acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct 420

ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480

gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540

gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600

ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660

ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720

agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg 780

ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tcccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840

ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900

cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacaa 960

ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020

ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1080

tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140

atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag 1200

ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260

gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1320

cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380

acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1440

ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500

gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560

aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cc 1602

<210> 98

<211> 846

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> B7-H4/VTCN1

<400> 98

atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct 60

ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcaggga gacactccat cacagtcact 120

actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180

gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240

catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg 300

acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg 360

caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat 420

gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480

gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tcccccagcc cacagtggtc 540

tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600

ctgaactctg agaatgtgac catgaaggtt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660

aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagtg 720

acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg 780

tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840

ctaaaa 846

<210> 99

<211> 867

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BTLA/CD272, isoform 1

<400> 99

atgaagacat tgcctgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc 60

ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120

aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg 180

aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240

aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta 300

cattttgaac cagtgcttcc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360

tctaatctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtgcctca 420

gaacgaccct ccaaggacga aatggcaagc agaccctggc tcctgtatag tttacttcct 480

ttgggggggat tgcctctact catcactacc tgtttctgcc tgttctgctg cctgagaagg 540

caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa cctggttgat 600

gctcaccttа agagtgagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660

tcagaaactg gaatttatga taatgaccct gacctttgtt tcaggatgca ggaagggtct 720

gaagtttatt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttccctg 780

aaccattctg tcattggacc gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840

gaatatgcat ccatatgtgt gaggagt 867

<210> 100

<211> 276

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4)

<400> 100

atgaagctct gcgtgactgt cctgtctctc ctcatgctag tagctgcctt ctgctctcca 60

gcgctctcag caccaatggg ctcagaccct cccaccgcct gctgcttttc ttacaccgcg 120

aggaagcttc ctcgcaactt tgtggtagat tactatgaga ccagcagcct ctgctcccag 180

ccagctgtgg tattccaaac caaaagaagc aagcaagtct gtgctgatcc cagtgaatcc 240

tgggtccagg agtacgtgta tgacctggaa ctgaac 276

<210> 101

<211> 3537

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD103/ITGAE

<400> 101

atgtggctct tccacactct gctctgcata gccagcctgg ccctgctggc cgctttcaat 60

gtggatgtgg cccggccctg gctcacgccc aagggaggtg ccccttcgt gctcagctcc 120

cttctgcacc aagaccccag caccaaccag acctggctcc tggtcaccag ccccagaacc 180

aagaggacac cagggcccct ccatcgatgt tcccttgtcc aggatgaaat cctttgccat 240

cctgtagagc atgtccccat ccccaagggg aggcaccggg gagtgaccgt tgtccggagc 300

caccacggtg ttttgatatg cattcaagtg ctggtccggc ggcctcacag cctcagctca 360

gaactcacag gcacctgtag cctcctgggc cctgacctcc gtccccaggc tcaggccaac 420

ttcttcgacc ttgaaaatct cctggatcca gatgcacgtg tggacactgg agactgctac 480

agcaacaaag aaggcggtgg agaagacgat gtgaacacag ccaggcagcg ccgggctctg 540

gagaaggagg aggaggaaga caaggaggag gaggaagacg aggaggagga ggaagctggc 600

accgagattg ccatcatcct ggatggctca ggaagcattg atcccccaga ctttcagaga 660

gccaaagact tcatctccaa catgatgagg aacttctatg aaaagtgttt tgagtgcaac 720

tttgccttgg tgcagtatgg aggagtgatc cagactgagt ttgaccttcg ggacagccag 780

gatgtgatgg cctccctcgc cagagtccag aacatcactc aagtggggag tgtcaccaag 840

actgcctcag ccatgcaaca cgtcttagac agcatcttca cctcaagcca cggctccagg 900

agaaaggcat ccaaggtcat ggtggtgctc accgatggtg gcatattcga ggacccccctc 960

aaccttacga cagtcatcaa ctcccccaaa atgcagggtg ttgagcgctt tgccattggg 1020

gtgggagaag aatttaagag tgctaggact gcgagggaac tgaacctgat cgcctcagac 1080

ccggatgaga cccatgcttt caaggtgacc aactacatgg cgctggatgg gctgctgagc 1140

aaactgcggt acaacatcat cagcatggaa ggcacggttg gagacgccct tcactaccag 1200

ctggcacaga ttggcttcag tgctcagatc ctggatgagc ggcaggtgct gctcggcgcc 1260

gtcggggcct ttgactggtc cggaggggcg ttgctctacg acacacgcag ccgccggggc 1320

cgcttcctga accagacagc ggcggcggcg gcagacgcgg aggctgcgca gtacagctac 1380

ctgggttacg ctgtggccgt gctgcacaag acctgcagcc tctcctacat cgcgggggct 1440

ccacggtaca aacatcatgg ggccgtgttt gagctccaga aggagggcag agaggccagc 1500

ttcctgccag tgctggaggg agagcagatg gggtcctatt ttggctctga gctgtgccct 1560

gtggacattg acatggatgg aagcacggac ttcttgctgg tggctgctcc attttaccac 1620

gttcatggag aagaaggcag agtctacgtg taccgtctca gcgagcagga tggttctttc 1680

tccttggcac gcatactgag tgggcacccc gggttcacca atgcccgctt tggctttgcc 1740

atggcggcta tgggggatct cagtcaggat aagctcacag atgtggccat cggggccccc 1800

ctggaaggtt ttggggcaga tgatggtgcc agcttcggca gtgtgtatat ctacaatgga 1860

cactgggacg gcctctccgc cagcccctcg cagcggatca gagcctccac ggtggcccca 1920

ggactccagt acttcggcat gtccatggct ggtggctttg atattagtgg cgacggcctt 1980

gccgacatca ccgtgggcac tctgggccag gcggttgtgt tccgctcccg gcctgtggtt 2040

cgcctgaagg tctccatggc cttcaccccc agcgcactgc ccatcggctt caacggcgtc 2100

gtgaatgtcc gtttatgttt tgaaatcagc tctgtaacca cagcctctga gtcaggcctc 2160

cgcgaggcac ttctcaactt cacgctggat gtggatgtgg ggaagcagag gagacggctg 2220

cagtgttcag acgtaagaag ctgtctgggc tgcctgaggg agtggagcag cggatcccag 2280

ctttgtgagg acctcctgct catgcccaca gagggagagc tctgtgagga ggactgcttc 2340

tccaatgcca gtgtcaaagt cagctaccag ctccagaccc ctgagggaca gacggaccat 2400

ccccagccca tcctggaccg ctacactgag ccctttgcca tcttccagct gccctatgag 2460

aaggcctgca agaataagct gttttgtgtc gcagaattac agttggccac caccgtctct 2520

cagcaggagt tggtggtggg tctcacaaag gagctgaccc tgaacattaa cctaactaac 2580

tccggggaag attcctacat gacaagcatg gccttgaatt accccagaaa cctgcagttg 2640

aagaggatgc aaaagcctcc ctctccaaac attcagtgtg atgaccctca gccggttgct 2700

tctgtcctga tcatgaactg caggattggt caccccgtcc tcaagaggtc atctgctcat 2760

gtttcagtcg tttggcagct agaggagaat gcctttccaa acaggacagc agacatcact 2820

gtgactgtca ccaattccaa tgaaagacgg tctttggcca acgagaccca cacccttcaa 2880

ttcaggcatg gcttcgttgc agttctgtcc aaaccatcca taatgtacgt gaacacaggc 2940

caggggcttt ctcaccacaa agaattcctc ttccatgtac atggggagaa cctctttgga 3000

gcagaatacc agttgcaaat ttgcgtccca accaaattac gaggtctcca ggttgtagca 3060

gtgaagaagc tgacgaggac tcaggcctcc acggtgtgca cctggagtca ggagcgcgct 3120

tgtgcgtaca gttcggttca gcatgtggaa gaatggcatt cagtgagctg tgtcatcgct 3180

tcagataaag aaaatgtcac cgtggctgca gagatctcct gggatcactc tgaggagtta 3240

ctaaaagatg taactgaact gcagatcctt ggtgaaatat ctttcaacaa atctctatat 3300

gagggactga atgcagagaa ccacagaact aagatcactg tcgtcttcct gaaagatgag 3360

aagtaccatt ctttgcctat catcattaaa ggcagcgttg gtggacttct ggtgttgatc 3420

gtgattctgg tcatcctgtt caagtgtggc ttttttaaaa gaaaatatca acaactgaac 3480

ttggagagca tcaggaaggc ccagctgaaa tcagagaatc tgctcgaaga agagaat 3537

<210> 102

<211> 1671

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD19, isoform 1

<400> 102

atgccacctc ctcgcctcct cttcttcctc ctcttcctca cccccatgga agtcaggccc 60

gaggaacctc tagtggtgaa ggtggaagag ggagataacg ctgtgctgca gtgcctcaag 120

gggacctcag atggccccac tcagcagctg acctggtctc gggagtcccc gcttaaaccc 180

ttcttaaaac tcagcctggg gctgccaggc ctgggaatcc acatgaggcc cctggccatc 240

tggcttttca tcttcaacgt ctctcaacag atgggggget tctacctgtg ccagccgggg 300

ccccctctg agaaggcctg gcagcctggc tggacagtca atgtggaggg cagcggggag 360

ctgttccggt ggaatgtttc ggacctaggt ggcctgggct gtggcctgaa gaacaggtcc 420

tcagagggcc ccagctcccc ttccgggaag ctcatgagcc ccaagctgta tgtgtgggcc 480

aaagaccgcc ctgagatctg ggagggagag cctccgtgtc tcccaccgag ggacagcctg 540

aaccagagcc tcagccagga cctcaccatg gcccctggct ccacactctg gctgtcctgt 600

ggggtacccc ctgactctgt gtccaggggc cccctctcct ggacccatgt gcaccccaag 660

gggcctaagt cattgctgag cctagagctg aaggacgatc gcccggccag agatatgtgg 720

gtaatggaga cgggtctgtt gttgccccgg gccacagctc aagacgctgg aaagtattat 780

tgtcaccgtg gcaacctgac catgtcattc cacctggaga tcactgctcg gccagtacta 840

tggcactggc tgctgaggac tggtggctgg aaggtctcag ctgtgacttt ggcttatctg 900

atcttctgcc tgtgttccct tgtgggcatt cttcatcttc aaagagccct ggtcctgagg 960

aggaaaagaa agcgaatgac tgaccccacc aggagattct tcaaagtgac gcctccccca 1020

ggaagcgggc cccagaacca gtacgggaac gtgctgtctc tccccacacc cacctcaggc 1080

ctcggacgcg cccagcgttg ggccgcaggc ctgggggggca ctgccccgtc ttatggaaac 1140

ccgagcagcg acgtccaggc ggatggagcc ttggggtccc ggagcccgcc gggagtgggc 1200

ccagaagaag aggaagggga gggctatgag gaacctgaca gtgaggagga ctccgagttc 1260

tatgagaacg actccaacct tgggcaggac cagctctccc aggatggcag cggctacgag 1320

aaccctgagg atgagcccct gggtcctgag gatgaagact ccttctccaa cgctgagtct 1380

tatgagaacg aggatgaaga gctgacccag ccggtcgcca ggacaatgga cttcctgagc 1440

cctcatgggt cagcctggga ccccagccgg gaagcaacct ccctggcagg gtcccagtcc 1500

tatgaggata tgagaggaat cctgtatgca gccccccagc tccgctccat tcggggccag 1560

cctggaccca atcatgagga agatgcagac tcttatgaga acatggataa tcccgatggg 1620

ccagacccag cctggggagg agggggccgc atgggcacct ggagcaccag g 1671

<210> 103

<211> 579

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Interleukin 18 (IL-18), isoform 1

<400> 103

atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60

aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120

cttgaatcta aattatcagt cataagaaat ttgaatgacc aagttctctt cattgaccaa 180

ggaaatcggc ctctatttga agatatgact gattctgact gtagagataa tgcaccccgg 240

accatattta ttataagtat gtataaagat agccagccta gaggtatggc tgtaactatc 300

tctgtgaagt gtgagaaaat ttcaactctc tcctgtgaga acaaaattat ttcctttaag 360

gaaatgaatc ctcctgataa catcaaggat acaaaaagtg acatcatatt ctttcagaga 420

agtgtcccag gacatgataa taagatgcaa tttgaatctt catcatacga aggatacttt 480

ctagcttgtg aaaaagagag agacctttt aaactcattt tgaaaaaaga ggatgaattg 540

ggggatagat ctataatgtt cactgttcaa aacgaagac 579

<210> 104

<211> 1005

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Fas ligand

<400> 104

atgctgggca tctggaccct cctacctctg gttcttacgt ctgttgctag attatcgtcc 60

aaaagtgtta atgcccaagt gactgacatc aactccaagg gattggaatt gaggaagact 120

gttactacag ttgagactca gaacttggaa ggcctgcatc atgatggcca attctgccat 180

aagccctgtc ctccaggtga aaggaaagct agggactgca cagtcaatgg ggatgaacca 240

gactgcgtgc cctgccaaga agggaaggag tacacagaca aagcccattt ttcttccaaa 300

tgcagaagat gtagattgtg tgatgaagga catggcttag aagtggaaat aaactgcacc 360

cggacccaga ataccaagtg cagatgtaaa ccaaactttt tttgtaactc tactgtatgt 420

gaacactgtg acccttgcac caaatgtgaa catggaatca tcaaggaatg cacactcacc 480

agcaacacca agtgcaaaga ggaaggatcc agatctaact tggggtggct ttgtcttctt 540

cttttgccaa ttccactaat tgtttgggtg aagagaaagg aagtacagaa aacatgcaga 600

aagcacagaa aggaaaacca aggttctcat gaatctccaa ctttaaatcc tgaaacagtg 660

gcaataaatt tatctgatgt tgacttgagt aaatatatca ccactattgc tggagtcatg 720

acactaagtc aagttaaagg ctttgttcga aagaatggtg tcaatgaagc caaaatagat 780

gagatcaaga atgacaatgt ccaagacaca gcagaacaga aagttcaact gcttcgtaat 840

tggcatcaac ttcatggaaa gaaagaagcg tatgacacat tgattaaaga tctcaaaaaa 900

gccaatcttt gtactcttgc agagaaaatt cagactatca tcctcaagga cattactagt 960

gactcagaaa attcaaactt cagaaatgaa atccaaagct tggtc 1005

<210> 105

<211> 1023

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> firA/SSC

<400> 105

atgccttcaa ttcgactggc tgacttagca gaacagttgg atgcagaatt acacggtgat 60

ggcgatatcg tcatcaccgg cgttgcgtcc atgcaatctg caacaacagg ccacattacg 120

tttatggtga atcctaagta ccgtgaacac ttaggtttat gccaggcttc tgcggttgtc 180

atgacgcagg acgatcttcc ttttgctaag agtgcggcgc tggtagttaa aaatccctac 240

ctgacctacg cgcgcatggc gcaaatttta gatactacgc cgcagcccgc gcagaatatc 300

gcgccaagcg ccgtgattga tgcgacggca acgctgggta gcaatgtttc agtcggcgcg 360

aatgcggtga ttgaatctgg cgtacaactg ggcgataacg tggttatcgg cgcaggctgt 420

ttcgtcggaa aaaatagcaa aatcggggcg ggttcacgct tgtgggcgaa cgtaacgatt 480

taccacgaca ttcagatcgg tgagaattgc ctgatccagt ccagtacggt gatcggcgcg 540

gacggttttg gctacgctaa cgatcgtggc aactgggtga agatcccaca actgggccgg 600

gtcattattg gcgatcgtgt cgagatcggc gcttgtacca ccattgaccg tggcgcgttg 660

gatgatactg ttattggcaa tggcgtgatt attgataatc agtgccagat tgcacataac 720

gtcgtgattg gcgacaatac ggcagttgcc ggtggcgtca ttatggcggg tagcctgaag 780

attggccgtt actgcatgat tggcggcgcc agcgtgatca atgggcatat ggaaatatgc 840

gacaaagtca cggtaactgg catgggtatg gtgatgcgtc ccatcacgga accgggcgtc 900

tactcctcag gcattccgct gcaacccaac aaagtatggc gtaaaactgc tgcactggtg 960

atgaacattg atgatatgag caagcgtctc aaagcgattg agcgcaaggt taatcaacaa 1020

gac 1023

<210> 106

<211> 918

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> htrB

<400> 106

atgacgaatc tacccaagtt ctccaccgca ctgcttcatc cgcgttattg gttaacctgg 60

ttgggtattg gcgtactttg gttagtcgtg caattgccct acccggttat ctaccgcctc 120

ggttgtggat taggaaaact ggcgttacgt tttatgaaac gacgcgcaaa aattgtgcat 180

cgcaacctgg aactgtgctt cccggaaatg agcgaacaag aacgccgtaa aatggtggtg 240

aagaatttcg aatccgttgg catgggcctg atggaaaccg gcatggcgtg gttctggccg 300

gaccgccgaa tcgcccgctg gacggaagtg atcggcatgg aacacattcg tgacgtgcag 360

gcgcaaaaac gcggcatcct gttagttggc atccattttc tgacactgga gctgggtgcg 420

cggcagtttg gtatgcagga accgggtatt ggcgtttatc gcccgaacga taatccactg 480

attgactggc tacaaacctg gggccgtttg cgctcaaata aatcgatgct cgaccgcaaa 540

gatttaaaag gcatgattaa agccctgaaa aaaggcgaag tggtctggta cgcaccggat 600

catgattacg gcccgcgctc aagcgttttc gtcccgttgt ttgccgttga gcaggctgcg 660

accacgaccg gaacctggat gctggcacgg atgtccggcg catgtctggt gcccttcgtt 720

ccacgccgta agccagatgg caaagggtat caattgatta tgctgccgcc agagtgttct 780

ccgccactgg atgatgccga aactaccgcc gcgtggatga acaaagtggt cgaaaaatgc 840

atcatgatgg caccagagca gtatatgtgg ttacaccgtc gctttaaaac acgcccggaa 900

ggcgttcctt cacgctat 918

<210> 107

<211> 717

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223>

ompR

<400> 107

atgcaagaga attataagat tctggtggtt gatgacgata tgcgtctgcg ggcgctactg 60

gaacgttatc tgaccgagca gggcttccag gttcgaagcg tcgctaacgc tgagcagatg 120

gatcgtctgc tgacccgtga atctttccat ctcatggtac tggatttaat gctgccaggt 180

gaagatggtc tgtcgatttg tcgtcgcctg cgtagtcaaa gtaatccaat gccgatcatt 240

atggtcacgg cgaagggtga agaggttgac cgtatcgtcg ggctggaaat cggcgccgat 300

gactacattc ctaaaccgtt taacccgcgc gagctgttgg cgcgtattcg gcccgtgtta 360

cgtcgtcagg caaacgaact gcccggcgcg ccgtcgcagg aagaggccgt tatcgcgttc 420

ggtaagttta aactgaacct cggtacgcgc gagatgttcc gtgaagatga accgatgccg 480

ctgaccagcg gggagtttgc ggtactgaaa gcgttagtca gccatccgcg cgagccgctc 540

tctcgcgata agctgatgaa tctggcccgt ggccgcgagt attccgcgat ggaacgctcc 600

atcgacgtcc agatctcccg cctgcgccgt atggtggaag aagatccggc acatccgcgt 660

tatattcaga ccgtctgggg cctgggctac gtctttgtac cggacggttc taaagca 717

<210> 108

<211> 498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inteferon (IFN) gamma

<400> 108

atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctcttggc 60

tgttactgcc aggacccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca 120
ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa 180
gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct ccttttactt caaacttttt 240
aaaaacttta aagatgacca gagcatccaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg 300
aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat 360
tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg 420
gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga 480
ggtcgaagag catcccag 498

<210> 109
<211> 699
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Tumor necrosis factor (TNF) alpha
<400> 109
atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct ccccaagaag 60
acaggggggc cccagggctc caggcggtgc ttgttcctca gcctcttctc cttcctgatc 120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgcctg ctgcactttg gagtgatcgg cccccagagg 180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaatc agccctctgg cccaggcagt cagatcatct 240
tctcgaaccc cgagtgacaa gcctgtagcc catgttgtag caaaccctca agctgagggg 300
cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga 360

gataaccagc tggtggtgcc atcagagggc ctgtacctca tctactccca ggtcctcttc 420
aagggccaag gctgcccctc cacccatgtg ctcctcaccc acaccatcag ccgcatcgcc 480
gtctcctacc agaccaaggt caacctcctc tctgccatca agagcccctg ccagagggag 540
accccagagg gggctgaggc caagccctgg tatgagccca tctatctggg aggggtcttc 600
cagctggaga agggtgaccg actcagcgct gagatcaatc ggcccgacta tctcgacttt 660
gccgagtctg ggcaggtcta ctttgggatc attgccctg 699
<210> 110
<211> 825
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Atg5 long isoform

<400> 110

atgacagatg acaaagatgt gcttcgagat gtgtggtttg gacgaattcc aacttgtttc 60

acgctatatc aggatgagat aactgaaagg gaagcagaac catactattt gcttttgcca 120

agagtaagtt atttgacgtt ggtaactgac aaagtgaaaa agcactttca gaaggttatg 180

agacaagaag acattagtga gatatggttt gaatatgaag gcacaccact gaaatggcat 240

tatccaattg gtttgctatt tgatcttctt gcatcaagtt cagctcttcc ttggaacatc 300

acagtacatt ttaagagttt tccagaaaaa gaccttctgc actgtccatc taaggatgca 360

attgaagctc attttatgtc atgtatgaaa gaagctgatg ctttaaaaca taaaagtcaa 420

gtaatcaatg aaatgcagaa aaaagatcac aagcaactct ggatgggatt gcaaaatgac 480

agatttgacc agttttgggc catcaatcgg aaactcatgg aatatcctgc agaagaaaat 540

ggatttcgtt atatcccctt tagaatatat cagacaacga ctgaaagacc tttcattcag 600

aagctgtttc gtcctgtggc tgcagatgga cagttgcaca cactaggaga tctcctcaaa 660

gaagtttgtc cttctgctat tgatcctgaa gatggggaaa aaaagaatca agtgatgatt 720

catggaattg agccaatgtt ggaaacacct ctgcagtggc tgagtgaaca tctgagctac 780

ccggataatt ttcttcatat tagtatcatc ccacagccaa cagat 825

<210> 111

<211> 1350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Beclin1

<400> 111

atggaagggt ctaagacgtc caacaacagc accatgcagg tgagcttcgt gtgccagcgc 60

tgcagccagc ccctgaaact ggacacgagt ttcaagatcc tggaccgtgt caccatccag 120

gaactcacag ctccattact taccacagcc caggcgaaac caggagagac ccaggaggaa 180

gagactaact caggagagga gccatttatt gaaactcctc gccaggatgg tgtctctcgc 240

agattcatcc ccccagccag gatgatgtcc acagaaagtg ccaacagctt cactctgatt 300

ggggaggcat ctgatggcgg caccatggag aacctcagcc gaagactgaa ggtcactggg 360

gacctttttg acatcatgtc gggccagaca gatgtggatc acccactctg tgaggaatgc 420

acagatactc ttttagacca gctggacact cagctcaacg tcactgaaaa tgagtgtcag 480

aactacaaac gctgtttgga gatcttagag caaatgaatg aggatgacag tgaacagtta 540

cagatggagc taaaggagct ggcactagag gaggagaggc tgatccagga gctggaagac 600

gtggaaaaga accgcaagat agtggcagaa aatctcgaga aggtccaggc tgaggctgag 660

agactggatc aggaggaagc tcagtatcag agagaataca gtgaatttaa acgacagcag 720

ctggagctgg atgatgagct gaagagtgtt gaaaaccaga tgcgttatgc ccagacgcag 780

ctggataagc tgaagaaaac caacgtcttt aatgcaacct tccacatctg gcacagtgga 840

cagtttggca caatcaataa cttcaggctg ggtcgcctgc ccagtgttcc cgtggaatgg 900

aatgagatta atgctgcttg gggccagact gtgttgctgc tccatgctct ggccaataag 960

atgggtctga aatttcagag ataccgactt gttccttacg gaaaccattc atatctggag 1020

tctctgacag acaaatctaa ggagctgccg ttatactgtt ctgggggggtt gcggtttttc 1080

tgggacaaca agtttgacca tgcaatggtg gctttcctgg actgtgtgca gcagttcaaa 1140

gaagaggttg agaaaggcga gacacgtttt tgtcttccct acaggatgga tgtggagaaa 1200

ggcaagattg aagacacagg aggcagtggc ggctcctatt ccatcaaaac ccagtttaac 1260

tctgaggagc agtggacaaa agctctcaag ttcatgctga cgaatcttaa gtggggtctt 1320

gcttgggtgt cctcacaatt ttataacaaa 1350

<210> 112

<211> 2352

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Toll-like receptor 2 (TLR2)

<400> 112

atgccacata ctttgtggat ggtgtgggtc ttgggggtca tcatcagcct ctccaaggaa 60

gaatcctcca atcaggcttc tctgtcttgt gaccgcaatg gtatctgcaa gggcagctca 120

ggatctttaa actccattcc ctcagggctc acagaagctg taaaaagcct tgacctgtcc 180

aacaacagga tcacctacat tagcaacagt gacctacaga ggtgtgtgaa cctccaggct 240

ctggtgctga catccaatgg aattaacaca atagaggaag attctttttc ttccctgggc 300

agtcttgaac atttagactt atcctataat tacttatcta atttatcgtc ttcctggttc 360

aagccccttt cttctttaac attcttaaac ttactgggaa atccttacaa aaccctaggg 420

gaaacatctc ttttttctca tctcacaaaa ttgcaaatcc tgagagtggg aaatatggac 480

accttcacta agattcaaag aaaagatttt gctggactta ccttccttga ggaacttgag 540

attgatgctt cagatctaca gagctatgag ccaaaaagtt tgaagtcaat tcagaatgta 600

agtcatctga tccttcatat gaagcagcat attttactgc tggagatttt tgtagatgtt 660

acaagttccg tggaatgttt ggaactgcga gatactgatt tggacacttt ccatttttca 720

gaactatcca ctggtgaaac aaattcattg attaaaaagt ttacatttag aaatgtgaaa 780

atcaccgatg aaagtttgtt tcaggttatg aaacttttga atcagatttc tggattgtta 840

gaattagagt ttgatgactg tacccttaat ggagttggta attttagagc atctgataat 900

gacagagtta tagatccagg taaagtggaa acgttaacaa tccggaggct gcatattcca 960

aggttttact tattttatga tctgagcact ttatattcac ttacagaaag agttaaaaga 1020

atcacagtag aaaacagtaa agtttttctg gttccttgtt tactttcaca acatttaaaa 1080

tcattagaat acttggatct cagtgaaaat ttgatggttg aagaatactt gaaaaattca 1140

gcctgtgagg atgcctggcc ctctctacaa actttaattt taaggcaaaa tcatttggca 1200

tcattggaaa aaaccggaga gactttgctc actctgaaaa acttgactaa cattgatatc 1260

agtaagaata gttttcattc tatgcctgaa acttgtcagt ggccagaaaa gatgaaatat 1320

ttgaacttat ccagcacacg aatacacagt gtaacaggct gcattcccaa gacactggaa 1380

attttagatg ttagcaacaa caatctcaat ttatttttctt tgaatttgcc gcaactcaaa 1440

gaactttata tttccagaaa taagttgatg actctaccag atgcctccct cttacccatg 1500

ttactagtat tgaaaatcag taggaatgca ataactacgt tttctaagga gcaacttgac 1560

tcatttcaca cactgaagac tttggaagct ggtggcaata acttcatttg ctcctgtgaa 1620

ttcctctcct tcactcagga gcagcaagca ctggccaaag tcttgattga ttggccagca 1680

aattacctgt gtgactctcc atcccatgtg cgtggccagc aggttcagga tgtccgcctc 1740

tcggtgtcgg aatgtcacag gacagcactg gtgtctggca tgtgctgtgc tctgttcctg 1800

ctgatcctgc tcacgggggt cctgtgccac cgtttccatg gcctgtggta tatgaaaatg 1860

atgtgggcct ggctccaggc caaaaggaag cccaggaaag ctcccagcag gaacatctgc 1920

tatgatgcat ttgtttctta cagtgagcgg gatgcctact gggtggagaa ccttatggtc 1980

caggagctgg agaacttcaa tccccccttc aagttgtgtc ttcataagcg ggacttcatt 2040

cctggcaagt ggatcattga caatatcatt gactccattg aaaagagcca caaaactgtc 2100

tttgtgcttt ctgaaaactt tgtgaagagt gagtggtgca agtatgaact ggacttctcc 2160

catttccgtc tttttgatga gaacaatgat gctgccattc tcattcttct ggagcccatt 2220

gagaaaaaag ccattcccca gcgcttctgc aagctgcgga agataatgaa caccaagacc 2280

tacctggagt ggcccatgga cgaggctcag cgggaaggat tttgggtaaa tctgagagct 2340

gcgataaagt cc 2352

<210> 113

<211> 2517

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR4, isoform 1

<400> 113

atgatgtctg cctcgcgcct ggctgggact ctgatcccag ccatggcctt cctctcctgc 60

gtgagaccag aaagctggga gccctgcgtg gaggtggttc ctaatattac ttatcaatgc 120

atggagctga atttctacaa aatccccgac aacctcccct tctcaaccaa gaacctggac 180

ctgagcttta atcccctgag gcatttaggc agctatagct tcttcagttt cccagaactg 240

caggtgctgg atttatccag gtgtgaaatc cagacaattg aagatggggc atatcagagc 300

ctaagccacc tctctacctt aatattgaca ggaaacccca tccagagttt agccctggga 360

gccttttctg gactatcaag tttacagaag ctggtggctg tggagacaaa tctagcatct 420

ctagagaact tccccattgg acatctcaaa actttgaaag aacttaatgt ggctcacaat 480

cttatccaat ctttcaaatt acctgagtat ttttctaatc tgaccaatct agagcacttg 540

gacctttcca gcaacaagat tcaaagtatt tattgcacag acttgcgggt tctacatcaa 600

atgcccctac tcaatctctc tttagacctg tccctgaacc ctatgaactt tatccaacca 660

ggtgcattta aagaaattag gcttcataag ctgactttaa gaaataattt tgatagttta 720

aatgtaatga aaacttgtat tcaaggtctg gctggtttag aagtccatcg tttggttctg 780

ggagaattta gaaatgaagg aaacttggaa aagtttgaca aatctgctct agagggcctg 840

tgcaatttga ccattgaaga attccgatta gcatacttag actactacct cgatgatatt 900

attgacttat ttaattgttt gacaaatgtt tcttcatttt ccctggtgag tgtgactatt 960

gaaagggtaa aagacttttc ttataatttc ggatggcaac atttagaatt agttaactgt 1020

aaatttggac agtttcccac attgaaactc aaatctctca aaaggcttac tttcacttcc 1080

aacaaaggtg ggaatgcttt ttcagaagtt gatctaccaa gccttgagtt tctagatctc 1140

agtagaaatg gcttgagttt caaaggttgc tgttctcaaa gtgattttgg gacaaccagc 1200

ctaaagtatt tagatctgag cttcaatggt gttattacca tgagttcaaa cttcttgggc 1260

ttagaacaac tagaacatct ggatttccag cattccaatt tgaaacaaat gagtgagttt 1320

tcagtattcc tatcactcag aaacctcatt taccttgaca tttctcatac tcacaccaga 1380

gttgctttca atggcatctt caatggcttg tccagtctcg aagtcttgaa aatggctggc 1440

aattctttcc aggaaaactt ccttccagat atcttcacag agctgagaaa cttgaccttc 1500

ctggacctct ctcagtgtca actggagcag ttgtctccaa cagcatttaa ctcactctcc 1560

agtcttcagg tactaaatat gagccacaac aacttctttt cattggatac gtttccttat 1620

aagtgtctga actccctcca ggttcttgat tacagtctca atcacataat gacttccaaa 1680

aaacaggaac tacagcattt tccaagtagt ctagctttct taaatcttac tcagaatgac 1740

tttgcttgta cttgtgaaca ccagagtttc ctgcaatgga tcaaggacca gaggcagctc 1800

ttggtggaag ttgaacgaat ggaatgtgca acaccttcag ataagcaggg catgcctgtg 1860

ctgagtttga atatcacctg tcagatgaat aagaccatca ttggtgtgtc ggtcctcagt 1920

gtgcttgtag tatctgttgt agcagttctg gtctataagt tctattttca cctgatgctt 1980

cttgctggct gcataaagta tggtagaggt gaaaacatct atgatgcctt tgttatctac 2040

tcaagccagg atgaggactg ggtaaggaat gagctagtaa agaatttaga agaaggggtg 2100

cctccatttc agctctgcct tcactacaga gactttattc ccggtgtggc cattgctgcc 2160

aacatcatcc atgaaggttt ccataaaagc cgaaaggtga ttgttgtggt gtcccagcac 2220

ttcatccaga gccgctggtg tatctttgaa tatgagattg ctcagacctg gcagtttctg 2280

agcagtcgtg ctggtatcat cttcattgtc ctgcagaagg tggagaagac cctgctcagg 2340

cagcaggtgg agctgtaccg ccttctcagc aggaacactt acctggagtg ggaggacagt 2400

gtcctggggc ggcacatctt ctggagacga ctcagaaaag ccctgctgga tggtaaatca 2460

tggaatccag aaggaacagt gggtacagga tgcaattggc aggaagcaac atctatc 2517

<210

> 114

<211> 2574

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR5

<400> 114

atgggagacc acctggacct tctcctagga gtggtgctca tggccggtcc tgtgtttgga 60

attccttcct gctcctttga tggccgaata gccttttatc gtttctgcaa cctcacccag 120

gtcccccagg tcctcaacac cactgagagg ctcctgctga gcttcaacta tatcaggaca 180

gtcactgctt catccttccc ctttctggaa cagctgcagc tgctggagct cgggagccag 240

tataccccct tgactattga caaggaggcc ttcagaaacc tgcccaacct tagaatcttg 300

gacctgggaa gtagtaagat atacttcttg catccagatg cttttcaggg actgttccat 360

ctgtttgaac ttagactgta tttctgtggt ctctctgatg ctgtattgaa agatggttat 420

ttcagaaatt taaaggcttt aactcgcttg gatctatcca aaaatcagat tcgtagcctt 480

taccttcatc cttcatttgg gaagttgaat tccttaaagt ccatagattt ttcctccaac 540

caaatattcc ttgtatgtga acatgagctc gagcccctac aagggaaaac gctctccttt 600

tttagcctcg cagctaatag cttgtatagc agagtctcag tggactgggg aaaatgtatg 660

aacccattca gaaacatggt gctggagata ctagatgttt ctggaaatgg ctggacagtg 720

gacatcacag gaaactttag caatgccatc agcaaaagcc aggccttctc tttgattctt 780

gcccaccaca tcatgggtgc cgggtttggc ttccataaca tcaaagatcc tgaccagaac 840

acatttgctg gcctggccag aagttcagtg agacacctgg atctttcaca tgggtttgtc 900

ttctccctga actcacgagt ctttgagaca ctcaaggatt tgaaggttct gaaccttgcc 960

tacaacaaga taaataagat tgcagatgaa gcattttacg gacttgacaa cctccaagtt 1020

ctcaatttgt catataacct tctgggggaa ctttacagtt cgaatttcta tggactacct 1080

aaggtagcct acattgattt gcaaaagaat cacattgcaa taattcaaga ccaaacattc 1140

aaattcctgg aaaaattaca gaccttggat ctccgagaca atgctcttac aaccattcat 1200

tttattccaa gcatacccga tatcttcttg agtggcaata aactagtgac tttgccaaag 1260

atcaacctta cagcgaacct catccactta tcagaaaaca ggctagaaaa tctagatatt 1320

ctctactttc tcctacgggt acctcatctc cagattctca ttttaaatca aaatcgcttc 1380

tcctcctgta gtggagatca aaccccttca gagaatccca gcttagaaca gcttttcctt 1440

ggagaaaata tgttgcaact tgcctgggaa actgagctct gttgggatgt ttttgaggga 1500

ctttctcatc ttcaagttct gtatttgaat cataactatc ttaattccct tccaccagga 1560

gtatttagcc atctgactgc attaagggga ctaagcctca actccaacag gctgacagtt 1620

ctttctcaca atgatttacc tgctaattta gagatcctgg acatatccag gaaccagctc 1680

ctagctccta atcctgatgt atttgtatca cttagtgtct tggatataac tcataacaag 1740

ttcatttgtg aatgtgaact tagcactttt atcaattggc ttaatcacac caatgtcact 1800

atagctgggc ctcctgcaga catatattgt gtgtaccctg actcgttctc tggggtttcc 1860

ctcttctctc tttccacgga aggttgtgat gaagaggaag tcttaaagtc cctaaagttc 1920

tccctttca ttgtatgcac tgtcactctg actctgttcc tcatgaccat cctcacagtc 1980

acaaagttcc ggggcttctg ttttatctgt tataagacag cccagagact ggtgttcaag 2040

gaccatcccc agggcacaga acctgatatg tacaaatatg atgcctattt gtgcttcagc 2100

agcaaagact tcacatgggt gcagaatgct ttgctcaaac acctggacac tcaatacagt 2160

gaccaaaaca gattcaacct gtgctttgaa gaaagagact ttgtcccagg agaaaaccgc 2220

attgccaata tccaggatgc catctggaac agtagaaaga tcgtttgtct tgtgagcaga 2280

cacttcctta gagatggctg gtgccttgaa gccttcagtt atgcccaggg caggtgctta 2340

tctgaccttа acagtgctct catcatggtg gtggttgggt ccttgtccca gtaccagttg 2400

atgaaacatc aatccatcag aggctttgta cagaaacagc agtatttgag gtggcctgag 2460

gatctccagg atgttggctg gtttcttcat aaactctctc aacagatact aaagaaagaa 2520

aaagaaaaga agaaagacaa taacattccg ttgcaaactg tagcaaccat ctcc 2574

<210> 115

<211> 2712

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR3, isoform 1

<400> 115

atgagacaga ctttgccttg tatctacttt tgggggggcc ttttgccctt tgggatgctg 60

tgtgcatcct ccaccaccaa gtgcactgtt agccatgaag ttgctgactg cagccacctg 120

aagttgactc aggtacccga tgatctaccc acaaacataa cagtgttgaa ccttacccat 180

aatcaactca gaagattacc agccgccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcttg 240

gatgtaggat ttaacaccat ctcaaaactg gagccagaat tgtgccagaa acttcccatg 300

ttaaaagttt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac tttctgataa aacctttgcc 360

ttctgcacga atttgactga actccatctc atgtccaact caatccagaa aattaaaaat 420

aatccctttg tcaagcagaa gaatttaatc acattagatc tgtctcataa tggcttgtca 480

tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540

aataaaattc aagcgctaaa aagtgaagaa ctggatatct ttgccaattc atctttaaaa 600

aaattagagt tgtcatcgaa tcaaattaaa gagttttctc cagggtgttt tcacgcaatt 660

ggaagattat ttggcctctt tctgaacaat gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720

ctatgtttgg aattagcaaa cacaagcatt cggaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780

tccaccacca gcaatacaac tttcttggga ctaaagtgga caaatctcac tatgctcgat 840

ctttcctaca acaacttaaa tgtggttggt aacgattcct ttgcttggct tccacaacta 900

gaatatttct tcctagagta taataatata cagcatttgt tttctcactc tttgcacggg 960

cttttcaatg tgaggtacct gaatttgaaa cggtctttta ctaaacaaag tatttccctt 1020

gcctcactcc ccaagattga tgatttttct tttcagtggc taaaatgttt ggagcacctt 1080

aacatggaag ataatgatat tccaggcata aaaagcaata tgttcacagg attgataaac 1140

ctgaaatact taagtctatc caactccttt acaagtttgc gaactttgac aaatgaaaca 1200

tttgtatcac ttgctcattc tcccttacac atactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260

aaaatagaga gtgatgcttt ctcttggttg ggccacctag aagtacttga cctgggcctt 1320

aatgaaattg ggcaagaact cacaggccag gaatggagag gtctagaaaa tattttcgaa 1380

atctatcttt cctacaacaa gtacctgcag ctgactagga actcctttgc cttggtccca 1440

agccttcaac gactgatgct ccgaagggtg gcccttaaaa atgtggatag ctctccttca 1500

ccattccagc ctcttcgtaa cttgaccatt ctggatctaa gcaacaacaa catagccaac 1560

ataaatgatg acatgttgga gggtcttgag aaactagaaa ttctcgattt gcagcataac 1620

aacttagcac ggctctggaa acacgcaaac cctggtggtc ccatttattt cctaaagggt 1680

ctgtctcacc tccacatcct taacttggag tccaacggct ttgacgagat cccagttgag 1740

gtcttcaagg atttatttga actaaagatc atcgatttag gattgaataa tttaaacaca 1800

cttccagcat ctgtctttaa taatcaggtg tctctaaagt cattgaacct tcagaagaat 1860

ctcataacat ccgttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaggaacct gactgagtta 1920

gatatgcgct ttaatccctt tgattgcacg tgtgaaagta ttgcctggtt tgttaattgg 1980

attaacgaga cccataccaa catccctgag ctgtcaagcc actacctttg caacactcca 2040

cctcactatc atgggttccc agtgagactt tttgatacat catcttgcaa agacagtgcc 2100

ccctttgaac tctttttcat gatcaatacc agtatcctgt tgatttttat ctttattgta 2160

cttctcatcc actttgaggg ctggaggata tctttttatt ggaatgtttc agtacatcga 2220

gttcttggtt tcaaagaaat agacagacag acagaacagt ttgaatatgc agcatatata 2280

attcatgcct ataaagataa ggattgggtc tgggaacatt tctcttcaat ggaaaaggaa 2340

gaccaatctc tcaaattttg tctggaagaa agggactttg aggcgggtgt ttttgaacta 2400

gaagcaattg ttaacagcat caaaagaagc agaaaaatta tttttgttat aacacaccat 2460

ctattaaaag acccattatg caaaagattc aaggtacatc atgcagttca acaagctatt 2520

gaacaaaatc tggattccat tatattggtt ttccttgagg agattccaga ttataaactg 2580

aaccatgcac tctgtttgcg aagaggaatg tttaaatctc actgcatctt gaactggcca 2640

gttcagaaag aacggatagg tgcctttcgt cataaattgc aagtagcact tggatccaaa 2700

aactctgtac at 2712

<210> 116

<211> 3096

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR9

<400> 116

atgggtttct gccgcagcgc cctgcacccg ctgtctctcc tggtgcaggc catcatgctg 60

gccatgaccc tggccctggg taccttgcct gccttcctac cctgtgagct ccagccccac 120

ggcctggtga actgcaactg gctgttcctg aagtctgtgc cccacttctc catggcagca 180

ccccgtggca atgtcaccag cctttccttg tcctccaacc gcatccacca cctccatgat 240

tctgactttg cccacctgcc cagcctgcgg catctcaacc tcaagtggaa ctgcccgccg 300

gttggcctca gccccatgca cttcccctgc cacatgacca tcgagcccag caccttcttg 360

gctgtgccca ccctggaaga gctaaacctg agctacaaca acatcatgac tgtgcctgcg 420

ctgcccaaat ccctcatatc cctgtccctc agccatacca acatcctgat gctagactct 480

gccagcctcg ccggcctgca tgccctgcgc ttcctattca tggacggcaa ctgttattac 540

aagaacccct gcaggcaggc actggaggtg gccccgggtg ccctccttgg cctgggcaac 600

ctcacccacc tgtcactcaa gtacaacaac ctcactgtgg tgccccgcaa cctgccttcc 660

agcctggagt atctgctgtt gtcctacaac cgcatcgtca aactggcgcc tgaggacctg 720

gccaatctga ccgccctgcg tgtgctcgat gtgggcggaa attgccgccg ctgcgaccac 780

gctcccaacc cctgcatgga gtgccctcgt cacttccccc agctacatcc cgataccttc 840

agccacctga gccgtcttga aggcctggtg ttgaaggaca gttctctctc ctggctgaat 900

gccagttggt tccgtgggct gggaaacctc cgagtgctgg acctgagtga gaacttcctc 960

tacaaatgca tcactaaaac caaggccttc cagggcctaa cacagctgcg caagcttaac 1020

ctgtccttca attaccaaaa gagggtgtcc tttgcccacc tgtctctggc cccttccttc 1080

gggagcctgg tcgccctgaa ggagctggac atgcacggca tcttcttccg ctcactcgat 1140

gagaccacgc tccggccact ggcccgcctg cccatgctcc agactctgcg tctgcagatg 1200

aacttcatca accaggccca gctcggcatc ttcagggcct tccctggcct gcgctacgtg 1260

gacctgtcgg acaaccgcat cagcggagct tcggagctga cagccaccat gggggaggca 1320

gatggagggg agaaggtctg gctgcagcct ggggaccttg ctccggcccc agtggacact 1380

cccagctctg aagacttcag gcccaactgc agcaccctca acttcacctt ggatctgtca 1440

cggaacaacc tggtgaccgt gcagccggag atgtttgccc agctctcgca cctgcagtgc 1500

ctgcgcctga gccacaactg catctcgcag gcagtcaatg gctcccagtt cctgccgctg 1560

accggtctgc aggtgctaga cctgtcccac aataagctgg acctctacca cgagcactca 1620

ttcacggagc taccgcgact ggaggccctg gacctcagct acaacagcca gccctttggc 1680

atgcagggcg tgggccacaa cttcagcttc gtggctcacc tgcgcaccct gcgccacctc 1740

agcctggccc acaacaacat ccacagccaa gtgtcccagc agctctgcag tacgtcgctg 1800

cgggccctgg acttcagcgg caatgcactg ggccatatgt gggccgaggg agacctctat 1860

ctgcacttct tccaaggcct gagcggtttg atctggctgg acttgtccca gaaccgcctg 1920

cacaccctcc tgccccaaac cctgcgcaac ctccccaaga gcctacaggt gctgcgtctc 1980

cgtgacaatt acctggcctt ctttaagtgg tggagcctcc acttcctgcc caaactggaa 2040

gtcctcgacc tggcaggaaa ccagctgaag gccctgacca atggcagcct gcctgctggc 2100

acccggctcc ggaggctgga tgtcagctgc aacagcatca gcttcgtggc ccccggcttc 2160

ttttccaagg ccaaggagct gcgagagctc aaccttagcg ccaacgccct caagacagtg 2220

gaccactcct ggtttgggcc cctggcgagt gccctgcaaa tactagatgt aagcgccaac 2280

cctctgcact gcgcctgtgg ggcggccttt atggacttcc tgctggaggt gcaggctgcc 2340

gtgcccggtc tgcccagccg ggtgaagtgt ggcagtccgg gccagctcca gggcctcagc 2400

atctttgcac aggacctgcg cctctgcctg gatgaggccc tctcctggga ctgtttcgcc 2460

ctctcgctgc tggctgtggc tctgggcctg ggtgtgccca tgctgcatca cctctgtggc 2520

tgggacctct ggtactgctt ccacctgtgc ctggcctggc ttccctggcg ggggcggcaa 2580

agtgggcgag atgaggatgc cctgccctac gatgccttcg tggtcttcga caaaacgcag 2640

agcgcagtgg cagactgggt gtacaacgag cttcgggggc agctggagga gtgccgtggg 2700

cgctgggcac tccgcctgtg cctggaggaa cgcgactggc tgcctggcaa aaccctcttt 2760

gagaacctgt gggcctcggt ctatggcagc cgcaagacgc tgtttgtgct ggcccacacg 2820

gaccgggtca gtggtctctt gcgcgccagc ttcctgctgg cccagcagcg cctgctggag 2880

gaccgcaagg acgtcgtggt gctggtgatc ctgagccctg acggccgccg ctcccgctac 2940

gtgcggctgc gccagcgcct ctgccgccag agtgtcctcc tctggcccca ccagcccagt 3000

ggtcagcgca gcttctgggc ccagctgggc atggccctga ccagggacaa ccaccacttc 3060

tataaccgga acttctgcca gggacccacg gccgaa 3096

<210> 117

<211> 3147

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR7

<400> 117

atggtgtttc caatgtggac actgaagaga caaattctta tccttttaa cataatccta 60

atttccaaac tccttggggc tagatggttt cctaaaactc tgccctgtga tgtcactctg 120

gatgttccaa agaaccatgt gatcgtggac tgcacagaca agcatttgac agaaattcct 180

ggaggtattc ccacgaacac cacgaacctc accctcacca ttaaccacat accagacatc 240

tccccagcgt cctttcacag actggaccat ctggtagaga tcgatttcag atgcaactgt 300

gtacctattc cactggggtc aaaaaacaac atgtgcatca agaggctgca gattaaaccc 360

agaagcttta gtggactcac ttatttaaaa tccctttacc tggatggaaa ccagctacta 420

gagataccgc agggcctccc gcctagctta cagcttctca gccttgaggc caacaacatc 480

ttttccatca gaaaagagaa tctaacagaa ctggccaaca tagaaatact ctacctgggc 540

caaaactgtt attatcgaaa tccttgttat gtttcatatt caatagagaa agatgccttc 600

ctaaacttga caaagttaaa agtgctctcc ctgaaagata acaatgtcac agccgtccct 660

actgttttgc catctacttt aacagaacta tatctctaca acaacatgat tgcaaaaatc 720

caagaagatg attttaataa cctcaaccaa ttacaaattc ttgacctaag tggaaattgc 780

cctcgttgtt ataatgcccc atttccttgt gcgccgtgta aaaataattc tcccctacag 840

atccctgtaa atgcttttga tgcgctgaca gaattaaaag ttttacgtct acacagtaac 900

tctcttcagc atgtgccccc aagatggttt aagaacatca acaaactcca ggaactggat 960

ctgtcccaaa acttcttggc caaagaaatt ggggatgcta aatttctgca ttttctcccc 1020

agcctcatcc aattggatct gtctttcaat tttgaacttc aggtctatcg tgcatctatg 1080

aatctatcac aagcattttc ttcactgaaa agcctgaaaa ttctgcggat cagaggatat 1140

gtctttaaag agttgaaaag ctttaacctc tcgccattac ataatcttca aaatcttgaa 1200

gttcttgatc ttggcactaa ctttataaaa attgctaacc tcagcatgtt taaacaattt 1260

aaaagactga aagtcataga tctttcagtg aataaaatat caccttcagg agattcaagt 1320

gaagttggct tctgctcaaa tgccagaact tctgtagaaa gttatgaacc ccaggtcctg 1380

gaacaattac attatttcag atatgataag tatgcaagga gttgcagatt caaaaacaaa 1440

gaggcttctt tcatgtctgt taatgaaagc tgctacaagt atgggcagac cttggatcta 1500

agtaaaaata gtatattttt tgtcaagtcc tctgattttc agcatctttc tttcctcaaa 1560

tgcctgaatc tgtcaggaaa tctcattagc caaactctta atggcagtga attccaacct 1620

ttagcagagc tgagatattt ggacttctcc aacaaccggc ttgatttact ccattcaaca 1680

gcatttgaag agcttcacaa actggaagtt ctggatataa gcagtaatag ccattatttt 1740

caatcagaag gaattactca tatgctaaac tttaccaaga acctaaaggt tctgcagaaa 1800

ctgatgatga acgacaatga catctcttcc tccaccagca ggaccatgga gagtgagtct 1860

cttagaactc tggaattcag aggaaatcac ttagatgttt tatggagaga aggtgataac 1920

agatacttac aattattcaa gaatctgcta aaattagagg aattagacat ctctaaaaat 1980

tccctaagtt tcttgccttc tggagttttt gatggtatgc ctccaaatct aaagaatctc 2040

tctttggcca aaaatgggct caaatctttc agttggaaga aactccagtg tctaaagaac 2100

ctggaaactt tggacctcag ccacaaccaa ctgaccactg tccctgagag attatccaac 2160

tgttccagaa gcctcaagaa tctgattctt aagaataatc aaatcaggag tctgacgaag 2220

tattttctac aagatgcctt ccagttgcga tatctggatc tcagctcaaa taaaatccag 2280

atgatccaaa agaccagctt cccagaaaat gtcctcaaca atctgaagat gttgcttttg 2340

catcataatc ggtttctgtg cacctgtgat gctgtgtggt ttgtctggtg ggttaaccat 2400

acggaggtga ctattcctta cctggccaca gatgtgactt gtgtggggcc aggagcacac 2460

aagggccaaa gtgtgatctc cctggatctg tacacctgtg agttagatct gactaacctg 2520

attctgttct cactttccat atctgtatct ctctttctca tggtgatgat gacagcaagt 2580

cacctctatt tctgggatgt gtggtatatt taccatttct gtaaggccaa gataaagggg 2640

tatcagcgtc taatatcacc agactgttgc tatgatgctt ttattgtgta tgacactaaa 2700

gacccagctg tgaccgagtg ggttttggct gagctggtgg ccaaactgga agacccaaga 2760

gagaaacatt ttaatttatg tctcgaggaa agggactggt taccagggca gccagttctg 2820

gaaaaccttt cccagagcat acagcttagc aaaaagacag tgtttgtgat gacagacaag 2880

tatgcaaaga ctgaaaattt taagatagca ttttacttgt cccatcagag gctcatggat 2940

gaaaaagttg atgtgattat cttgatattt cttgagaagc cctttcagaa gtccaagttc 3000

ctccagctcc ggaaaaggct ctgtgggagt tctgtccttg agtggccaac aaacccgcaa 3060

gctcacccat acttctggca gtgtctaaag aacgccctgg ccacagacaa tcatgtggcc 3120

tatagtcagg tgttcaagga aacggtc 3147

<210> 118

<211> 3177

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR8, isoform 1

<400> 118

atgaaggagt catctttgca aaatagctcc tgcagcctgg gaaaggagac taaaaaggaa 60

aacatgttcc ttcagtcgtc aatgctgacc tgcattttcc tgctaatatc tggttcctgt 120

gagttatgcg ccgaagaaaa tttttctaga agctatcctt gtgatgagaa aaagcaaaat 180

gactcagtta ttgcagagtg cagcaatcgt cgactacagg aagttcccca aacggtgggc 240

aaatatgtga cagaactaga cctgtctgat aatttcatca cacacataac gaatgaatca 300

tttcaagggc tgcaaaatct cactaaaata aatctaaacc acaaccccaa tgtacagcac 360

cagaacggaa atcccggtat acaatcaaat ggcttgaata tcacagacgg ggcattcctc 420

aacctaaaaa acctaaggga gttactgctt gaagacaacc agttacccca aataccctct 480

ggtttgccag agtctttgac agaacttagt ctaattcaaa acaatatata caacataact 540

aaagagggca tttcaagact tataaacttg aaaaatctct atttggcctg gaactgctat 600

tttaacaaag tttgcgagaa aactaacata gaagatggag tatttgaaac gctgacaaat 660

ttggagttgc tatcactatc tttcaattct ctttcacacg tgccacccaa actgccaagc 720

tccctacgca aacttttttct gagcaacacc cagatcaaat acattagtga agaagatttc 780

aagggattga taaatttaac attactagat ttaagcggga actgtccgag gtgcttcaat 840

gccccatttc catgcgtgcc ttgtgatggt ggtgcttcaa ttaatataga tcgttttgct 900

tttcaaaact tgacccaact tcgataccta aacctctcta gcacttccct caggaagatt 960

aatgctgcct ggtttaaaaa tatgcctcat ctgaaggtgc tggatcttga attcaactat 1020

ttagtgggag aaatagcctc tggggcattt ttaacgatgc tgccccgctt agaaatactt 1080

gacttgtctt ttaactatat aaaggggagt tatccacagc atattaatat ttccagaaac 1140

ttctctaaac ttttgtctct acgggcattg catttaagag gttatgtgtt ccaggaactc 1200

agagaagatg atttccagcc cctgatgcag cttccaaact tatcgactat caacttgggt 1260

attaatttta ttaagcaaat cgatttcaaa cttttccaaa atttctccaa tctggaaatt 1320

atttacttgt cagaaaacag aatatcaccg ttggtaaaag atacccggca gagttatgca 1380

aatagttcct cttttcaacg tcatatccgg aaacgacgct caacagattt tgagtttgac 1440

ccacattcga acttttatca tttcacccgt cctttaataa agccacaatg tgctgcttat 1500

ggaaaagcct tagatttaag cctcaacagt attttcttca ttgggccaaa ccaatttgaa 1560

aatcttcctg acattgcctg tttaaatctg tctgcaaata gcaatgctca agtgttaagt 1620

ggaactgaat tttcagccat tcctcatgtc aaatatttgg atttgacaaa caatagacta 1680

gactttgata atgctagtgc tcttactgaa ttgtccgact tggaagttct agatctcagc 1740

tataattcac actatttcag aatagcaggc gtaacacatc atctagaatt tattcaaaat 1800

ttcacaaatc taaaagtttt aaacttgagc cacaacaaca tttatacttt aacagataag 1860

tataacctgg aaagcaagtc cctggtagaa ttagttttca gtggcaatcg ccttgacatt 1920

ttgtggaatg atgatgacaa caggtatatc tccattttca aaggtctcaa gaatctgaca 1980

cgtctggatt tatcccttaa taggctgaag cacatcccaa atgaagcatt ccttaatttg 2040

ccagcgagtc tcactgaact acatataaat gataatatgt taaagttttt taactggaca 2100

ttactccagc agtttcctcg tctcgagttg cttgacttac gtggaaacaa actactcttt 2160

ttaactgata gcctatctga ctttacatct tcccttcgga cactgctgct gagtcataac 2220

aggatttccc acctaccctc tggctttctt tctgaagtca gtagtctgaa gcacctcgat 2280

ttaagttcca atctgctaaa aacaatcaac aaatccgcac ttgaaactaa gaccaccacc 2340

aaattatcta tgttggaact acacggaaac ccctttgaat gcacctgtga cattggagat 2400

ttccgaagat ggatggatga acatctgaat gtcaaaattc ccagactggt agatgtcatt 2460

tgtgccagtc ctggggatca aagagggaag agtattgtga gtctggagct aacaacttgt 2520

gtttcagatg tcactgcagt gatattattt ttcttcacgt tctttatcac caccatggtt 2580

atgttggctg ccctggctca ccatttgttt tactgggatg tttggtttat atataatgtg 2640

tgtttagcta aggtaaaagg ctacaggtct ctttccacat cccaaacttt ctatgatgct 2700

tacatttctt atgacaccaa agatgcctct gttactgact gggtgataaa tgagctgcgc 2760

taccaccttg aagagagccg agacaaaaac gttctccttt gtctagagga gagggattgg 2820

gacccgggat tggccatcat cgacaacctc atgcagagca tcaaccaaag caagaaaaca 2880

gtatttgttt taaccaaaaa atatgcaaaa agctggaact ttaaaacagc tttttacttg 2940

gctttgcaga ggctaatgga tgagaacatg gatgtgatta tatttatcct gctggagcca 3000

gtgttacagc attctcagta tttgaggcta cggcagcgga tctgtaagag ctccatcctc 3060

cagtggcctg acaacccgaa ggcagaaggc ttgttttggc aaactctgag aaatgtggtc 3120

ttgactgaaa atgattcacg gtataacaat atgtatgtcg attccattaa gcaatac 3177

<210> 119

<211> 636

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Interleukin 6 (IL-6)

<400> 119

atgaactcct tctccacaag cgccttcggt ccagttgcct tctccctggg gctgctcctg 60

gtgttgcctg ctgccttccc tgccccagta cccccaggag aagattccaa agatgtagcc 120

gccccacaca gacagccact cacctcttca gaacgaattg acaaacaaat tcggtacatc 180

ctcgacggca tctcagccct gagaaaggag acatgtaaca agagtaacat gtgtgaaagc 240

agcaaagagg cactggcaga aaacaacctg aaccttccaa agatggctga aaaagatgga 300

tgcttccaat ctggattcaa tgaggagact tgcctggtga aaatcatcac tggtcttttg 360

gagtttgagg tatacctaga gtacctccag aacagatttg agagtagtga ggaacaagcc 420

agagctgtgc agatgagtac aaaagtcctg atccagttcc tgcagaaaaa ggcaaagaat 480

ctagatgcaa taaccacccc tgacccaacc acaaatgcca gcctgctgac gaagctgcag 540

gcacagaacc agtggctgca ggacatgaca actcatctca ttctgcgcag ctttaaggag 600

ttcctgcagt ccagcctgag ggctcttcgg caaatg 636

<210> 120

<211> 951

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MyD88, isoform 1

<400> 120

atgcgacccg accgcgctga ggctccagga ccgcccgcca tggctgcagg aggtcccggc 60

gcggggtctg cggccccggt ctcctccaca tcctcccttc ccctggctgc tctcaacatg 120

cgagtgcggc gccgcctgtc tctgttcttg aacgtgcgga cacaggtggc ggccgactgg 180

accgcgctgg cggaggagat ggactttgag tacttggaga tccggcaact ggagacacaa 240

gcggacccca ctggcaggct gctggacgcc tggcagggac gccctggcgc ctctgtaggc 300

cgactgctcg agctgcttac caagctgggc cgcgacgacg tgctgctgga gctgggaccc 360

agcattgagg aggattgcca aaagtatatc ttgaagcagc agcaggagga ggctgagaag 420

cctttacagg tggccgctgt agacagcagt gtcccacgga cagcagagct ggcgggcatc 480

accacacttg atgacccccc ggggcatatg cctgagcgtt tcgatgcctt catctgctat 540

tgccccagcg acatccagtt tgtgcaggag atgatccggc aactggaaca gacaaactat 600

cgactgaagt tgtgtgtgtc tgaccgcgat gtcctgcctg gcacctgtgt ctggtctatt 660

gctagtgagc tcatcgaaaa gaggttggct agaaggccac ggggtgggtg ccgccggatg 720

gtggtggttg tctctgatga ttacctgcag agcaaggaat gtgacttcca gaccaaattt 780

gcactcagcc tctctccagg tgcccatcag aagcgactga tccccatcaa gtacaaggca 840

atgaagaaag agttccccag catcctgagg ttcatcactg tctgcgacta caccaacccc 900

tgcaccaaat cttggttctg gactcgcctt gccaaggcct tgtccctgcc c 951

<210> 121

<211> 807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Interleukin 1-beta (IL-1beta)

<400> 121

atggcagaag tacctgagct cgccagtgaa atgatggctt attacagtgg caatgaggat 60

gacttgttct ttgaagctga tggccctaaa cagatgaagt gctccttcca ggacctggac 120

ctctgccctc tggatggcgg catccagcta cgaatctccg accaccacta cagcaagggc 180

ttcaggcagg ccgcgtcagt tgttgtggcc atggacaagc tgaggaagat gctggttccc 240

tgcccacaga ccttccagga gaatgacctg agcaccttct ttcccttcat ctttgaagaa 300

gaacctatct tcttcgacac atgggataac gaggcttatg tgcacgatgc acctgtacga 360

tcactgaact gcacgctccg ggactcacag caaaaaagct tggtgatgtc tggtccatat 420

gaactgaaag ctctccacct ccagggacag gatatggagc aacaagtggt gttctccatg 480

tcctttgtac aaggagaaga aagtaatgac aaaatacctg tggccttggg cctcaaggaa 540

aagaatctgt acctgtcctg cgtgttgaaa gatgataagc ccactctaca gctggagagt 600

gtagatccca aaaattaccc aaagaagaag atggaaaagc gatttgtctt caacaagata 660

gaaatcaata acaagctgga atttgagtct gcccagttcc ccaactggta catcagcacc 720

tctcaagcag aaaacatgcc cgtcttcctg ggagggacca aaggcggcca ggatataact 780

gacttcacca tgcaatttgt gtcttcc 807

<210> 122

<211> 3075

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MDA5/IFIH1, isoform 1

<400> 122

atgtcgaatg ggtattccac agacgagaat ttccgctatc tcatctcgtg cttcagggcc 60

agggtgaaaa tgtacatcca ggtggagcct gtgctggact acctgacctt tctgcctgca 120

gaggtgaagg agcagattca gaggacagtc gccacctccg ggaacatgca ggcagttgaa 180

ctgctgctga gcaccttgga gaagggagtc tggcaccttg gttggactcg ggaattcgtg 240

gaggccctcc ggagaaccgg cagccctctg gccgcccgct acatgaaccc tgagctcacg 300

gacttgccct ctccatcgtt tgagaacgct catgatgaat atctccaact gctgaacctc 360

cttcagccca ctctggtgga caagcttcta gttagagacg tcttggataa gtgcatggag 420

gaggaactgt tgacaattga agacagaaac cggattgctg ctgcagaaaa caatggaaat 480

gaatcaggtg taagagagct actaaaaagg attgtgcaga aagaaaactg gttctctgca 540

tttctgaatg ttcttcgtca aacaggaaac aatgaacttg tccaagagtt aacaggctct 600

gattgctcag aaagcaatgc agagattgag aatttatcac aagttgatgg tcctcaagtg 660

gaagagcaac ttctttcaac cacagttcag ccaaatctgg agaaggaggt ctggggcatg 720

gagaataact catcagaatc atcttttgca gattcttctg tagtttcaga atcagacaca 780

agtttggcag aaggaagtgt cagctgctta gatgaaagtc ttggacataa cagcaacatg 840

ggcagtgatt caggcaccat gggaagtgat tcagatgaag agaatgtggc agcaagagca 900

tccccggagc cagaactcca gctcaggcct taccaaatgg aagttgccca gccagccttg 960

gaagggaaga atatcatcat ctgcctccct acagggagtg gaaaaaccag agtggctgtt 1020

tacattgcca aggatcactt agacaagaag aaaaaagcat ctgagcctgg aaaagttata 1080

gttcttgtca ataaggtact gctagttgaa cagctcttcc gcaaggagtt ccaaccattt 1140

ttgaagaaat ggtatcgtgt tattggatta agtggtgata cccaactgaa aatatcattt 1200

ccagaagttg tcaagtcctg tgatattatt atcagtacag ctcaaatcct tgaaaactcc 1260

ctcttaaact tggaaaatgg agaagatgct ggtgttcaat tgtcagactt ttccctcatt 1320

atcattgatg aatgtcatca caccaacaaa gaagcagtgt ataataacat catgaggcat 1380

tatttgatgc agaagttgaa aaacaataga ctcaagaaag aaaacaaacc agtgattccc 1440

cttcctcaga tactgggact aacagcttca cctggtgttg gaggggccac gaagcaagcc 1500

aaagctgaag aacacatttt aaaactatgt gccaatcttg atgcatttac tattaaaact 1560

gttaaagaaa accttgatca actgaaaaac caaatacagg agccatgcaa gaagtttgcc 1620

attgcagatg caaccagaga agatccattt aaagagaaac ttctagaaat aatgacaagg 1680

attcaaactt attgtcaaat gagtccaatg tcagattttg gaactcaacc ctatgaacaa 1740

tgggccattc aaatggaaaa aaaagctgca aaagaaggaa atcgcaaaga acgtgtttgt 1800

gcagaacatt tgaggaagta caatgaggcc ctacaaatta atgacacaat tcgaatgata 1860

gatgcgtata ctcatcttga aactttctat aatgaagaga aagataagaa gtttgcagtc 1920

atagaagatg atagtgatga gggtggtgat gatgagtatt gtgatggtga tgaagatgag 1980

gatgatttaa agaaaccttt gaaactggat gaaacagata gatttctcat gactttattt 2040

tttgaaaaca ataaaatgtt gaaaaggctg gctgaaaacc cagaatatga aaatgaaaag 2100

ctgaccaaat taagaaatac cataatggag caatatacta ggactgagga atcagcacga 2160

ggaataatct ttacaaaaac acgacagagt gcatatgcgc tttcccagtg gattactgaa 2220

aatgaaaaat ttgctgaagt aggagtcaaa gcccaccatc tgattggagc tggacacagc 2280

agtgagttca aacccatgac acagaatgaa caaaaagaag tcattagtaa atttcgcact 2340

ggaaaaataa atctgcttat cgctaccaca gtggcagaag aaggtctgga tattaaagaa 2400

tgtaacattg ttatccgtta tggtctcgtc accaatgaaa tagccatggt ccaggcccgt 2460

ggtcgagcca gagctgatga gagcacctac gtcctggttg ctcacagtgg ttcaggagtt 2520

atcgaacatg agacagttaa tgatttccga gagaagatga tgtataaagc tatacattgt 2580

gttcaaaata tgaaaccaga ggagtatgct cataagattt tggaattaca gatgcaaagt 2640

ataatggaaa agaaaatgaa aaccaagaga aatattgcca agcattacaa gaataaccca 2700

tcactaataa ctttcctttg caaaaactgc agtgtgctag cctgttctgg ggaagatatc 2760

catgtaattg agaaaatgca tcacgtcaat atgaccccag aattcaagga actttacatt 2820

gtaagagaaa acaaagcact gcaaaagaag tgtgccgact atcaaataaa tggtgaaatc 2880

atctgcaaat gtggccaggc ttggggaaca atgatggtgc acaaaggctt agatttgcct 2940

tgtctcaaaa taaggaattt tgtagtggtt ttcaaaaata attcaacaaa gaaacaatac 3000

aaaaagtggg tagaattacc tatcacattt cccaatcttg actattcaga atgctgttta 3060

tttagtgatg aggat 3075

<210

> 123

<211> 1620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IPS-1/MAVS, isoform 1

<400> 123

atgccgtttg ctgaagacaa gacctataag tatatctgcc gcaatttcag caatttttgc 60

aatgtggatg ttgtagagat tctgccttac ctgccctgcc tcacagcaag agaccaggat 120

cgactgcggg ccacctgcac actctcaggg aaccgggaca ccctctggca tctcttcaat 180

acccttcagc ggcggcccgg ctgggtggag tacttcattg cggcactgag gggctgtgag 240

ctagttgatc tcgcggacga agtggcctct gtctaccaga gctaccagcc tcggacctcg 300

gaccgtcccc cagacccact ggagccaccg tcacttcctg ctgagaggcc agggcccccc 360

acacctgctg cggcccacag catcccctac aacagctgca gagagaagga gccaagttac 420

cccatgcctg tccaggagac ccaggcgcca gagtccccag gagagaattc agagcaagcc 480

ctgcagacgc tcagccccag agccatccca aggaatccag atggtggccc cctggagtcc 540

tcctctgacc tggcagccct cagccctctg acctccagcg ggcatcagga gcaggacaca 600

gaactgggca gtacccacac agcaggtgcg acctccagcc tcacaccatc ccgtgggcct 660

gtgtctccat ctgtctcctt ccagcccctg gcccgttcca cccccagggc aagccgcttg 720

cctggaccca cagggtcagt tgtatctact ggcacctcct tctcctcctc atcccctggc 780

ttggcctctg caggggctgc agagggtaaa cagggtgcag agagtgacca ggccgagcct 840

atcatctgct ccagtggggc agaggcacct gccaactctc tgccctccaa agtgcctacc 900

accttgatgc ctgtgaacac agtggccctg aaagtgcctg ccaacccagc atctgtcagc 960

acagtgccct ccaagttgcc aactagctca aagccccctg gtgcagtgcc ttctaatgcg 1020

ctcaccaatc cagcaccatc caaattgccc atcaactcaa cccgtgctgg catggtgcca 1080

tccaaagtgc ctactagcat ggtgctcacc aaggtgtctg ccagcacagt ccccactgac 1140

gggagcagca gaaatgagga gaccccagca gctccaacac ccgccggcgc cactggaggc 1200

agctcagcct ggctagacag cagctctgag aataggggcc ttgggtcgga gctgagtaag 1260

cctggcgtgc tggcatccca ggtagacagc ccgttctcgg gctgcttcga ggatcttgcc 1320

atcagtgcca gcacctcctt gggcatgggg ccctgccatg gcccagagga gaatgagtat 1380

aagtccgagg gcacctttgg gatccacgtg gctgagaacc ccagcatcca gctcctggag 1440

ggcaaccctg ggccacctgc ggacccggat ggcggcccca ggccacaagc cgaccggaag 1500

ttccaggaga gggaggtgcc atgccacagg ccctcacctg gggctctgtg gctccaggtg 1560

gctgtgacag gggtgctggt agtcacactc ctggtggtgc tgtaccggcg gcgtctgcac 1620

<210> 124

<211> 2775

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> RIG-1/DDX58, isoform 1

<400> 124

atgaccaccg agcagcgacg cagcctgcaa gccttccagg attatatccg gaagaccctg 60

gaccctacct acatcctgag ctacatggcc ccctggttta gggaggaaga ggtgcagtat 120

attcaggctg agaaaaacaa caagggccca atggaggctg ccacactttt tctcaagttc 180

ctgttggagc tccaggagga aggctggttc cgtggctttt tggatgccct agaccatgca 240

ggttattctg gactttatga agccattgaa agttgggatt tcaaaaaaat tgaaaagttg 300

gaggagtata gattactttt aaaacgttta caaccagaat ttaaaaccag aattatccca 360

accgatatca tttctgatct gtctgaatgt ttaattaatc aggaatgtga agaaattcta 420

cagatttgct ctactaaggg gatgatggca ggtgcagaga aattggtgga atgccttctc 480

agatcagaca aggaaaactg gcccaaaact ttgaaacttg ctttggagaa agaaaggaac 540

aagttcagtg aactgtggat tgtagagaaa ggtataaaag atgttgaaac agaagatctt 600

gaggataaga tggaaacttc tgacatacag attttctacc aagaagatcc agaatgccag 660

aatcttagtg agaattcatg tccaccttca gaagtgtctg atacaaactt gtacagccca 720

tttaaaccaa gaaattacca attagagctt gctttgcctg ctatgaaagg aaaaaacaca 780

ataatatgtg ctcctacagg ttgtggaaaa acctttgttt cactgcttat atgtgaacat 840

catcttaaaa aattcccaca aggacaaaag gggaaagttg tctttttgc gaatcagatc 900

ccagtgtatg aacagcagaa atctgtattc tcaaaatact ttgaaagaca tgggtataga 960

gttacaggca tttctggagc aacagctgag aatgtcccag tggaacagat tgttgagaac 1020

aatgacatca tcattttaac tccacagatt cttgtgaaca accttaaaaa gggaacgatt 1080

ccatcactat ccatctttac tttgatgata tttgatgaat gccacaacac tagtaaacaa 1140

cacccgtaca atatgatcat gtttaattat ctagatcaga aacttggagg atcttcaggc 1200

ccactgcccc aggtcattgg gctgactgcc tcggttggtg ttggggatgc caaaaacaca 1260

gatgaagcct tggattatat ctgcaagctg tgtgcttctc ttgatgcgtc agtgatagca 1320

acagtcaaac acaatctgga ggaactggag caagttgttt ataagcccca gaagtttttc 1380

aggaaagtgg aatcacggat tagcgacaaa tttaaataca tcatagctca gctgatgagg 1440

gacacagaga gtctggcaaa gagaatctgc aaagacctcg aaaacttatc tcaaattcaa 1500

aatagggaat ttggaacaca gaaatatgaa caatggattg ttacagttca gaaagcatgc 1560

atggtgttcc agatgccaga caaagatgaa gagagcagga tttgtaaagc cctgttttta 1620

tacacttcac atttgcggaa atataatgat gccctcatta tcagtgagca tgcacgaatg 1680

aaagatgctc tggattactt gaaagacttc ttcagcaatg tccgagcagc aggattcgat 1740

gagattgagc aagatcttac tcagagattt gaagaaaagc tgcaggaact agaaagtgtt 1800

tccagggatc ccagcaatga gaatcctaaa cttgaagacc tctgcttcat cttacaagaa 1860

gagtaccact taaacccaga gacaataaca attctctttg tgaaaaccag agcacttgtg 1920

gacgctttaa aaaattggat tgaaggaaat cctaaactca gttttctaaa acctggcata 1980

ttgactggac gtggcaaaac aaatcagaac acaggaatga ccctcccggc acagaagtgt 2040

atattggatg cattcaaagc cagtggagat cacaatattc tgattgccac ctcagttgct 2100

gatgaaggca ttgacattgc acagtgcaat cttgtcatcc tttatgagta tgtgggcaat 2160

gtcatcaaaa tgatccaaac cagaggcaga ggaagagcaa gaggtagcaa gtgcttcctt 2220

ctgactagta atgctggtgt aattgaaaaa gaacaaataa acatgtacaa agaaaaaatg 2280

atgaatgact ctattttacg ccttcagaca tgggacgaag cagtatttag ggaaaagatt 2340

ctgcatatac agactcatga aaaattcatc agagatagtc aagaaaaacc aaaacctgta 2400

cctgataagg aaaataaaaa actgctctgc agaaagtgca aagccttggc atgttacaca 2460

gctgacgtaa gagtgataga ggaatgccat tacactgtgc ttggagatgc ttttaaggaa 2520

tgctttgtga gtagaccaca tcccaagcca aagcagtttt caagttttga aaaaagagca 2580

aagatattct gtgcccgaca gaactgcagc catgactggg gaatccatgt gaagtacaag 2640

acatttgaga ttccagttat aaaaattgaa agttttgtgg tggaggatat tgcaactgga 2700

gttcagacac tgtactcgaa gtggaaggac tttcattttg agaagatacc atttgatcca 2760

gcagaaatgt ccaaa 2775

<210> 125

<211> 1494

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IRF5, transcript variant 2

<400> 125

atgaaccagt ccatcccagt ggctcccacc ccaccccgcc gcgtgcggct gaagccctgg 60

ctggtggccc aggtgaacag ctgccagtac ccagggcttc aatgggtcaa cggggaaaag 120

aaattattct gcatcccctg gaggcatgcc acaaggcatg gtcccagcca ggacggagat 180

aacaccatct tcaaggcctg ggccaaggag acagggaaat acaccgaagg cgtggatgaa 240

gccgatccgg ccaagtggaa ggccaacctg cgctgtgccc ttaacaagag ccgggacttc 300

cgcctcatct acgacgggcc ccgggacatg ccacctcagc cctacaagat ctacgaggtc 360

tgctccaatg gccctgctcc cacagactcc cagccccctg aggattactc ttttggtgca 420

ggagaggagg aggaagaaga ggaagagctg cagaggatgt tgccaagcct gagcctcaca 480

gaggatgtca agtggccgcc cactctgcag ccgcccactc tgcggccgcc tactctgcag 540

ccgcccactc tgcagccgcc cgtggtgctg ggtccccctg ctccagaccc cagccccctg 600

gctcctcccc ctggcaaccc tgctggcttc agggagcttc tctctgaggt cctggagcct 660

gggcccctgc ctgccagcct gccccctgca ggcgaacagc tcctgccaga cctgctgatc 720

agcccccaca tgctgcctct gaccgacctg gagatcaagt ttcagtaccg ggggcggcca 780

ccccgggccc tcaccatcag caacccccat ggctgccggc tcttctacag ccagctggag 840

gccacccagg agcaggtgga actcttcggc cccataagcc tggagcaagt gcgcttcccc 900

agccctgagg acatccccag tgacaagcag cgcttctaca cgaaccagct gctggatgtc 960

ctggaccgcg ggctcatcct ccagctacag ggccaggacc tttatgccat ccgcctgtgt 1020

cagtgcaagg tgttctggag cgggccttgt gcctcagccc atgactcatg ccccaacccc 1080

atccagcggg aggtcaagac caagcttttc agcctggagc attttctcaa tgagctcatc 1140

ctgttccaaa agggccagac caacacccca ccacccttcg agatcttctt ctgctttggg 1200

gaagaatggc ctgaccgcaa accccgagag aagaagctca ttactgtaca ggtggtgcct 1260

gtagcagctc gactgctgct ggagatgttc tcaggggagc tatcttggtc agctgatagt 1320

atccggctac agatctcaaa cccagacctc aaagaccgca tggtggagca attcaaggag 1380

ctccatcaca tctggcagtc ccagcagcgg ttgcagcctg tggcccaggc ccctcctgga 1440

gcaggccttg gtgttggcca ggggccctgg cctatgcacc cagctggcat gcaa 1494

<210> 126

<211> 1284

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IRF3, isoform 1

<400> 126

accatgggaa ccccaaagcc acggatcctg ccctggctgg tgtcgcagct ggacctgggg 60

caactggagg gcgtggcctg ggtgaacaag agccgcacgc gcttccgcat cccttggaag 120

cacggcctac ggcaggatgc acagcaggag gatttcggaa tcttccaggc ctgggccgag 180

gccactggtg catatgttcc cgggagggat aagccagacc tgccaacctg gaagaggaat 240

ttccgctctg ccctcaaccg caaagaaggg ttgcgtttag cagaggaccg gagcaaggac 300

cctcacgacc cacataaaat ctacgagttt gtgaactcag gagttgggga cttttcccag 360

ccagacacct ctccggacac caatggtgga ggcagtactt ctgataccca ggaagacatt 420

ctggatgagt tactgggtaa catggtgttg gccccactcc cagatccggg acccccaagc 480

ctggctgtag cccctgagcc ctgccctcag cccctgcgga gccccagctt ggacaatccc 540

actcccttcc caaacctggg gccctctgag aacccactga agcggctgtt ggtgccgggg 600

gaagagtggg agttcgaggt gacagccttc taccggggcc gccaagtctt ccagcagacc 660

atctcctgcc cggagggcct gcggctggtg gggtccgaag tgggagacag gacgctgcct 720

ggatggccag tcacactgcc agaccctggc atgtccctga cagacagggg agtgatgagc 780

tacgtgaggc atgtgctgag ctgcctgggt gggggactgg ctctctggcg ggccgggcag 840

tggctctggg cccagcggct ggggcactgc cacacatact gggcagtgag cgaggagctg 900

ctccccaaca gcgggcatgg gcctgatggc gaggtcccca aggacaagga aggaggcgtg 960

tttgacctgg ggcccttcat tgtagatctg attaccttca cggaaggaag cggacgctca 1020

ccacgctatg ccctctggtt ctgtgtgggg gagtcatggc cccaggacca gccgtggacc 1080

aagaggctcg tgatggtcaa ggttgtgccc acgtgcctca gggccttggt agaaatggcc 1140

cgggtagggg gtgcctcctc cctggagaat actgtggacc tgcacatttc caacagccac 1200

ccactctccc tcacctccga ccagtacaag gcctacctgc aggacttggt ggagggcatg 1260

gatttccagg gccctgggga gagc 1284

<210> 127

<211> 1275

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TANK

<400> 127

atggataaaa acattggcga gcaactcaat aaagcgtatg aagccttccg gcaggcatgc 60

atggatagag attctgcagt aaaagaatta cagcaaaaga ctgagaacta tgagcagaga 120

atacgtgaac aacaggaaca gctgtcactt caacagacta ttattgacaa gctaaaatct 180

cagttacttc ttgtgaattc cactcaagat aacaattatg gctgtgttcc tctgcttgaa 240

gacagtgaaa caagaaagaa taatttgact cttgatcagc cacaagataa agtgatttca 300

ggaatagcaa gagaaaaact accaaaggta agaagacaag aggtttcttc tcctagaaaa 360

gaaacttcag caaggagtct tggcagtcct ttgctccatg aaaggggtaa tatagagaag 420

actttctggg atctgaaaga agaatttcat aaaatatgca tgctagcaaa agcacagaaa 480

gaccacttaa gcaaacttaa tataccagac actgcaactg aaacacagtg ctctgtgcct 540

atacagtgta cggataaaac agataaacaa gaagcgctgt ttaagcctca ggctaaagat 600

gatataaata gaggtgcacc atccatcaca tctgtcacac caagaggact gtgcagagat 660

gaggaagaca cctcttttga atcactttct aaattcaatg tcaagtttcc acctatggac 720

aatgactcaa ctttcttaca tagcactcca gagagacccg gcatccttag tcctgccacg 780

tctgaggcag tgtgccaaga gaaatttaat atggagttca gagacaaccc agggaacttt 840

gttaaaacag aagaaacttt atttgaaatt cagggaattg accccatagc ttcagctata 900

caaaacctta aaacaactga caaaacaaag ccctcaaatc tcgtaaacac ttgtatcagg 960

acaactctgg atagagctgc gtgtttgcca cctggagacc ataatgcatt atatgtaaat 1020

agcttcccac ttctggaccc atctgatgca ccttttccct cactcgattc cccgggaaaa 1080

gcaatccgag gaccacagca gcccatttgg aagcccttc ctaatcaaga cagtgactcg 1140

gtggtactaa gtggcacaga ctcagaactg catatacctc gagtatgtga attctgtcaa 1200

gcagttttcc caccatccat tacatccagg ggggatttcc ttcggcatct taattcacac 1260
ttcaatggag agact 1275

<210> 128

<211> 2136

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TRIF/TICAM1

<400> 128

atggcctgca caggcccatc acttcctagc gccttcgaca ttctaggtgc agcaggccag 60
gacaagctct tgtatctgaa gcacaaactg aagaccccac gcccaggctg ccaggggcag 120
gacctcctgc atgccatggt tctcctgaag ctgggccagg aaactgaggc caggatctct 180
ctagaggcat tgaaggccga tgcggtggcc cggctggtgg cccgccagtg ggctggcgtg 240

gacagcaccg aggacccaga ggagccccca gatgtgtcct gggctgtggc ccgcttgtac 300
cacctgctgg ctgaggagaa gctgtgcccc gcctcgctgc gggacgtggc ctaccaggaa 360
gccgtccgca ccctcagctc cagggacgac caccggctgg gggaacttca ggatgaggcc 420
cgaaaccggt gtgggtggga cattgctggg gatccaggga gcatccggac gctccagtcc 480
aatctgggct gcctcccacc atcctcggct ttgccctctg ggaccaggag cctcccacgc 540
cccattgacg gtgtttcgga ctggagccaa gggtgctccc tgcgatccac tggcagccct 600
gcctccctgg ccagcaactt ggaaatcagc cagtccccta ccatgccctt cctcagcctg 660
caccgcagcc cacatgggcc cagcaagctc tgtgacgacc cccaggccag cttggtgccc 720

gagcctgtcc ccggtggctg ccaggagcct gaggagatga gctggccgcc atcgggggag 780
attgccagcc caccagagct gccaagcagc ccacctcctg ggcttcccga agtggcccca 840
gatgcaacct ccactggcct ccctgatacc cccgcagctc cagaaaccag caccaactac 900
ccagtggagt gcaccgaggg gtctgcaggc ccccagtctc tccccttgcc tattctggag 960
ccggtcaaaa acccctgctc tgtcaaagac cagacgccac tccaactttc tgtagaagat 1020
accacctctc caaataccaa gccgtgccca cctactccca ccaccccaga aacatcccct 1080
cctcctcctc ctcctcctcc ttcatctact ccttgttcag ctcacctgac cccctcctcc 1140
ctgttccctt cctccctgga atcatcatcg gaacagaaat tctataactt tgtgatcctc 1200

cacgccaggg cagacgaaca catcgccctg cgggttcggg agaagctgga ggcccttggc 1260

gtgcccgacg gggccacctt ctgcgaggat ttccaggtgc cggggcgcgg ggagctgagc 1320

tgcctgcagg acgccataga ccactcagct ttcatcatcc tacttctcac ctccaacttc 1380

gactgtcgcc tgagcctgca ccaggtgaac caagccatga tgagcaacct cacgcgacag 1440

gggtcgccag actgtgtcat ccccttcctg cccctggaga gctccccggc ccagctcagc 1500

tccgacacgg ccagcctgct ctccgggctg gtgcggctgg acgaacactc ccagatcttc 1560

gccaggaagg tggccaacac cttcaagccc cacaggcttc aggcccgaaa ggccatgtgg 1620

aggaaggaac aggacacccg agccctgcgg gaacagagcc aacacctgga cggtgagcgg 1680

atgcaggcgg cggcactgaa cgcagcctac tcagcctacc tccagagcta cttgtcctac 1740

caggcacaga tggagcagct ccaggtggct tttgggagcc acatgtcatt tgggactggg 1800

gcgccctatg gggctcgaat gccctttggg ggccaggtgc ccctgggagc cccgccaccc 1860

tttcccactt ggccggggtg cccgcagccg ccacccctgc acgcatggca ggctggcacc 1920

cccccaccgc cctccccaca gccagcagcc tttccacagt cactgccctt cccgcagtcc 1980

ccagccttcc ctacggcctc acccgcaccc cctcagagcc cagggctgca acccctcatt 2040

atccaccacg cacagatggt acagctgggg ctgaacaacc acatgtggaa ccagagaggg 2100

tcccaggcgc ccgaggacaa gacgcaggag gcagaa 2136

<210> 129

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Batf3

<400> 129

atgtcgcaag ggctcccggc cgccggcagc gtcctgcaga ggagcgtcgc ggcgcccggg 60

aaccagccgc agccgcagcc gcagcagcag agccctgagg atgatgacag gaaggtccga 120

aggagagaaa aaaaccgagt tgctgctcag agaagtcgga agaagcagac ccagaaggct 180

gacaagctcc atgaggaata tgagagcctg gagcaagaaa acaccatgct gcggagagag 240

atcgggaagc tgacagagga gctgaagcac ctgacagagg cactgaagga gcacgagaag 300

atgtgcccgc tgctgctctg ccctatgaac tttgtgccag tgcctccccg gccggaccct 360

gtggccggct gcttgccccg a 381

<210> 130

<211> 459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-4, isoform 1

<400> 130

atgggtctca cctcccaact gcttcccct ctgttcttcc tgctagcatg tgccggcaac 60

tttgtccacg gacacaagtg cgatatcacc ttacaggaga tcatcaaaac tttgaacagc 120

ctcacagagc agaagactct gtgcaccgag ttgaccgtaa cagacatctt tgctgcctcc 180

aagaacacaa ctgagaagga aaccttctgc agggctgcga ctgtgctccg gcagttctac 240

agccaccatg agaaggacac tcgctgcctg ggtgcgactg cacagcagtt ccacaggcac 300

aagcagctga tccgattcct gaaacggctc gacaggaacc tctggggcct ggcgggcttg 360

aattcctgtc ctgtgaagga agccaaccag agtacgttgg aaaacttctt ggaaaggcta 420

aagacgatca tgagagagaa atattcaaag tgttcgagc 459

<210> 131

<211> 534

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-10

<400> 131

atgcacagct cagcactgct ctgttgcctg gtcctcctga ctggggtgag ggccagccca 60

ggccagggca cccagtctga gaacagctgc acccacttcc caggcaacct gcctaacatg 120

cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaaat gaaggatcag 180

ctggacaact tgttgttaaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240

caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccca agctgagaac 300

caagacccag acatcaaggc gcatgtgaac tccctggggg agaacctgaa gaccctcagg 360

ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt ccctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420

caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagtgag 480

tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaac 534

<210> 132

<211> 759

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-12 alpha

<400> 132

atgtggcccc ctgggtcagc ctcccagcca ccgccctcac ctgccgcggc cacaggtctg 60

catccagcgg ctcgccctgt gtccctgcag tgccggctca gcatgtgtcc agcgcgcagc 120

ctcctccttg tggctaccct ggtcctcctg gaccacctca gtttggccag aaacctcccc 180

gtggccactc cagacccagg aatgttccca tgccttcacc actcccaaaa cctgctgagg 240

gccgtcagca acatgctcca gaaggccaga caaactctag aattttaccc ttgcacttct 300

gaagagattg atcatgaaga tatcacaaaa gataaaacca gcacagtgga ggcctgttta 360

ccattggaat taaccaagaa tgagagttgc ctaaattcca gagagacctc tttcataact 420

aatgggagtt gcctggcctc cagaaagacc tcttttatga tggccctgtg ccttagtagt 480

atttatgaag acttgaagat gtaccaggtg gagttcaaga ccatgaatgc aaagcttctg 540

atggatccta agaggcagat ctttctagat caaaacatgc tggcagttat tgatgagctg 600

atgcaggccc tgaatttcaa cagtgagact gtgccacaaa aatcctccct tgaagaaccg 660

gatttttata aaactaaaat caagctctgc atacttcttc atgctttcag aattcgggca 720

gtgactattg atagagtgat gagctatctg aatgcttcc 759

<210> 133

<211> 986

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-12 beta

<400> 133

agatgtgtca ccagcagttg gtcatctctt ggttttccct ggtttttctg gcatctcccc 60

tcgtggccat atgggaactg aagaaagatg tttatgtcgt agaattggat tggtatccgg 120

atgcccctgg agaaatggtg gtcctcacct gtgacacccc tgaagaagat ggtatcacct 180

ggaccttgga ccagagcagt gaggtcttag gctctggcaa aaccctgacc atccaagtca 240

aagagtttgg agatgctggc cagtacacct gtcacaaagg aggcgaggtt ctaagccatt 300

cgctcctgct gcttcacaaa aaggaagatg gaatttggtc cactgatatt ttaaaggacc 360

agaaagaacc caaaaataag acctttctaa gatgcgaggc caagaattat tctggacgtt 420

tcacctgctg gtggctgacg acaatcagta ctgatttgac attcagtgtc aaaagcagca 480

gaggctcttc tgacccccaa ggggtgacgt gcggagctgc tacactctct gcagagagag 540

tcagagggga caacaaggag tatgagtact cagtggagtg ccaggaggac agtgcctgcc 600

cagctgctga ggagagtctg cccattgagg tcatggtgga tgccgttcac aagctcaagt 660

atgaaaacta caccagcagc ttcttcatca gggacatcat caaacctgac ccacccaaga 720

acttgcagct gaagccatta aagaattctc ggcaggtgga ggtcagctgg gagtaccctg 780

acacctggag tactccacat tcctacttct ccctgacatt ctgcgttcag gtccagggca 840

agagcaagag agaaaagaaa gatagagtct tcacggacaa gacctcagcc acggtcatct 900

gccgcaaaaa tgccagcatt agcgtgcggg cccaggaccg ctactatagc tcatcttgga 960

gcgaatgggc atctgtgccc tgcagt 986

<210> 134

<211> 276

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MIP-1 alpha/ CCL3

<400> 134

atgcaggtct ccactgctgc ccttgctgtc ctcctctgca ccatggctct ctgcaaccag 60

ttctctgcat cacttgctgc tgacacgccg accgcctgct gcttcagcta cacctcccgg 120

cagattccac agaatttcat agctgactac tttgagacga gcagccagtg ctccaagccc 180

ggtgtcatct tcctaaccaa gcgaagccgg caggtctgtg ctgaccccag tgaggagtgg 240

gtccagaaat atgtcagcga cctggagctg agtgcc 276

<210> 135

<211> 1530

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD39/ENTPD1, isoform 1

<400> 135

atggaagata caaaggagtc taacgtgaag acattttgct ccaagaatat cctagccatc 60

cttggcttct cctctatcat agctgtgata gctttgcttg ctgtggggtt gacccagaac 120

aaagcattgc cagaaaacgt taagtatggg attgtgctgg atgcgggttc ttctcacaca 180

agtttataca tctataagtg gccagcagaa aaggagaatg acacaggcgt ggtgcatcaa 240

gtagaagaat gcagggttaa aggtcctgga atctcaaaat ttgttcagaa agtaaatgaa 300

ataggcattt acctgactga ttgcatggaa agagctaggg aagtgattcc aaggtcccag 360

caccaagaga cacccgttta cctgggagcc acggcaggca tgcggttgct caggatggaa 420

agtgaagagt tggcagacag ggttctggat gtggtggaga ggagcctcag caactacccc 480

tttgacttcc agggtgccag gatcattact ggccaagagg aaggtgccta tggctggatt 540

actatcaact atctgctggg caaattcagt cagaaaacaa ggtggttcag catagtccca 600

tatgaaacca ataatcagga aacctttgga gctttggacc ttgggggagc ctctacacaa 660

gtcacttttg taccccaaaa ccagactatc gagtccccag ataatgctct gcaatttcgc 720

ctctatggca aggactacaa tgtctacaca catagcttct tgtgctatgg gaaggatcag 780

gcactctggc agaaactggc caaggacatt caggttgcaa gtaatgaaat tctcagggac 840

ccatgctttc atcctggata taagaaggta gtgaacgtaa gtgaccttta caagaccccc 900

tgcaccaaga gatttgagat gactcttcca ttccagcagt ttgaaatcca gggtattgga 960

aactatcaac aatgccatca aagcatcctg gagctcttca acaccagtta ctgcccttac 1020

tcccagtgtg ccttcaatgg gattttcttg ccaccactcc agggggattt tggggcattt 1080

tcagcttttt actttgtgat gaagttttta aacttgacat cagagaaagt ctctcaggaa 1140

aaggtgactg agatgatgaa aaagttctgt gctcagcctt gggaggagat aaaaacatct 1200

tacgctggag taaaggagaa gtacctgagt gaatactgct tttctggtac ctacattctc 1260

tccctccttc tgcaaggcta tcatttcaca gctgattcct gggagcacat ccatttcatt 1320

ggcaagatcc agggcagcga cgccggctgg actttgggct acatgctgaa cctgaccaac 1380

atgatcccag ctgagcaacc attgtccaca cctctctccc actccaccta tgtcttcctc 1440

atggttctat tctccctggt ccttttcaca gtggccatca taggcttgct tatctttcac 1500

aagccttcat atttctggaa agatatggta 1530

<210> 136

<211> 1722

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD73/NT5E, isoform 1

<400> 136

atgtgtcccc gagccgcgcg ggcgcccgcg acgctactcc tcgccctggg cgcggtgctg 60

tggcctgcgg ctggcgcctg ggagcttacg attttgcaca ccaacgacgt gcacagccgg 120

ctggagcaga ccagcgagga ctccagcaag tgcgtcaacg ccagccgctg catgggtggc 180

gtggctcggc tcttcaccaa ggttcagcag atccgccgcg ccgaacccaa cgtgctgctg 240

ctggacgccg gcgaccagta ccagggcact atctggttca ccgtgtacaa gggcgccgag 300

gtggcgcact tcatgaacgc cctgcgctac gatgccatgg cactgggaaa tcatgaattt 360

gataatggtg tggaaggact gatcgagcca ctcctcaaag aggccaaatt tccaattctg 420

agtgcaaaca ttaaagcaaa ggggccacta gcatctcaaa tatcaggact ttatttgcca 480

tataaagttc ttcctgttgg tgatgaagtt gtgggaatcg ttggatacac ttccaaagaa 540

acccctttc tctcaaatcc agggacaaat ttagtgtttg aagatgaaat cactgcatta 600

caacctgaag tagataagtt aaaaactcta aatgtgaaca aaattattgc actgggacat 660

tcgggttttg aaatggataa actcatcgct cagaaagtga ggggtgtgga cgtcgtggtg 720

ggaggacact ccaacacatt tctttacaca ggcaatccac cttccaaaga ggtgcctgct 780

gggaagtacc cattcatagt cacttctgat gatgggcgga aggttcctgt agtccaggcc 840

tatgcttttg gcaaatacct aggctatctg aagatcgagt ttgatgaaag aggaaacgtc 900

atctcttccc atggaaatcc cattcttcta aacagcagca ttcctgaaga tccaagcata 960

aaagcagaca ttaacaaatg gaggataaaa ttggataatt attctaccca ggaattaggg 1020

aaaacaattg tctatctgga tggctcctct caatcatgcc gctttagaga atgcaacatg 1080

ggcaacctga tttgtgatgc aatgattaac aacaacctga gacacacgga tgaaatgttc 1140

tggaaccacg tatccatgtg cattttaaat ggaggtggta tccggtcgcc cattgatgaa 1200

cgcaacaatg gcacaattac ctgggagaac ctggctgctg tattgccctt tggaggcaca 1260

tttgacctag tccagttaaa aggttccacc ctgaagaagg cctttgagca tagcgtgcac 1320

cgctacggcc agtccactgg agagttcctg caggtgggcg gaatccatgt ggtgtatgat 1380

ctttcccgaa aacctggaga cagagtagtc aaattagatg ttctttgcac caagtgtcga 1440

gtgcccagtt atgaccctct caaaatggac gaggtatata aggtgatcct cccaaacttc 1500

ctggccaatg gtggagatgg gttccagatg ataaaagatg aattattaag acatgactct 1560

ggtgaccaag atatcaacgt ggtttctaca tatatctcca aaatgaaagt aatttatcca 1620

gcagttgaag gtcggatcaa gttttccaca ggaagtcact gccatggaag cttttcttta 1680

atatttcttt cactttgggc agtgatcttt gttttatacc aa 1722

<210> 137

<211> 297

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-8 (CXCL8)

<400> 137

atgacttcca agctggccgt ggctctcttg gcagccttcc tgatttctgc agctctgtgt 60

gaaggtgcag ttttgccaag gagtgctaaa gaacttagat gtcagtgcat aaagacatac 120

tccaaacctt tccaccccaa atttatcaaa gaactgagag tgattgagag tggaccacac 180

tgcgccaaca cagaaattat tgtaaagctt tctgatggaa gagagctctg tctggacccc 240

aaggaaaact gggtgcagag ggttgtggag aagtttttga agagggctga gaattca 297

<210> 138

<211> 1596

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ICAM1

<400> 138

atggctccca gcagcccccg gcccgcgctg cccgcactcc tggtcctgct cggggctctg 60

ttcccaggac ctggcaatgc ccagacatct gtgtcccccc caaaagtcat cctgccccgg 120

ggaggctccg tgctggtgac atgcagcacc tcctgtgacc agcccaagtt gttgggcata 180

gagaccccgt tgcctaaaaa ggagttgctc ctgcctggga acaaccggaa ggtgtatgaa 240

ctgagcaatg tgcaagaaga tagccaacca atgtgctatt caaactgccc tgatgggcag 300

tcaacagcta aaaccttcct caccgtgtac tggactccag aacgggtgga actggcaccc 360

ctcccctctt ggcagccagt gggcaagaac cttaccctac gctgccaggt ggagggtggg 420

gcaccccggg ccaacctcac cgtggtgctg ctccgtgggg agaaggagct gaaacgggag 480

ccagctgtgg gggagcccgc tgaggtcacg accacggtgc tggtgaggag agatcaccat 540

ggagccaatt tctcgtgccg cactgaactg gacctgcggc cccaagggct ggagctgttt 600

gagaacacct cggcccccta ccagctccag acctttgtcc tgccagcgac tcccccacaa 660

cttgtcagcc cccgggtcct agaggtggac acgcagggga ccgtggtctg ttccctggac 720

gggctgttcc cagtctcgga ggcccaggtc cacctggcac tgggggacca gaggttgaac 780

cccacagtca cctatggcaa cgactccttc tcggccaagg cctcagtcag tgtgaccgca 840

gaggacgagg gcacccagcg gctgacgtgt gcagtaatac tggggaacca gagccaggag 900

acactgcaga cagtgaccat ctacagcttt ccggcgccca acgtgattct gacgaagcca 960

gaggtctcag aagggaccga ggtgacagtg aagtgtgagg cccaccctag agccaaggtg 1020

acgctgaatg gggttccagc ccagccactg ggcccgaggg cccagctcct gctgaaggcc 1080

accccagagg acaacgggcg cagcttctcc tgctctgcaa ccctggaggt ggccggccag 1140

cttatacaca agaaccagac ccgggagctt cgtgtcctgt atggcccccg actggacgag 1200

agggattgtc cgggaaactg gacgtggcca gaaaattccc agcagactcc aatgtgccag 1260

gcttggggga acccattgcc cgagctcaag tgtctaaagg atggcacttt cccactgccc 1320

atcggggaat cagtgactgt cactcgagat cttgagggca cctacctctg tcgggccagg 1380

agcactcaag gggaggtcac ccgcaaggtg accgtgaatg tgctctcccc ccggtatgag 1440

attgtcatca tcactgtggt agcagccgca gtcataatgg gcactgcagg cctcagcacg 1500

tacctctata accgccagcg gaagatcaag aaatacagac tacaacaggc ccaaaaaggg 1560

acccccatga aaccgaacac acaagccacg cctccc 1596

<210> 139

<211> 1488

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> angiopoietin 2, isoform 1

<400> 139

atgtggcaga ttgttttctt tactctgagc tgtgatcttg tcttggccgc agcctataac 60

aactttcgga agagcatgga cagcatagga aagaagcaat atcaggtcca gcatgggtcc 120

tgcagctaca ctttcctcct gccagagatg gacaactgcc gctcttcctc cagcccctac 180

gtgtccaatg ctgtgcagag ggacgcgccg ctcgaatacg atgactcggt gcagaggctg 240

caagtgctgg agaacatcat ggaaaacaac actcagtggc taatgaagct tgagaattat 300

atccaggaca acatgaagaa agaaatggta gagatacagc agaatgcagt acagaaccag 360

acggctgtga tgatagaaat agggacaaac ctgttgaacc aaacagcgga gcaaacgcgg 420

aagttaactg atgtggaagc ccaagtatta aatcagacca cgagacttga acttcagctc 480

ttggaacact ccctctcgac aaacaaattg gaaaaacaga ttttggacca gaccagtgaa 540

ataaacaaat tgcaagataa gaacagtttc ctagaaaaga aggtgctagc tatggaagac 600

aagcacatca tccaactaca gtcaataaaa gaagagaaag atcagctaca ggtgttagta 660

tccaagcaaa attccatcat tgaagaacta gaaaaaaaaa tagtgactgc cacggtgaat 720

aattcagttc ttcagaagca gcaacatgat ctcatggaga cagttaataa cttactgact 780

atgatgtcca catcaaactc agctaaggac cccactgttg ctaaagaaga acaaatcagc 840

ttcagagact gtgctgaagt attcaaatca ggacacacca cgaatggcat ctacacgtta 900

acattcccta attctacaga agagatcaag gcctactgtg acatggaagc tggaggaggc 960

gggtggacaa ttattcagcg acgtgaggat ggcagcgttg attttcagag gacttggaaa 1020

gaatataaag tgggatttgg taacccttca ggagaatatt ggctgggaaa tgagtttgtt 1080

tcgcaactga ctaatcagca acgctatgtg cttaaaatac accttaaaga ctgggaaggg 1140

aatgaggctt actcattgta tgaacatttc tatctctcaa gtgaagaact caattatagg 1200

attcacctta aaggacttac agggacagcc ggcaaaataa gcagcatcag ccaaccagga 1260

aatgatttta gcacaaagga tggagacaac gacaaatgta tttgcaaatg ttcacaaatg 1320

ctaacaggag gctggtggtt tgatgcatgt ggtccttcca acttgaacgg aatgtactat 1380

ccacagaggc agaacacaaa taagttcaac ggcattaaat ggtactactg gaaaggctca 1440

ggctattcgc tcaaggccac aaccatgatg atccgaccag cagatttc 1488

<210> 140

<211> 2766

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NLRP3, isoform 2

<400> 140

atgaagatgg caagcacccg ctgcaagctg gccaggtacc tggaggacct ggaggatgtg 60

gacttgaaga aatttaagat gcacttagag gactatcctc cccagaaggg ctgcatcccc 120

ctcccgaggg gtcagacaga gaaggcagac catgtggatc tagccacgct aatgatcgac 180

ttcaatgggg aggagaaggc gtgggccatg gccgtgtgga tcttcgctgc gatcaacagg 240

agagaccttt atgagaaagc aaaaagagat gagccgaagt ggggttcaga taatgcacgt 300

gtttcgaatc ccactgtgat atgccaggaa gacagcattg aagaggagtg gatgggttta 360

ctggagtacc tttcgagaat ctctatttgt aaaatgaaga aagattaccg taagaagtac 420

agaaagtacg tgagaagcag attccagtgc attgaagaca ggaatgcccg tctgggtgag 480

agtgtgagcc tcaacaaacg ctacacacga ctgcgtctca tcaaggagca ccggagccag 540

caggagaggg agcaggagct tctggccatc ggcaagacca agacgtgtga gagccccgtg 600

agtcccatta agatggagtt gctgtttgac cccgatgatg agcattctga gcctgtgcac 660

accgtggtgt tccaggggggc ggcagggatt gggaaaacaa tcctggccag gaagatgatg 720

ttggactggg cgtcggggac actctaccaa gacaggtttg actatctgtt ctatatccac 780

tgtcgggagg tgagccttgt gacacagagg agcctggggg acctgatcat gagctgctgc 840

cccgacccaa acccacccat ccacaagatc gtgagaaaac cctccagaat cctcttcctc 900

atggacggct tcgatgagct gcaaggtgcc tttgacgagc acataggacc gctctgcact 960

gactggcaga aggccgagcg gggagacatt ctcctgagca gcctcatcag aaagaagctg 1020

cttcccgagg cctctctgct catcaccacg agacctgtgg ccctggagaa actgcagcac 1080

ttgctggacc atcctcggca tgtggagatc ctgggtttct ccgaggccaa aaggaaagag 1140

tacttcttca agtacttctc tgatgaggcc caagccaggg cagccttcag tctgattcag 1200

gagaacgagg tcctcttcac catgtgcttc atccccctgg tctgctggat cgtgtgcact 1260

ggactgaaac agcagatgga gagtggcaag agccttgccc agacatccaa gaccaccacc 1320

gcggtgtacg tcttcttcct ttccagtttg ctgcagcccc ggggagggag ccaggagcac 1380

ggcctctgcg cccacctctg ggggctctgc tctttggctg cagatggaat ctggaaccag 1440

aaaatcctgt ttgaggagtc cgacctcagg aatcatggac tgcagaaggc ggatgtgtct 1500

gctttcctga ggatgaacct gttccaaaag gaagtggact gcgagaagtt ctacagcttc 1560

atccacatga ctttccagga gttctttgcc gccatgtact acctgctgga agaggaaaag 1620

gaaggaagga cgaacgttcc agggagtcgt ttgaagcttc ccagccgaga cgtgacagtc 1680

cttctggaaa actatggcaa attcgaaaag gggtatttga tttttgttgt acgtttcctc 1740

tttggcctgg taaaccagga gaggacctcc tacttggaga agaaattaag ttgcaagatc 1800

tctcagcaaa tcaggctgga gctgctgaaa tggattgaag tgaaagccaa agctaaaaag 1860

ctgcagatcc agcccagcca gctggaattg ttctactgtt tgtacgagat gcaggaggag 1920

gacttcgtgc aaagggccat ggactatttc cccaagattg agatcaatct ctccaccaga 1980

atggaccaca tggtttcttc cttttgcatt gagaactgtc atcgggtgga gtcactgtcc 2040

ctggggtttc tccataacat gcccaaggag gaagaggagg aggaaaagga aggccgacac 2100

cttgatatgg tgcagtgtgt cctcccaagc tcctctcatg ctgcctgttc tcatgggttg 2160

gggcgctgtg gcctctcgca tgagtgctgc ttcgacatct ccttggtcct cagcagcaac 2220

cagaagctgg tggagctgga cctgagtgac aacgccctcg gtgacttcgg aatcagactt 2280

ctgtgtgtgg gactgaagca cctgttgtgc aatctgaaga agctctggtt ggtgaattct 2340

ggccttacgt cagtctgttg ttcagctttg tcctcggtac tcagcactaa tcagaatctc 2400

acgcaccttt acctgcgagg caacactctc ggagacaagg ggatcaaact actctgtgag 2460

ggactcttgc accccgactg caagcttcag gtgttggaat tagacaactg caacctcacg 2520

tcacactgct gctgggatct ttccacactt ctgacctcca gccagagcct gcgaaagctg 2580

agcctgggca acaatgacct gggcgacctg ggggtcatga tgttctgtga agtgctgaaa 2640

cagcagagct gcctcctgca gaacctgggg ttgtctgaaa tgtatttcaa ttatgagaca 2700

aaaagtgcgt tagaaacact tcaagaagaa aagcctgagc tgaccgtcgt ctttgagcct 2760

tcttgg 2766

<210> 141

<211> 831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD40, isoform 1

<400> 141

atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca 60

gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg 120

tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt 180

ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac 240

aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac 300

accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc 360

ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat 420

accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc tttcgaaaaa 480

tgtcaccctt ggacaagctg tgagaccaaa gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaac 540

aagactgatg ttgtctgtgg tccccaggat cggctgagag ccctggtggt gatccccatc 600

atcttcggga tcctgtttgc catcctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag 660

aagccaacca ataaggcccc ccaccccaag caggaacccc aggagatcaa ttttcccgac 720

gatcttcctg gctccaacac tgctgctcca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg 780

gtcacccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtgc aggagagaca g 831

<210> 142

<211> 783

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD40 ligand (CD40L)

<400> 142

atgatcgaaa catacaacca aacttctccc cgatctgcgg ccactggact gcccatcagc 60

atgaaaattt ttatgtattt acttactgtt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca 120

ctttttgctg tgtatcttca tagaaggttg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat 180

gaagattttg tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc 240

ttactgaact gtgaggagat taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta 300

aacaaagagg agacgaagaa agaaaacagc tttgaaatgc aaaaaggtga tcagaatcct 360

caaattgcgg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg 420

gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtaa ccctggaaaa tgggaaacag 480

ctgaccgtta aaagacaagg actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat 540

cgggaagctt cgagtcaagc tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga 600

ttcgagagaa tcttactcag agctgcaaat acccacagtt ccgccaaacc ttgcgggcaa 660

caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat 720

gtgactgatc caagccaagt gagccatggc actggcttca cgtcctttgg cttactcaaa 780

ctc 783

<210> 143

<211> 579

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD-70 antigen, isoform 1

<400> 143

atgccggagg agggttcggg ctgctcggtg cggcgcaggc cctatgggtg cgtcctgcgg 60

gctgctttgg tcccattggt cgcgggcttg gtgatctgcc tcgtggtgtg catccagcgc 120

ttcgcacagg ctcagcagca gctgccgctc gagtcacttg ggtgggacgt agctgagctg 180

cagctgaatc acacaggacc tcagcaggac cccaggctat actggcaggg gggcccagca 240

ctgggccgct ccttcctgca tggaccagag ctggacaagg ggcagctacg tatccatcgt 300

gatggcatct acatggtaca catccaggtg acgctggcca tctgctcctc cacgacggcc 360

tccaggcacc accccaccac cctggccgtg ggaatctgct ctcccgcctc ccgtagcatc 420

agcctgctgc gtctcagctt ccaccaaggt tgtaccattg cctcccagcg cctgacgccc 480

ctggcccgag gggacacact ctgcaccaac ctcactggga cacttttgcc ttcccgaaac 540

actgatgaga ccttctttgg agtgcagtgg gtgcgcccc 579

<210> 144

<211> 765

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD137 (4-1BB, TNFRSF9)

<400> 144

atgggaaaca gctgttacaa catagtagcc actctgttgc tggtcctcaa ctttgagagg 60

acaagatcat tgcaggatcc ttgtagtaac tgcccagctg gtacattctg tgataataac 120

aggaatcaga tttgcagtcc ctgtcctcca aatagtttct ccagcgcagg tggacaaagg 180

acctgtgaca tatgcaggca gtgtaaaggt gttttcagga ccaggaagga gtgttcctcc 240

accagcaatg cagagtgtga ctgcactcca gggtttcact gcctgggggc aggatgcagc 300

atgtgtgaac aggattgtaa acaaggtcaa gaactgacaa aaaaaggttg taaagactgt 360

tgctttggga catttaacga tcagaaacgt ggcatctgtc gaccctggac aaactgttct 420

ttggatggaa agtctgtgct tgtgaatggg acgaaggaga gggacgtggt ctgtggacca 480

tctccagccg acctctctcc gggagcatcc tctgtgaccc cgcctgcccc tgcgagagag 540

ccaggacact ctccgcagat catctccttc tttcttgcgc tgacgtcgac tgcgttgctc 600

ttcctgctgt tcttcctcac gctccgtttc tctgttgtta aacggggcag aaagaaactc 660

ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 720

tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactg 765

<210> 145

<211> 807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD200, isoform 1

<400> 145

atggagaggc tggtgatcag gatgcccttc tctcatctgt ctacctacag cctggtttgg 60

gtcatggcag cagtggtgct gtgcacagca caagtgcaag tggtgaccca ggatgaaaga 120

gagcagctgt acacacctgc ttccttaaaa tgctctctgc aaaatgccca ggaagccctc 180

attgtgacat ggcagaaaaa gaaagctgta agcccagaaa acatggtcac cttcagcgag 240

aaccatgggg tggtgatcca gcctgcctat aaggacaaga taaacattac ccagctggga 300

ctccaaaact caaccatcac cttctggaat atcaccctgg aggatgaagg gtgttacatg 360

tgtctcttca ataccttttgg ttttgggaag atctcaggaa cggcctgcct caccgtctat 420

gtacagccca tagtatccct tcactacaaa ttctctgaag accacctaaa tatcacttgc 480

tctgccactg cccgcccagc ccccatggtc ttctggaagg tccctcggtc agggattgaa 540

aatagtacag tgactctgtc tcacccaaat gggaccacgt ctgttaccag catcctccat 600

atcaaagacc ctaagaatca ggtggggaag gaggtgatct gccaggtgct gcacctgggg 660

actgtgaccg actttaagca aaccgtcaac aaaggctatt ggttttcagt tccgctattg 720

ctaagcattg tttccctggt aattcttctc gtcctaatct caatcttact gtactggaaa 780

cgtcaccgga atcaggaccg agagccc 807

<210> 146

<211> 1236

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> A2aR (ADORA2A)

<400> 146

atgcccatca tgggctcctc ggtgtacatc acggtggagc tggccattgc tgtgctggcc 60

atcctgggca atgtgctggt gtgctgggcc gtgtggctca acagcaacct gcagaacgtc 120

accaactact ttgtggtgtc actggcggcg gccgacatcg cagtgggtgt gctcgccatc 180

ccctttgcca tcaccatcag caccgggttc tgcgctgcct gccacggctg cctcttcatt 240

gcctgcttcg tcctggtcct cacgcagagc tccatcttca gtctcctggc catcgccatt 300

gaccgctaca ttgccatccg catcccgctc cggtacaatg gcttggtgac cggcacgagg 360

gctaagggca tcattgccat ctgctgggtg ctgtcgtttg ccatcggcct gactcccatg 420

ctaggttgga acaactgcgg tcagccaaag gagggcaaga accactccca gggctgcggg 480

gagggccaag tggcctgtct ctttgaggat gtggtcccca tgaactacat ggtgtacttc 540

aacttctttg cctgtgtgct ggtgcccctg ctgctcatgc tgggtgtcta tttgcggatc 600

ttcctggcgg cgcgacgaca gctgaagcag atggagagcc agcctctgcc gggggagcgg 660

gcacggtcca cactgcagaa ggaggtccat gctgccaagt cactggccat cattgtgggg 720

ctctttgccc tctgctggct gcccctacac atcatcaact gcttcacttt cttctgcccc 780

gactgcagcc acgcccctct ctggctcatg tacctggcca tcgtcctctc ccacaccaat 840

tcggttgtga atcccttcat ctacgcctac cgtatccgcg agttccgcca gaccttccgc 900

aagatcattc gcagccacgt cctgaggcag caagaacctt tcaaggcagc tggcaccagt 960

gcccgggtct tggcagctca tggcagtgac ggagagcagg tcagcctccg tctcaacggc 1020

cacccgccag gagtgtgggc caacggcagt gctccccacc ctgagcggag gcccaatggc 1080

tatgccctgg ggctggtgag tggagggagt gcccaagagt cccaggggaa cacgggcctc 1140

ccagacgtgg agctccttag ccatgagctc aagggagtgt gcccagagcc ccctggccta 1200

gatgaccccc tggcccagga tggagcagga gtgtcc 1236

<210

> 147

<211> 723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> GITR/TNFRSF18, isoform 1

<400> 147

atggcacagc acggggcgat gggcgcgttt cgggccctgt gcggcctggc gctgctgtgc 60

gcgctcagcc tgggtcagcg ccccaccggg ggtcccgggt gcggccctgg gcgcctcctg 120

cttgggacgg gaacggacgc gcgctgctgc cgggttcaca cgacgcgctg ctgccgcgat 180

tacccgggcg aggagtgctg ttccgagtgg gactgcatgt gtgtccagcc tgaattccac 240

tgcggagacc cttgctgcac gacctgccgg caccaccctt gtcccccagg ccaggggtta 300

cagtcccagg ggaaattcag ttttggcttc cagtgtatcg actgtgcctc ggggaccttc 360

tccgggggcc acgaaggcca ctgcaaacct tggacagact gcacccagtt cgggtttctc 420

actgtgttcc ctgggaacaa gacccacaac gctgtgtgcg tcccagggtc cccgccggca 480

gagccgcttg ggtggctgac cgtcgtcctc ctggccgtgg ccgcctgcgt cctcctcctg 540

acctcggccc agcttggact gcacatctgg cagctgagga gtcagtgcat gtggccccga 600

gagacccagc tgctgctgga ggtgccgccg tcgaccgaag acgccagaag ctgccagttc 660

cccgaggaag agcggggcga gcgatcggca gaggagaagg ggcggctggg agacctgtgg 720

gtg 723

<210> 148

<211> 1362

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> B7-H6 (NCR3LG1)

<400> 148

atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc gcggcgctcc tgattctgct gtgggcgctg 60

acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacacccctg 120

aatgacaatg tcaccatatt ctgcaatatc ttttattccc aacccctcaa catcacgtct 180

atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtctttgaa 240

ttttttggag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg 300

aagagtgggg acgcctcact gcggctgcct ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac 360

cgatgtgagg tggtggtcac ccctctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg 420
gcttccccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaaagagaa tgaagacaaa 480
tatatgtgtg agtcaagtgg gttctaccca gaggctatta atataacatg ggagaagcag 540
acccagaagt ttccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc 600
aagaatatgg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa 660
gaccctggga ctgtctacca gtgtgtggta cggcatgcgt ccttgcatac ccccttgagg 720
agcaacttta ccctgactgc tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa gacagataat 780
ttttccattc attggtggcc tatttcattc attggtgttg gactggtttt attaattgtt 840

ttgattcctt ggaaaaagat atgtaacaaa tcatcttcag cctatactcc tctcaagtgc 900
attctgaaac actggaactc ctttgacact cagactctga agaaagagca cctcatattc 960
ttttgcactc gggcatggcc gtcttaccag ctgcaggatg gggaggcttg gcctcctgag 1020
ggaagtgtta atattaatac tattcaacaa ctagatgttt tctgcagaca ggagggcaaa 1080
tggtccgagg ttccttatgt gcaagccttc tttgccttgc gagacaaccc agatctttgt 1140
cagtgttgta gaattgaccc tgctctccta acagttacat caggcaagtc catagatgat 1200
aattccacaa agtctgagaa acaaacccct agggaacact cggatgcagt tccggatgcc 1260
ccaatccttc ctgtctcccc tatctgggaa cctcctccag ccacaacatc aacaactcca 1320

gttctatcct cccaaccccc aactttactg ttacccctac ag 1362

<210> 149
<211> 597
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> ICOS, isoform 1
<400> 149

atgaagtcag gcctctggta tttctttctc ttctgcttgc gcattaaagt tttaacagga 60
gaaatcaatg gttctgccaa ttatgagatg tttatatttc acaacggagg tgtacaaatt 120
ttatgcaaat atcctgacat tgtccagcaa tttaaaatgc agttgctgaa agggggggcaa 180
atactctgcg atctcactaa gacaaaagga agtggaaaca cagtgtccat taagagtctg 240
aaattctgcc attctcagtt atccaacaac agtgtctctt tttttctata caacttggac 300

cattctcatg ccaactatta cttctgcaac ctatcaattt ttgatcctcc tccttttaaa 360

gtaactctta caggaggata tttgcatatt tatgaatcac aactttgttg ccagctgaag 420

ttctggttac ccataggatg tgcagccttt gttgtagtct gcattttggg atgcatactt 480

atttgttggc ttacaaaaaa gaagtattca tccagtgtgc acgaccctaa cggtgaatac 540

atgttcatga gagcagtgaa cacagccaaa aaatctagac tcacagatgt gacccta 597

<210> 150

<211> 906

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ICOS ligand, isoform 1

<400> 150

atgcggctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60

caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120

gaaggaagcc gttttgattt aaatgatgtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180

accgtggtga cctaccacat cccacagaac agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240

cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgcggg gcgacttctc cctgcgcttg 300

ttcaacgtca ccccccagga cgagcagaag tttcactgcc tggtgttgag ccaatccctg 360

ggattccagg aggttttgag cgttgaggtt acactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420

cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480

ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540

gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600

agcgtgctga ggatcgcacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660

cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720

aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780

gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840

tgcctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900

cacgtt 906

<210> 151

<211> 1344

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> gp49B/LILRB4, isoform 1

<400> 151

atgatcccca ccttcacggc tctgctctgc ctcgggctga gtctgggccc caggacccac 60

atgcaggcag ggcccctccc caaacccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc 120

tgggggaact ctgtgaccat ctggtgtcag gggaccctgg aggctcggga gtaccgtctg 180

gataaagagg aaagcccagc accctgggac agacagaacc cactggagcc caagaacaag 240

gccagattct ccatcccatc catgacagag gactatgcag ggagataccg ctgttactat 300

cgcagccctg taggctggtc acagcccagt gacccctgg agctggtgat gacaggagcc 360

tacagtaaac ccacccttc agccctgccg agtcctcttg tgacctcagg aaagagcgtg 420

accctgctgt gtcagtcacg gagcccaatg gacacttttc ttctgatcaa ggagcgggca 480

gcccatcccc tactgcatct gagatcagag cacggagctc agcagcacca ggctgaattc 540

cccatgagtc ctgtgacctc agtgcacggg gggacctaca ggtgcttcag ctcacacggc 600

ttctcccact acctgctgtc acaccccagt gacccctgg agctcatagt ctcaggatcc 660

ttggagggtc ccaggccctc acccacaagg tccgtctcaa cagctgcagg ccctgaggac 720

cagcccctca tgcctacagg gtcagtcccc cacagtggtc tgagaaggca ctgggaggta 780

ctgatcgggg tcttggtggt ctccatcctg cttctctccc tcctcctctt cctcctcctc 840

caacactggc gtcagggaaa acacaggaca ttggcccaga gacaggctga tttccaacgt 900

cctccagggg ctgccgagcc agagcccaag gacgggggcc tacagaggag gtccagccca 960

gctgctgacg tccagggaga aaacttctgt gctgccgtga agaacacaca gcctgaggac 1020

ggggtggaaa tggacactcg gcagagccca cacgatgaag acccccaggc agtgacgtat 1080

gccaaggtga aacactccag acctaggaga gaaatggcct ctcctccctc cccactgtct 1140

ggggaattcc tggacacaaa ggacagacag gcagaagagg acagacagat ggacactgag 1200

gctgctgcat ctgaagcccc ccaggatgtg acctacgccc ggctgcacag ctttaccctc 1260

agacagaagg caactgagcc tcctccatcc caggaagggg cctctccagc tgagcccagt 1320

gtctatgcca ctctggccat ccac 1344

<210> 152

<211> 1896

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PIR-B/LILRB3, isoform 1

<400> 152

atgacgcccg ccctcacagc cctgctctgc cttgggctga gtctgggccc caggacccgc 60

atgcaggcag ggcccttccc caaacccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc 120

tgggggagcc ccgtgaccat ctggtgtcag gggagcctgg aggcccagga gtaccaactg 180

gataaagagg gaagcccaga gccctgggac agaaataacc cactggaacc caagaacaag 240

gccagattct ccatcccatc catgacacag caccatgcag ggagataccg ctgccactat 300

tacagctctg caggctggtc agagcccagc gacccccctgg agctggtgat gacaggattc 360

tacaacaaac ccaccctctc agccctgccc agccctgtgg tggcctcagg ggggaatatg 420

accctccgat gtggctcaca gaagggatat caccattttg ttctgatgaa ggaaggagaa 480

caccagctcc cccggaccct ggactcacag cagctccaca gtgggggggtt ccaggccctg 540

ttccctgtgg gccccgtgac ccccagccac aggtggaggt tcacatgcta ttactattat 600

acaaacaccc cctgggtgtg gtcccacccc agtgaccccc tggagattct gccctcaggc 660

gtgtctagga agccctccct cctgaccctg cagggccctg tcctggcccc tgggcagagc 720

ctgaccctcc agtgtggctc tgatgtcggc tacgacagat ttgttctgta taaggagggg 780

gaacgtgact tcctccagcg ccctggccag cagccccagg ctgggctctc ccaggccaac 840

ttcaccctgg gccctgtgag ccgctcctac gggggccagt acaggtgcta tggtgcacac 900

aacctctcct ccgagtggtc ggcccccagt gacccccctgg acatcctgat cacaggacag 960

atctatgaca ccgtctccct gtcagcacag ccgggcccca cagtggcctc aggagagaac 1020

atgaccctgc tgtgtcagtc acgggggtat tttgacactt tccttctgac caaagaaggg 1080

gcagcccatc ccccactgcg tctgagatca atgtacggag ctcataagta ccaggctgaa 1140

ttccccatga gtcctgtgac ctcagcccac gcggggacct acaggtgcta cggctcacgc 1200

agctccaacc cccacctgct gtctttcccc agtgagcccc tggaactcat ggtctcagga 1260

cactctggag gctccagcct cccacccaca gggccgccct ccacacctgg tctgggaaga 1320

tacctggagg ttttgattgg ggtctcggtg gccttcgtcc tgctgctctt cctcctcctc 1380

ttcctcctcc tcctccgtca gcgtcacagc aaacacagga catctgacca gagaaagact 1440

gatttccagc gtcctgcagg ggctgcggag acagagccca aggacagggg cctgctgagg 1500

aggtccagcc cagctgctga cgtccaggaa gaaaacctct atgctgctgt gaaggacaca 1560

cagtctgagg acagggtgga gctggacagt cagcagagcc cacacgatga agacccccag 1620

gcagtgacgt atgccccggt gaaacactcc agtcctagga gagaaatggc ctctcctccc 1680

tcctcactgt ctggggaatt cctggacaca aaggacagac aggtggaaga ggacaggcag 1740

atggacactg aggctgctgc atctgaagcc tcccaggatg tgacctacgc ccagctgcac 1800

agcttgaccc ttagacggaa ggcaactgag cctcctccat cccaggaagg ggaacctcca 1860

gctgagccca gcatctacgc cactctggcc atccac 1896

<210> 153

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HLA-G alpha chain

<400> 153

atggtggtca tggcgccccg aaccctcttc ctgctgctct cgggggccct gaccctgacc 60

gagacctggg cgggctccca ctccatgagg tatttcagcg ccgccgtgtc ccggcccggc 120

cgcggggagc cccgcttcat cgccatgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180

gacagcgact cggcgtgtcc gaggatggag ccgcgggcgc cgtgggtgga gcaggagggg 240

ccggagtatt gggaagagga gacacggaac accaaggccc acgcacagac tgacagaatg 300

aacctgcaga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccagttctca caccctccag 360

tggatgattg gctgcgacct ggggtccgac ggacgcctcc tccgcgggta tgaacagtat 420

gcctacgatg gcaaggatta cctcgccctg aacgaggacc tgcgctcctg gaccgcagcg 480

gacactgcgg ctcagatctc caagcgcaag tgtgaggcgg ccaatgtggc tgaacaaagg 540

agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccaca gatacctgga gaacgggaag 600

gagatgctgc agcgcgcgga ccccccccaag acacacgtga cccaccaccc tgtctttgac 660

tatgaggcca ccctgaggtg ctgggccctg ggcttctacc ctgcggagat catactgacc 720

tggcagcggg atggggagga ccagacccag gacgtggagc tcgtggagac caggcctgca 780

ggggatggaa ccttccagaa gtgggcagct gtggtggtgc cttctggaga ggagcagaga 840

tacacgtgcc atgtgcagca tgaggggctg ccggagcccc tcatgctgag atggaagcag 900

tcttccctgc ccaccatccc catcatgggt atcgttgctg gcctggttgt ccttgcagct 960

gtagtcactg gagctgcggt cgctgctgtg ctgtggagaa agaagagctc agat 1014

<210> 154

<211> 1092

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TIM1/HAVCR1

<400> 154

atgcatcctc aagtggtcat cttaagcctc atcctacatc tggcagattc tgtagctggt 60

tctgtaaagg ttggtggaga ggcaggtcca tctgtcacac taccctgcca ctacagtgga 120

gctgtcacat ccatgtgctg gaatagaggc tcatgttctc tattcacatg ccaaaatggc 180

attgtctgga ccaatggaac ccacgtcacc tatcggaagg acacacgcta taagctattg 240

ggggaccttt caagaaggga tgtctctttg accatagaaa atacagctgt gtctgacagt 300

ggcgtatatt gttgccgtgt tgagcaccgt gggtggttca atgacatgaa aatcaccgta 360

tcattggaga ttgtgccacc caaggtcacg actactccaa ttgtcacaac tgttccaacc 420

gtcacgactg ttcgaacgag caccactgtt ccaacgacaa cgactgttcc aatgacgact 480

gttccaacga caactgttcc aacaacaatg agcattccaa cgacaacgac tgttctgacg 540

acaatgactg tttcaacgac aacgagcgtt ccaacgacaa cgagcattcc aacaacaaca 600

agtgttccag tgacaacaac tgtctctacc tttgttcctc caatgccttt gcccaggcag 660

aaccatgaac cagtagccac ttcaccatct tcacctcagc cagcagaaac ccaccctacg 720

acactgcagg gagcaataag gagagaaccc accagctcac cattgtactc ttacacaaca 780

gatgggaatg acaccgtgac agagtcttca gatggccttt ggaataacaa tcaaactcaa 840

ctgttcctag aacatagtct actgacggcc aataccacta aaggaatcta tgctggagtc 900

tgtatttctg tcttggtgct tcttgctctt ttgggtgtca tcattgccaa aaagtatttc 960

ttcaaaaagg aggttcaaca actaagtgtt tcatttagca gccttcaaat taaagctttg 1020

caaaatgcag ttgaaaagga agtccaagca gaagacaata tctacattga gaatagtctt 1080

tatgccacgg ac 1092

<210> 155

<211> 1134

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TIM4/TIMD4, isoform 1

<400> 155

atgtccaaag aacctctcat tctctggctg atgattgagt tttggtggct ttacctgaca 60

ccagtcactt cagagactgt tgtgacggag gttttgggtc accgggtgac tttgccctgt 120

ctgtactcat cctggtctca caacagcaac agcatgtgct gggggaaaga ccagtgcccc 180

tactccggtt gcaaggaggc gctcatccgc actgatggaa tgagggtgac ctcaagaaag 240

tcagcaaaat atagacttca ggggactatc ccgagaggtg atgtctcctt gaccatctta 300

aaccccagtg aaagtgacag cggtgtgtac tgctgccgca tagaagtgcc tggctggttc 360

aacgatgtaa agataaacgt gcgcctgaat ctacagagag cctcaacaac cacgcacaga 420

acagcaacca ccaccacacg cagaacaaca acaacaagcc ccaccaccac ccgacaaatg 480

acaacaaccc cagctgcact tccaacaaca gtcgtgacca cacccgatct cacaaccgga 540

acaccactcc agatgacaac cattgccgtc ttcacaacag caaacacgtg cctttcacta 600

accccaagca cccttccgga ggaagccaca ggtcttctga ctcccgagcc ttctaaggaa 660

gggcccatcc tcactgcaga atcagaaact gtcctcccca gtgattcctg gagtagtgtt 720

gagtctactt ctgctgacac tgtcctgctg acatccaaag agtccaaagt ttgggatctc 780

ccatcaacat cccacgtgtc aatgtggaaa acgagtgatt ctgtgtcttc tcctcagcct 840

ggagcatctg atacagcagt tcctgagcag aacaaaacaa caaaaacagg acagatggat 900

ggaataccca tgtcaatgaa gaatgaaatg cccatctccc aactactgat gatcatcgcc 960

ccctccttgg gatttgtgct cttcgcattg tttgtggcgt ttctcctgag agggaaactc 1020

atggaaacct attgttcgca gaaacacaca aggctagact acattggaga tagtaaaaat 1080

gtcctcaatg acgtgcagca tggaagggaa gacgaagacg gccttttac cctc 1134

<210> 156

<211> 831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> OX-40/CD134/TNFRSF4

<400> 156

atgtgcgtgg gggctcggcg gctgggccgc gggccgtgtg cggctctgct cctcctgggc 60

ctggggctga gcaccgtgac ggggctccac tgtgtcgggg acacctaccc cagcaacgac 120

cggtgctgcc acgagtgcag gccaggcaac gggatggtga gccgctgcag ccgctcccag 180

aacacggtgt gccgtccgtg cgggccgggc ttctacaacg acgtggtcag ctccaagccg 240

tgcaagccct gcacgtggtg taacctcaga agtgggagtg agcggaagca gctgtgcacg 300

gccacacagg acacagtctg ccgctgccgg gcgggcaccc agcccctgga cagctacaag 360

cctggagttg actgtgcccc ctgccctcca gggcacttct ccccaggcga caaccaggcc 420

tgcaagccct ggaccaactg caccttggct gggaagcaca ccctgcagcc ggccagcaat 480

agctcggacg caatctgtga ggacagggac cccccagcca cgcagcccca ggagacccag 540

ggcccccccgg ccaggcccat cactgtccag cccactgaag cctggcccag aacctcacag 600

ggaccctcca cccggcccgt ggaggtcccc gggggccgtg cggttgccgc catcctgggc 660

ctgggcctgg tgctggggct gctgggcccc ctggccatcc tgctggccct gtacctgctc 720

cggagggacc agaggctgcc ccccgatgcc cacaagcccc ctgggggagg cagtttccgg 780

accccccatcc aagaggagca ggccgacgcc cactccaccc tggccaagat c 831

<210> 157

<211> 549

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> OX-40L/CD252/TNFSF4, isoform 1

<400> 157

atggaaaggg tccaaccccct ggaagagaat gtgggaaatg cagccaggcc aagattcgag 60

aggaacaagc tattgctggt ggcctctgta attcagggac tggggctgct cctgtgcttc 120

acctacatct gcctgcactt ctctgctctt caggtatcac atcggtatcc tcgaattcaa 180

agtatcaaag tacaatttac cgaatataag aaggagaaag gtttcatcct cacttcccaa 240

aaggaggatg aaatcatgaa ggtgcagaac aactcagtca tcatcaactg tgatgggttt 300

tatctcatct ccctgaaggg ctacttctcc caggaagtca acattagcct tcattaccag 360

aaggatgagg agcccctctt ccaactgaag aaggtcaggt ctgtcaactc cttgatggtg 420

gcctctctga cttacaaaga caaagtctac ttgaatgtga ccactgacaa tacctccctg 480

gatgacttcc atgtgaatgg cggagaactg attcttatcc atcaaaatcc tggtgaattc 540

tgtgtcctt 549

<210> 158

<211> 1950

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ILT-2/LILRB1, isoform 1

<400> 158

atgaccccca tcctcacggt cctgatctgt ctcgggctga gtctgggccc ccggacccac 60

gtgcaggcag ggcacctccc caagcccacc ctctgggctg aaccaggctc tgtgatcacc 120

caggggagtc ctgtgaccct caggtgtcag gggggccagg agacccagga gtaccgtcta 180

tatagagaaa agaaaacagc accctggatt acacggatcc cacaggagct tgtgaagaag 240

ggccagttcc ccatcccatc catcacctgg gaacacacag ggcggtatcg ctgttactat 300

ggtagcgaca ctgcaggccg ctcagagagc agtgaccccc tggagctggt ggtgacagga 360

gcctacatca aacccaccct ctcagcccag cccagccccg tggtgaactc aggagggaat 420

gtaaccctcc agtgtgactc acaggtggca tttgatggct tcattctgtg taaggaagga 480

gaagatgaac acccacaatg cctgaactcc cagccccatg cccgtgggtc gtcccgcgcc 540

atcttctccg tgggccccgt gagcccgagt cgcaggtggt ggtacaggtg ctatgcttat 600

gactcgaact ctccctatga gtggtctcta cccagtgatc tcctggagct cctggtccta 660

ggtgtttcta agaagccatc actctcagtg cagccaggtc ctatcgtggc ccctgaggag 720

accctgactc tgcagtgtgg ctctgatgct ggctacaaca gatttgttct gtataaggac 780

ggggaacgtg acttccttca gctcgctggc gcacagcccc aggctgggct ctcccaggcc 840

aacttcaccc tgggccctgt gagccgctcc tacgggggcc agtacagatg ctacggtgca 900

cacaacctct cctccgagtg gtcggccccc agcgaccccc tggacatcct gatcgcagga 960

cagttctatg acagagtctc cctctcggtg cagccgggcc ccacggtggc ctcaggagag 1020

aacgtgaccc tgctgtgtca gtcacaggga tggatgcaaa ctttccttct gaccaaggag 1080

ggggcagctg atgacccatg gcgtctaaga tcaacgtacc aatctcaaaa ataccaggct 1140

gaattcccca tgggtcctgt gacctcagcc catgcgggga cctacaggtg ctacggctca 1200

cagagctcca aaccctacct gctgactcac cccagtgacc ccctggagct cgtggtctca 1260

ggaccgtctg ggggccccag ctccccgaca acaggcccca cctccacatc tggccctgag 1320

gaccagcccc tcacccccac cgggtcggat ccccagagtg gtctgggaag gcacctgggg 1380

gttgtgatcg gcatcttggt ggccgtcatc ctactgctcc tcctcctcct cctcctcttc 1440

ctcatcctcc gacatcgacg tcagggcaaa cactggacat cgacccagag aaaggctgat 1500

ttccaacatc ctgcaggggc tgtggggcca gagcccacag acagaggcct gcagtggagg 1560

tccagcccag ctgccgatgc ccaggaagaa aacctctatg ctgccgtgaa gcacacacag 1620

cctgaggatg gggtggagat ggacactcgg agcccacacg atgaagaccc ccaggcagtg 1680

acgtatgccg aggtgaaaca ctccagacct aggagagaaa tggcctctcc tccttcccca 1740

ctgtctgggg aattcctgga cacaaaggac agacaggcgg aagaggacag gcagatggac 1800

actgaggctg ctgcatctga agccccccag gatgtgacct acgcccagct gcacagcttg 1860

accctcagac gggaggcaac tgagcctcct ccatcccagg aagggccctc tccagctgtg 1920

cccagcatct acgccactct ggccatccac 1950

<210> 159

<211> 1794

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ILT-4/LILRB2, isoform 1

<400> 159

atgaccccca tcgtcacagt cctgatctgt ctcgggctga gtctgggccc caggacccgc 60

gtgcagacag ggaccatccc caagcccacc ctgtgggctg agccagactc tgtgatcacc 120

caggggagtc ccgtcaccct cagttgtcag gggagccttg aagcccagga gtaccgtcta 180

tatagggaga aaaaatcagc atcttggatt acacggatac gaccagagct tgtgaagaac 240

ggccagttcc acatcccatc catcacctgg gaacacacag ggcgatatgg ctgtcagtat 300

tacagccgcg ctcggtggtc tgagctcagt gacccccctgg tgctggtgat gacaggagcc 360

tacccaaaac ccaccctctc agcccagccc agccctgtgg tgacctcagg aggaagggtg 420

accctccagt gtgagtcaca ggtggcattt ggcggcttca ttctgtgtaa ggaaggagaa 480

gatgaacacc cacaatgcct gaactcccag ccccatgccc gtgggtcgtc ccgcgccatc 540

ttctccgtgg gccccgtgag cccgaatcgc aggtggtcgc acaggtgcta tggttatgac 600

ttgaactctc cctatgtgtg gtcttcaccc agtgatctcc tggagctcct ggtcccaggt 660

gtttctaaga agccatcact ctcagtgcag ccgggtcctg tcatggcccc tggggaaagc 720

ctgaccctcc agtgtgtctc tgatgtcggc tatgacagat ttgttctgta caaggagggg 780

gaacgtgacc ttcgccagct ccctggccgg cagccccagg ctgggctctc ccaggccaac 840

ttcaccctgg gccctgtgag ccgctcctac gggggccagt acagatgcta cggtgcacac 900

aacctctcct ctgagtgctc ggcccccagc gacccccctgg acatcctgat cacaggacag 960

atccgtggca cacccttcat ctcagtgcag ccaggcccca cagtggcctc aggagagaac 1020

gtgaccctgc tgtgtcagtc atggcggcag ttccacactt tccttctgac caaggcggga 1080

gcagctgatg ccccactccg tctaagatca atacacgaat atcctaagta ccaggctgaa 1140

ttccccatga gtcctgtgac ctcagcccac gcggggacct acaggtgcta cggctcactc 1200

aactccgacc cctacctgct gtctcacccc agtgagcccc tggagctcgt ggtctcagga 1260

ccctccatgg gttccagccc cccacccacc ggtcccatct ccacacctgc aggccctgag 1320

gaccagcccc tcacccccac tgggtcggat ccccaaagtg gtctgggaag gcacctgggg 1380

gttgtgatcg gcatcttggt ggccgtcgtc ctactgctcc tcctcctcct cctcctcttc 1440

ctcatcctcc gacatcgacg tcagggcaaa cactggacat cgacccagag aaaggctgat 1500

ttccaacatc ctgcaggggc tgtggggcca gagcccacag acagaggcct gcagtggagg 1560

tccagcccag ctgccgacgc ccaggaagaa aacctctatg ctgccgtgaa ggacacacag 1620

cctgaagatg gggtggagat ggacactcgg gctgctgcat ctgaagcccc ccaggatgtg 1680

acctacgccc agctgcacag cttgaccctc agacggaagg caactgagcc tcctccatcc 1740

caggaaaggg aacctccagc tgagcccagc atctacgcca ccctggccat ccac 1794

<210> 160

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BCL-2 isoform alpha

<400> 160

atggcgcacg ctgggagaac agggtacgat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60

tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgcgggag atgtgggcgc cgcgcccccg 120

ggggccgccc ccgcaccggg catcttctcc tcccagcccg ggcacacgcc ccatccagcc 180

gcatcccggg acccggtcgc caggacctcg ccgctgcaga ccccggctgc ccccggcgcc 240

gccgcggggc ctgcgctcag cccggtgcca cctgtggtcc acctgaccct ccgccaggcc 300

ggcgacgact tctcccgccg ctaccgccgc gacttcgccg agatgtccag ccagctgcac 360

ctgacgccct tcaccgcgcg gggacgcttt gccacggtgg tggaggagct cttcagggac 420

ggggtgaact gggggaggat tgtggccttc tttgagttcg gtggggtcat gtgtgtggag 480

agcgtcaacc gggagatgtc gcccctggtg gacaacatcg ccctgtggat gactgagtac 540

ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataacggag gctgggatgc ctttgtggaa 600

ctgtacggcc ccagcatgcg gcctctgttt gatttctcct ggctgtctct gaagactctg 660

ctcagtttgg ccctggtggg agcttgcatc accctgggtg cctatctggg ccacaag 717

<210> 161

<211> 4050

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MDR1/ABCB1, isoform 1

<400> 161

atgagtgtca acttgcaagg ggaccagaga ggtgcaacgg aagccagaac attcctcctg 60

gaaattcaac ctgtttcgca gtttctcgag gaatcagcat tcagtcaatc cgggccggga 120

gcagtcatct gtggtctttc cactaaagtc ggagtatctt cttccaaaat ttcacgtctt 180

ggtggccgtt ccaaggagcg cgaggtcgga atggatcttg aaggggaccg caatggagga 240

gcaaagaaga agaacttttt taaactgaac aataaaagtg aaaaagataa gaaggaaaag 300

aaaccaactg tcagtgtatt ttcaatgttt cgctattcaa attggcttga caagttgtat 360

atggtggtgg gaactttggc tgccatcatc catggggctg gacttcctct catgatgctg 420

gtgtttggag aaatgacaga tatctttgca aatgcaggaa atttagaaga tctgatgtca 480

aacatcacta atagaagtga tatcaatgat acagggttct tcatgaatct ggaggaagac 540

atgaccaggt atgcctatta ttacagtgga attggtgctg gggtgctggt tgctgcttac 600

attcaggttt cattttggtg cctggcagct ggaagacaaa tacacaaaat tagaaaacag 660

ttttttcatg ctataatgcg acaggagata ggctggtttg atgtgcacga tgttggggag 720

cttaacaccc gacttacaga tgatgtctcc aagattaatg aaggaattgg tgacaaaatt 780

ggaatgttct ttcagtcaat ggcaacattt ttcactgggt ttatagtagg atttacacgt 840

ggttggaagc taacccttgt gattttggcc atcagtcctg ttcttggact gtcagctgct 900

gtctgggcaa agatactatc ttcatttact gataaagaac tcttagcgta tgcaaaagct 960

ggagcagtag ctgaagaggt cttggcagca attagaactg tgattgcatt tggaggacaa 1020

aagaaagaac ttgaaaggta caacaaaaat ttagaagaag ctaaaagaat tgggataaag 1080

aaagctatta cagccaatat ttctataggt gctgctttcc tgctgatcta tgcatcttat 1140

gctctggcct tctggtatgg gaccaccttg gtcctctcag gggaatattc tattggacaa 1200

gtactcactg tattcttttc tgtattaatt ggggctttta gtgttggaca ggcatctcca 1260

agcattgaag catttgcaaa tgcaagagga gcagcttatg aaatcttcaa gataattgat 1320

aataagccaa gtattgacag ctattcgaag agtgggcaca aaccagataa tattaaggga 1380

aatttggaat tcagaaatgt tcacttcagt tacccatctc gaaaagaagt taagatcttg 1440

aagggtctga acctgaaggt gcagagtggg cagacggtgg ccctggttgg aaacagtggc 1500

tgtgggaaga gcacaacagt ccagctgatg cagaggctct atgaccccac agaggggatg 1560

gtcagtgttg atggacagga tattaggacc ataaatgtaa ggtttctacg ggaaatcatt 1620

ggtgtggtga gtcaggaacc tgtattgttt gccaccacga tagctgaaaa cattcgctat 1680

ggccgtgaaa atgtcaccat ggatgagatt gagaaagctg tcaaggaagc caatgcctat 1740

gactttatca tgaaactgcc tcataaattt gacaccctgg ttggagagag aggggcccag 1800

ttgagtggtg ggcagaagca gaggatcgcc attgcacgtg ccctggttcg caaccccaag 1860

atcctcctgc tggatgaggc cacgtcagcc ttggacacag aaagcgaagc agtggttcag 1920

gtggctctgg ataaggccag aaaaggtcgg accaccattg tgatagctca tcgtttgtct 1980

acagttcgta atgctgacgt catcgctggt ttcgatgatg gagtcattgt ggagaaagga 2040

aatcatgatg aactcatgaa agagaaaggc atttacttca aacttgtcac aatgcagaca 2100

gcaggaaatg aagttgaatt agaaaatgca gctgatgaat ccaaaagtga aattgatgcc 2160

ttggaaatgt cttcaaatga ttcaagatcc agtctaataa gaaaaagatc aactcgtagg 2220

agtgtccgtg gatcacaagc ccaagacaga aagcttagta ccaaagaggc tctggatgaa 2280

agtatacctc cagtttcctt ttggaggatt atgaagctaa atttaactga atggccttat 2340

tttgttgttg gtgtattttg tgccattata aatggaggcc tgcaaccagc atttgcaata 2400

atattttcaa agattatagg ggtttttaca agaattgatg atcctgaaac aaaacgacag 2460

aatagtaact tgttttcact attgtttcta gcccttggaa ttatttcttt tattacattt 2520

ttccttcagg gtttcacatt tggcaaagct ggagagatcc tcaccaagcg gctccgatac 2580

atggttttcc gatccatgct cagacaggat gtgagttggt ttgatgaccc taaaaacacc 2640

actggagcat tgactaccag gctcgccaat gatgctgctc aagttaaagg ggctataggt 2700

tccaggcttg ctgtaattac ccagaatata gcaaatcttg ggacaggaat aattatatcc 2760

ttcatctatg gttggcaact aacactgtta ctcttagcaa ttgtacccat cattgcaata 2820

gcaggagttg ttgaaatgaa aatgttgtct ggacaagcac tgaaagataa gaaagaacta 2880

gaaggttctg ggaagatcgc tactgaagca atagaaaact tccgaaccgt tgtttctttg 2940

actcaggagc agaagtttga acatatgtat gctcagagtt tgcaggtacc atacagaaac 3000

tctttgagga aagcacacat ctttggaatt acattttcct tcacccaggc aatgatgtat 3060

ttttcctatg ctggatgttt ccggtttgga gcctacttgg tggcacataa actcatgagc 3120

tttgaggatg ttctgttagt attttcagct gttgtctttg gtgccatggc cgtggggcaa 3180

gtcagttcat ttgctcctga ctatgccaaa gccaaaatat cagcagccca catcatcatg 3240

atcattgaaa aaaccccttt gattgacagc tacagcacgg aaggcctaat gccgaacaca 3300

ttggaaggaa atgtcacatt tggtgaagtt gtattcaact atcccacccg accggacatc 3360

ccagtgcttc agggactgag cctggaggtg aagaagggcc agacgctggc tctggtgggc 3420

agcagtggct gtgggaagag cacagtggtc cagctcctgg agcggttcta cgacccctg 3480

gcagggaaag tgctgcttga tggcaaagaa ataaagcgac tgaatgttca gtggctccga 3540

gcacacctgg gcatcgtgtc ccaggagccc atcctgtttg actgcagcat tgctgagaac 3600

attgcctatg gagacaacag ccgggtggtg tcacaggaag agattgtgag ggcagcaaag 3660

gaggccaaca tacatgcctt catcgagtca ctgcctaata aatatagcac taaagtagga 3720

gacaaaggaa ctcagctctc tggtggccag aaacaacgca ttgccatagc tcgtgccctt 3780

gttagacagc ctcatatttt gcttttggat gaagccacgt cagctctgga tacagaaagt 3840

gaaaaggttg tccaagaagc cctggacaaa gccagagaag gccgcacctg cattgtgatt 3900

gctcaccgcc tgtccaccat ccagaatgca gacttaatag tggtgtttca gaatggcaga 3960

gtcaaggagc atggcacgca tcagcagctg ctggcacaga aaggcatcta tttttcaatg 4020

gtcagtgtcc aggctggaac aaagcgccag 4050

<210> 162

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Arginase1, isoform 1

<400> 162

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaaa gggacagcca 60

cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt 120

aaagaacaag taactcaaaa ctttttaatt ttagagtgtg atgtgaagga ttatggggac 180

ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa tccaaggtct 240

gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aaggtggcag aagtcaagaa gaacggaaga 300

atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc tggccatgcc 360

agggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat caacactcca 420

ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttcctcct gaaggaacta 480

aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctccctgtat atctgccaag 540

gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gaccctgggg aacactacat tttgaaaact 600

ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg caaggtgatg 660

gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct aagttttgat 720

gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtcgt gggaggtctg 780

acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct actctcagga 840

ttagatataa tggaagtgaa cccatccctg gggaagacac cagaagaagt aactcgaaca 900

gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga gggtaatcac 960

aagcctattg actaccttaa cccacctaag 990

<210> 163

<211> 3459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> nitric oxide synthase, inducible (iNOS/NOS2),
isoform 1

<400> 163

atggcctgtc cttggaaatt tctgttcaag accaaattcc accagtatgc aatgaatggg 60

gaaaaagaca tcaacaacaa tgtggagaaa gccccctgtg ccacctccag tccagtgaca 120

caggatgacc ttcagtatca caacctcagc aagcagcaga atgagtcccc gcagcccctc 180

gtggagacgg gaaagaagtc tccagaatct ctggtcaagc tggatgcaac cccattgtcc 240

tccccacggc atgtgaggat caaaaactgg ggcagcggga tgactttcca agacacactt 300

caccataagg ccaaagggat tttaacttgc aggtccaaat cttgcctggg gtccattatg 360

actcccaaaa gtttgaccag aggacccagg gacaagccta cccctccaga tgagcttcta 420

cctcaagcta tcgaatttgt caaccaatat tacggctcct tcaaagaggc aaaaatagag 480

gaacatctgg ccagggtgga agcggtaaca aaggagatag aaacaacagg aacctaccaa 540

ctgacgggag atgagctcat cttcgccacc aagcaggcct ggcgcaatgc cccacgctgc 600

attgggagga tccagtggtc caacctgcag gtcttcgatg cccgcagctg ttccactgcc 660

cgggaaatgt ttgaacacat ctgcagacac gtgcgttact ccaccaacaa tggcaacatc 720

aggtcggcca tcaccgtgtt cccccagcgg agtgatggca agcacgactt ccgggtgtgg 780

aatgctcagc tcatccgcta tgctggctac cagatgccag atggcagcat cagaggggac 840

cctgccaacg tggaattcac tcagctgtgc atcgacctgg gctggaagcc caagtacggc 900

cgcttcgatg tggtcccccc ggtcctgcag gccaatggcc gtgaccctga gctcttcgaa 960

atcccacctg accttgtgct tgaggtggcc atggaacatc ccaaatacga gtggtttcgg 1020

gaactggagc taaagtggta cgccctgcct gcagtggcca acatgctgct tgaggtgggc 1080

ggcctggagt tcccagggtg ccccttcaat ggctggtaca tgggcacaga gatcggagtc 1140

cgggacttct gtgacgtcca gcgctacaac atcctggagg aagtgggcag gagaatgggc 1200

ctggaaacgc acaagctggc ctcgctctgg aaagaccagg ctgtcgttga gatcaacatt 1260

gctgtgctcc atagtttcca gaagcagaat gtgaccatca tggaccacca ctcggctgca 1320

gaatccttca tgaagtacat gcagaatgaa taccggtccc gtgggggctg cccggcagac 1380

tggatttggc tggtccctcc catgtctggg agcatcaccc ccgtgtttca ccaggagatg 1440

ctgaactacg tcctgtcccc tttctactac tatcaggtag aggcctggaa aacccatgtc 1500

tggcaggacg agaagcggag acccaagaga agagagattc cattgaaagt cttggtcaaa 1560

gctgtgctct ttgcctgtat gctgatgcgc aagacaatgg cgtcccgagt cagagtcacc 1620

atcctctttg cgacagagac aggaaaatca gaggcgctgg cctgggacct gggggcctta 1680

ttcagctgtg ccttcaaccc caaggttgtc tgcatggata agtacaggct gagctgcctg 1740

gaggaggaac ggctgctgtt ggtggtgacc agtacgtttg gcaatggaga ctgccctggc 1800

aatggagaga aactgaagaa atcgctcttc atgctgaaag agctcaacaa caaattcagg 1860

tacgctgtgt ttggcctcgg ctccagcatg taccctcggt tctgcgcctt tgctcatgac 1920

attgatcaga agctgtccca cctgggggcc tctcagctca ccccgatggg agaaggggat 1980

gagctcagtg ggcaggagga cgccttccgc agctgggccg tgcaaacctt caaggcagcc 2040

tgtgagacgt ttgatgtccg aggcaaacag cacattcaga tccccaagct ctacacctcc 2100

aatgtgacct gggacccgca ccactacagg ctcgtgcagg actcacagcc tttggacctc 2160

agcaaagccc tcagcagcat gcatgccaag aacgtgttca ccatgaggct caaatctcgg 2220

cagaatctac aaagtccgac atccagccgt gccaccatcc tggtggaact ctcctgtgag 2280

gatggccaag gcctgaacta cctgccgggg gagcaccttg gggtttgccc aggcaaccag 2340

ccggccctgg tccaaggtat cctggagcga gtggtggatg gccccacacc ccaccagaca 2400

gtgcgcctgg aggccctgga tgagagtggc agctactggg tcagtgacaa gaggctgccc 2460

ccctgctcac tcagccaggc cctcacctac ttcctggaca tcaccacacc cccaacccag 2520

ctgctgctcc aaaagctggc ccaggtggcc acagaagagc ctgagagaca gaggctggag 2580

gccctgtgcc agccctcaga gtacagcaag tggaagttca ccaacagccc cacattcctg 2640

gaggtgctag aggagttccc gtccctgcgg gtgtctgctg gcttcctgct ttcccagctc 2700

cccattctga agcccaggtt ctactccatc agctcctccc gggatcacac gcccacagag 2760

atccacctga ctgtggccgt ggtcacctac cacacccgag atggccaggg tcccctgcac 2820

cacggcgtct gcagcacatg gctcaacagc ctgaagcccc aagacccagt gccctgcttt 2880

gtgcggaatg ccagcggctt ccacctcccc gaggatccct cccatccttg catcctcatc 2940

gggcctggca caggcatcgc gcccttccgc agtttctggc agcaacggct ccatgactcc 3000

cagcacaagg gagtgcgggg aggccgcatg accttggtgt ttgggtgccg ccgcccagat 3060

gaggaccaca tctaccagga ggagatgctg gagatggccc agaaggcggt gctgcatgcg 3120

gtgcacacag cctattcccg cctgcctggc aagcccaagg tctatgttca ggacatcctg 3180

cggcagcagc tggccagcga ggtgctccgt gtgctccaca aggagccagg ccacctctat 3240

gtttgcgggg atgtgcgcat ggcccgggac gtggcccaca ccctgaagca gctggtggct 3300

gccaagctga aattgaatga ggagcaggtc gaggactatt tctttcagct caagagccag 3360

aagcgctatc acgaagatat ctttggtgct gtatttcctt acgaggcgaa gaaggacagg 3420

gtggcggtgc agcccagcag cctggagatg tcagcgctc 3459

<210> 164

<211> 3765

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Her2

<400> 164

atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60

gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120

acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180

gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240

cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300

attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360

gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420

cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480

ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540

ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600

ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660

gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720

gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780

agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840

tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900

tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgcccccc gcacaaccaa 960

gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020

gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080

atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140

tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200

gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260

gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380

ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440

ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500

gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560

tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680

ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740

gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800

cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860

ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920

ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980

attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040

aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100

acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160

aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220

cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280

cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340

tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400

atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460

gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520

ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580

attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640

gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700

caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760

aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820

ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880

attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940

agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000

gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060

gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120

ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180

ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240

gctggctccg atgtatttga tggtgacctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300

ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtacagtg aggaccccac agtacccctg 3360

ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccc ctgacctgca gcccccagcc tgaatatgtg 3420

aaccagccag atgttcggcc ccagcccccc tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480

cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct ccccagggaa gaatggggtc 3540

gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600

ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660

tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720

cctacggcag agaacccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtg 3765

<210> 165

<211> 567

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> KRAS

<400> 165

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtggcg taggcaagag tgccttgacg 60

atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120

aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180

caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240

gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300

aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360

ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420

tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag agagtggagg atgcttttta tacattggtg 480

agggagatcc gacaatacag attgaaaaaa atcagcaaag aagaaaagac tcctggctgt 540

gtgaaaatta aaaaatgcat tataatg 567

<210> 166

<211> 1809

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PLK1

<400> 166

atgagtgctg cagtgactgc agggaagctg gcacgggcac cggccgaccc tgggaaagcc 60

ggggtccccg gagttgcagc tcccggagct ccggcggcgg ctccaccggc gaaagagatc 120

ccggaggtcc tagtggaccc acgcagccgg cggcgctatg tgcggggccg ctttttgggc 180

aagggcggct ttgccaagtg cttcgagatc tcggacgcgg acaccaagga ggtgttcgcg 240

ggcaagattg tgcctaagtc tctgctgctc aagccgcacc agagggagaa gatgtccatg 300

gaaatatcca ttcaccgcag cctcgcccac cagcacgtcg taggattcca cggcttttc 360

gaggacaacg acttcgtgtt cgtggtgttg gagctctgcc gccggaggtc tctcctggag 420

ctgcacaaga ggaggaaagc cctgactgag cctgaggccc gatactacct acggcaaatt 480

gtgcttggct gccagtacct gcaccgaaac cgagttattc atcgagacct caagctgggc 540

aacctttcc tgaatgaaga tctggaggtg aaaatagggg attttggact ggcaaccaaa 600

gtcgaatatg acggggagag gaagaagacc ctgtgtggga ctcctaatta catagctccc 660

gaggtgctga gcaagaaagg gcacagtttc gaggtggatg tgtggtccat tgggtgtatc 720

atgtatacct tgttagtggg caaaccacct tttgagactt cttgcctaaa agagacctac 780

ctccggatca agaagaatga atacagtatt cccaagcaca tcaaccccgt ggccgcctcc 840

ctcatccaga agatgcttca gacagatccc actgcccgcc caaccattaa cgagctgctt 900

aatgacgagt tctttacttc tggctatatc cctgcccgtc tccccatcac ctgcctgacc 960

attccaccaa ggttttcgat tgctcccagc agcctggacc ccagcaaccg gaagcccctc 1020

acagtcctca ataaaggctt ggagaacccc ctgcctgagc gtccccggga aaaagaagaa 1080

ccagtggttc gagagacagg tgaggtggtc gactgccacc tcagtgacat gctgcagcag 1140

ctgcacagtg tcaatgcctc caagccctcg gagcgtgggc tggtcaggca agaggaggct 1200

gaggatcctg cctgcatccc catcttctgg gtcagcaagt gggtggacta ttcggacaag 1260

tacggccttg ggtatcagct ctgtgataac agcgtggggg tgctcttcaa tgactcaaca 1320

cgcctcatcc tctacaatga tggtgacagc ctgcagtaca tagagcgtga cggcactgag 1380

tcctacctca ccgtgagttc ccatcccaac tccttgatga agaagatcac cctccttaaa 1440

tatttccgca attacatgag cgagcacttg ctgaaggcag gtgccaacat cacgccgcgc 1500

gaaggtgatg agctcgcccg gctgccctac ctacggacct ggttccgcac ccgcagcgcc 1560

atcatcctgc acctcagcaa cggcagcgtg cagatcaact tcttccagga tcacaccaag 1620

ctcatcttgt gcccactgat ggcagccgtg acctacatcg acgagaagcg ggacttccgc 1680

acataccgcc tgagtctcct ggaggagtac ggctgctgca aggagctggc cagccggctc 1740

cgctacgccc gcactatggt ggacaagctg ctgagctcac gctcggccag caaccgtctc 1800

aaggcctcc 1809

<210> 167

<211> 876

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> dapA, strain LT2

<400> 167

atgttcacgg gaagtattgt cgcgcttgtt acgccgatgg atgagaaagg taacgtcagt 60

aggtcttgcc tgaaaaaact cattgattat catgtcgcca acggtacctc ggcgattgtt 120

tcggttggca ctaccggcga gtctgccacg ctaagccatg atgaacatgg cgatgtcgtg 180

atgatgacgc tggaactggc tgacggacgt attccggtta tcgccggcac gggcgcaaac 240

gcgaccgcgg aagcgattag cctgacgcag cgttttaacg atagcggtat tgtaggctgc 300

ctgacggtaa cgccgtacta caatcgcccc acgcaggaag gtttgttcca gcatttcaaa 360

gccatcgcgg aacacactga cttgccgcaa attctgtata atgtgccgtc ccgtaccggt 420

tgcgatatgt tgccggaaac cgtgggtcgt ctggcggaaa taaaaaatat tatcgctatc 480

aaagaggcga cagggaactt aacccgcgtt caccagatca aagagctggt ttcagacgat 540

tttattctgc ttagcggcga tgacgcgtct gcgctggact ttatgcaact gggtggtcat 600

ggcgtgattt ccgttacggc taacgtagcg gcgcgcgaga tggctgacat gtgcaaactg 660

gcggcggaag ggcaatttgc cgaggcgcgc gctatcaacc agcgtctgat gccgttacac 720

aacaaactat ttgtcgaacc caatcctatc ccggtgaaat gggcatgtaa ggcattgggt 780

cttgtggcga ccgacacgct gcgcctgcca atgacgccta tcacggacca tggtcgtgac 840

atcgtcaaag cagcgcttca gcatgctggc ctgctg 876

<210> 168

<211> 819

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> dapB, strain LT2

<400> 168

atgcatgaag cacaaatccg cgtcgccatt gccggcgccg gtggccgcat gggacggcag 60

ttaatccagg ccgccatggc gatggaaggt gttcagctgg gtgccgcgct ggagcgcgaa 120

ggctcttcct tgctgggcag cgatgctggc gaactggcag gggcgggaaa gtccggcgtg 180

atcgttcaaa gcagccttga ggcggtaaaa gatgattttg acgttttcat cgattttacc 240

cgtccggaag gcacgttgac gcatctggcg ttttgccgcc agcatggtaa agggatggtg 300

attggtacta ccggctttga cgacgccggt aaacaagcca ttcgcgaggc gtcacaagag 360

attgcgatcg ttttcgccgc aaactttagc gtcggcgtta acgtcatgct caagctgctg 420

gagaaagccg cgaaggtaat gggcgactat agcgatattg aaattattga agcgcaccac 480

cgccataaag tggatgcacc gtcgggtacg gcgctggcaa tgggcgaggc aatcgccggg 540

gcgctggata aaaatctgaa ggactgcgcg gtctactcgc gtgaaggtta taccggcgag 600

cgcgtagcgg gcacgattgg ctttgcgacc gttcgggcgg gcgacatcgt cggcgaacat 660

accgcgatgt ttgccgatat tggcgagcgc gtagagatta cgcataaagc ttccagccgc 720

atgacgtttg caaatggcgc gttgcgatcg gcgttatggc taaaaacgaa gaaaaatggg 780

ctatttgaca tgcgggatgt gctggggctg gatgtatta 819

<210> 169

<211> 876

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> dapA

<400> 169

atgttcacgg gaagtattgt cgcgattgtt actccgatgg atgaaaaagg taatgtctgt 60

cgggctagct tgaaaaaact gattgattat catgtcgcca gcggtacttc ggcgatcgtt 120

tctgttggca ccactggcga gtccgctacc ttaaatcatg acgaacatgc tgatgtggtg 180

atgatgacgc tggatctggc tgatgggcgc attccggtaa ttgccgggac cggcgctaac 240

gctactgcgg aagccattag cctgacgcag cgcttcaatg acagtggtat cgtcggctgc 300

ctgacggtaa ccccttacta caatcgtccg tcgcaagaag gtttgtatca gcatttcaaa 360

gccatcgctg agcatactga cctgccgcaa attctgtata atgtgccgtc ccgtactggc 420

tgcgatctgc tcccggaaac ggtgggccgt ctggcgaaag taaaaaatat tatcggaatc 480

aaagaggcaa cagggaactt aacgcgtgta aaccagatca aagagctggt ttcagatgat 540

tttgttctgc tgagcggcga tgatgcgagc gcgctggact tcatgcaatt gggcggtcat 600

ggggttattt ccgttacgac taacgtcgca gcgcgtgata tggcccagat gtgcaaactg 660

gcagcagaag aacattttgc cgaggcacgc gttattaatc agcgtctgat gccattacac 720

aacaaactat ttgtcgaacc caatccaatc ccggtgaaat gggcatgtaa ggaactgggt 780

cttgtggcga ccgatacgct gcgcctgcca atgacaccaa tcaccgacag tggtcgtgag 840

acggtcagag cggcgcttaa gcatgccggt ttgctg 876

<210> 170

<211> 819

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> dapB

<400> 170

atgcatgatg caaacatccg cgttgccatc gcgggagccg gggggcgtat gggccgccag 60

ttgattcagg cggcgctggc attagagggc gtgcagttgg gcgctgcgct ggagcgtgaa 120

ggatcttctt tactgggcag cgacgccggt gagctggccg gagccgggaa aacaggcgtt 180

accgtgcaaa gcagcctcga tgcggtaaaa gatgattttg atgtgtttat cgattttacc 240

cgtccggaag gtacgctgaa ccatctcgct ttttgtcgcc agcatggcaa agggatggtg 300

atcggcacta cggggtttga cgaagccggt aaacaagcaa ttcgtgacgc cgctgccgat 360

attgcgattg tctttgcggc caattttagc gttggcgtta acgtcatgct taagctgctg 420

gagaaagcag ccaaagtgat gggtgactac accgatatcg aaattattga agcacatcat 480

agacataaag ttgatgcgcc gtcaggcacc gcactggcaa tgggagaggc gatcgcccac 540

gcccttgata aagatctgaa agattgcgcg gtctacagtc gtgaaggcca caccggtgaa 600

cgtgtgcctg gcaccattgg ttttgccacc gtgcgtgcag gtgacatcgt tggtgaacat 660

accgcgatgt ttgccgatat tggcgagcgt ctggagatca cccataaggc gtccagccgt 720

atgacatttg ctaacggcgc ggtaagatcg gctttgtggt tgagtggtaa ggaaagcggt 780

ctttttgata tgcgagatgt acttgatctc aataatttg 819

<210> 171

<211> 1218

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> dapC

<400> 171

atggcaattg aacaaacagc aattacacgc gcgactttcg atgaagtgat cctgccgatt 60

tatgctccgg cagagtttat tccggtaaaa ggtcagggca gccgaatctg ggatcagcaa 120

ggcaaggagt atgtcgattt cgcgggtggc attgcagtta cggcgttggg ccattgccat 180

cctgcgctgg tgaacgcgtt aaaaacccag ggcgaaactc tgtggcatat cagtaacgtt 240

ttcaccaatg aaccggcgct gcgtcttggg cgtaaactga ttgaggcaac gtttgccgaa 300

cgcgtggtgt ttatgaactc cggcacggaa gctaacgaaa ccgcctttaa actggcacgc 360

cattacgcct gtgtgcgtca tagcccgttc aaaaccaaaa ttattgcctt ccataacgct 420

tttcatggtc gctcgctgtt taccgtttcg gtgggtgggc agccaaaata ttccgacggc 480

tttgggccga aaccggcaga catcatccac gttcccttta acgatctcca tgcagtgaaa 540

gcggtgatgg atgatcacac ctgtgcggtg gtggttgagc cgatccaggg cgagggcggt 600

gtgacggcag cgacgccaga gtttttgcag ggcttgcgcg agctgtgcga tcaacatcag 660

gcattattgg tgtttgatga agtgcagtgc gggatggggc ggaccggcga tttgtttgct 720

tacatgcact acgcgttagc gccggatatt ctgacctctg cgaaagcgtt aggcggcggc 780

ttcccgatta gcgccatgct gaccacggcg gaaattgctt ctgcgtttca tcctggttct 840

cacggttcca cctacggcgg taatcctctg gcctgtgcag tagcgggggc ggcgtttgat 900

atcatcaata cccctgaagt gctggaaggc attcaggcga aacgccagcg ttttgttgac 960

catctgcaga agatcgatca gcagtacgat gtatttagcg atattcgcgg tatggggctg 1020

ttgattggcg cagagctgaa accacagtac aaaggtcggg cgcgtgattt cctgtatgcg 1080

ggcgcagagg ctggcgtaat ggtgctgaat gccggaccgg atgtgatgcg ttttgcaccg 1140

tcgctggtgg tggaagatgc ggatatcgat gaagggatgc aacgtttcgc ccacgcggtg 1200

gcgaaggtgg ttggggcg 1218

<210> 172

<211> 822

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> dapD

<400> 172

atgcagcagt tacagaacat tattgaaacc gcttttgaac gccgtgccga gatcacgcca 60

gccaatgcag acaccgttac ccgcgaagcg gataatcagg tgatcgccct gctggattcc 120

ggcgcactgc gtgtagcgga aaaaattgac ggtcagtggg tgacgcatca gtggttgaaa 180

aaagcggtgc tgctctcttt ccgtattaat gataatcagg tgatcgaagg ggcagaaagc 240

cgctacttcg acaaagtgcc gatgaaattc gccgactacg acgaagcacg tttccagaaa 300

gaaggcttcc gcgttgtgcc accagcggcg gtacgtcagg gtgcgtttat tgcccgtaac 360

accgtgctga tgccgtctta cgtcaacatc ggcgcatatg ttgatgaagg caccatggtt 420

gatacctggg cgaccgtcgg ttcttgtgcg cagattggta aaaacgttca cctttccggt 480

ggcgtgcgca tcggcggcgt gctggaaccg ctgcaggcta acccaaccat gattgaagat 540

aattgcttca tcggcgcgcg ctctgaactg gttgaagggg tgattgtcga agaaggttcc 600

gtcatttcca tgggcgtata cattggtcag agcacccgta tttacgaccg tgaaaccggc 660

gaaatccact acggtcgcgt tccggcgggg tctgtggttg tttcaggtaa tctgccgtca 720

aaagatggca aatacagcct ctactgtgcg gttatcgtta agaaagttga cgcgaaaact 780

cgcggcaaag tcggcattaa cgaactgctg cgtaccatcg ac 822

<210> 173

<211> 1125

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> dapE

<400> 173

atgtcgtgcc cggttattga gctgacacaa cagcttattc gccgcccttc cctgagtcct 60

gatgatgcag gatgccaggc tttgttgatt gaacgtttgc aggcgatcgg ttttaccgtt 120

gaacgcatgg actttgccga tacgcagaat ttttgggcat ggcgtgggca gggtgaaacg 180

ttagcctttg ccgggcatac cgacgtggtg ccgcctggcg acgccgatcg ttggatcaat 240

cccccgtttg aacccaccat tcgtgacggc atgttattcg ggcgcggtgc ggcagatatg 300

aaaggctcgc tggcggcgat ggtggtggcg gcagaacgtt ttgtcgcaca acatcccaac 360

catacggggc gactggcatt tctgatcacc tctgatgaag aagccagtgc ccacaacggt 420

acggtaaaag tcgtcgaagc gttaatggca cgtaatgagc gtctcgatta ctgcctggtt 480

ggcgaaccgt cgagtatcga agtggtaggt gatgtggtga aaaatggtcg tcgcggatca 540

ttaacctgca accttaccat tcatggcgtt caggggcatg ttgcctaccc acatctggct 600

gacaatccgg tacatcgcgc agcacctttc cttaatgaat tagtggctat tgagtgggat 660

cagggcaatg aattcttccc ggcgaccagt atgcagattg ccaatattca ggcgggaacg 720

ggcagtaaca acgttattcc gggtgaactg tttgtgcagt ttaacttccg cttcagcacc 780

gaactgactg atgagatgat caaagcgcag gtgcttgccc tgcttgaaaa acatcaactg 840

cgctatacgg tggattggtg gctttccggg cagccatttt tgaccgcgcg cggtaaactg 900

gtggatgcgg tcgttaacgc ggttgagcac tataatgaaa ttaaaccgca gctactgacc 960

acaggcggaa cgtccgacgg gcgctttatt gcccgcatgg gggcgcaggt ggtggaactc 1020

gggccggtca atgccactat tcataaaatt aatgaatgtg tgaacgctgc cgacctgcag 1080

ctacttgccc gtatgtatca acgtatcatg gaacagctcg tcgcc 1125

<210> 174

<211> 1179

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> p53

<400> 174

atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60

gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120

gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcactgaaga cccaggtcca 180

gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgcgtgg cccctgcacc agcagctcct 240

acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt cccttcccag 300

aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360

tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420

tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgcccg gcacccgcgt ccgcgccatg 480

gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccaccatgag 540

cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600

ttgcgtgtgg agtatttgga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 660

gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720

tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780

agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcatg tttgtgcctg tcctgggaga 840

gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900

ccagggagca ctaagcgagc actgtccaac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960

aaaccactgg atggagaata tttcaccctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020

ttccgagagc tgaatgaggc cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080

gggagcaggg ctcactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat 1140

aaaaaactca tgttcaagac agaagggcct gactcagac 1179

<210> 175

<211> 1470

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ERBA

<400> 175

atggaacaga agccaagcaa ggtggagtgt gggtcagacc cagaggagaa cagtgccagg 60

tcaccagatg gaaagcgaaa aagaaagaac ggccaatgtt ccctgaaaac cagcatgtca 120

gggtatatcc ctagttacct ggacaaagac gagcagtgtg tcgtgtgtgg ggacaaggca 180

actggttatc actaccgctg tatcacttgt gagggctgca agggcttctt tcgccgcaca 240

atccagaaga acctccatcc cacctattcc tgcaaatatg acagctgctg tgtcattgac 300

aagatcaccc gcaatcagtg ccagctgtgc cgcttcaaga agtgcatcgc cgtgggcatg 360

gccatggact tggttctaga tgactcgaag cgggtggcca agcgtaagct gattgagcag 420

aaccgggagc ggcggcggaa ggaggagatg atccgatcac tgcagcagcg accagagccc 480

actcctgaag agtgggatct gatccacatt gccacagagg cccatcgcag caccaatgcc 540

cagggcagcc attggaaaca gaggcggaaa ttcctgcccg atgacattgg ccagtcaccc 600

attgtctcca tgccggacgg agacaaggtg gacctggaag ccttcagcga gtttaccaag 660

atcatcaccc cggccatcac ccgtgtggtg gactttgcca aaaaactgcc catgttctcc 720

gagctgcctt gcgaagacca gatcatcctc ctgaaggggt gctgcatgga gatcatgtcc 780

ctgcgggcgg ctgtccgcta cgaccctgag agcgacaccc tgacgctgag tggggagatg 840

gctgtcaagc gggagcagct caagaatggc ggcctgggcg tagtctccga cgccatcttt 900

gaactgggca agtcactctc tgcctttaac ctggatgaca cggaagtggc tctgctgcag 960

gctgtgctgc taatgtcaac agaccgctcg ggcctgctgt gtgtggacaa gatcgagaag 1020

agtcaggagg cgtacctgct ggcgttcgag cactacgtca accaccgcaa acacaacatt 1080

ccgcacttct ggcccaagct gctgatgaag gagagagaag tgcagagttc gattctgtac 1140

aaggggggcag cggcagaagg ccggccgggc gggtcactgg gcgtccaccc ggaaggacag 1200

cagcttctcg gaatgcatgt tgttcagggt ccgcaggtcc ggcagcttga gcagcagctt 1260

ggtgaagcgg gaagtctcca agggccggtt cttcagcacc agagcccgaa gagcccgcag 1320

cagcgtctcc tggagctgct ccaccgaagc ggaattctcc atgcccgagc ggtctgtggg 1380

gaagacgaca gcagtgaggc ggactccccg agctcctctg aggaggaacc ggaggtctgc 1440

gaggacctgg caggcaatgc agcctctccc 1470

<210> 176

<211> 1317

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> myc

<400> 176

atgcccctca acgttagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag 60

ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg 120

cagcccccgg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc caccccgccc 180

ctgtccccta gccgccgctc cgggctctgc tcgccctcct acgttgcggt cacacccttc 240

tcccttcggg gagacaacga cggcggtggc gggagcttct ccacggccga ccagctggag 300

atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg cgacccggac 360

gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc 420

gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc 480

agcccgaacc ccgcccgcgg ccacagcgtc tgctccacct ccagcttgta cctgcaggat 540

ctgagcgccg ccgcctcaga gtgcatcgac ccctcggtgg tcttccccta ccctctcaac 600

gacagcagct cgcccaagtc ctgcgcctcg caagactcca gcgccttctc tccgtcctcg 660

gattctctgc tctcctcgac ggagtcctcc ccgcagggca gccccgagcc cctggtgctc 720

catgaggaga caccgcccac caccagcagc gactctgagg aggaacaaga agatgaggaa 780

gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg caggctcctg gcaaaaggtc agagtctgga 840

tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct cctcacagcc cactggtcct caagaggtgc 900

cacgtctcca cacatcagca caactacgca gcgcctccct ccactcggaa ggactatcct 960

gctgccaaga gggtcaagtt ggacagtgtc agagtcctga gacagatcag caacaaccga 1020

aaatgcacca gccccaggtc ctcggacacc gaggagaatg tcaagaggcg aacacacaac 1080

gtcttggagc gccagaggag gaacgagcta aaacggagct tttttgccct gcgtgaccag 1140

atcccggagt tggaaaacaa tgaaaaggcc cccaaggtag ttatccttaa aaaagccaca 1200

gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag caaaagctca tttctgaaga ggacttgttg 1260

cggaaacgac gagaacagtt gaaacacaaa cttgaacagc tacggaactc ttgtgcg 1317

<210> 177

<211> 2283

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MYB

<400> 177

atggcccgaa gaccccggca cagcatatat agcagtgacg aggatgatga ggactttgag 60

atgtgtgacc atgactatga tgggctgctt cccaagtctg gaaagcgtca cttggggaaa 120

acaaggtgga cccgggaaga ggatgaaaaa ctgaagaagc tggtggaaca gaatggaaca 180

gatgactgga aagttattgc caattatctc ccgaatcgaa cagatgtgca gtgccagcac 240

cgatggcaga aagtactaaa ccctgagctc atcaagggtc cttggaccaa agaagaagat 300

cagagagtga tagagcttgt acagaaatac ggtccgaaac gttggtctgt tattgccaag 360

cacttaaagg ggagaattgg aaaacaatgt agggagaggt ggcataacca cttgaatcca 420

gaagttaaga aaacctcctg gacagaagag gaagacagaa ttatttacca ggcacacaag 480

agactgggga acagatgggc agaaatcgca aagctactgc ctggacgaac tgataatgct 540

atcaagaacc actggaattc tacaatgcgt cggaaggtcg aacaggaagg ttatctgcag 600

gagtcttcaa aagccagcca gccagcagtg gccacaagct tccagaagaa cagtcatttg 660

atgggttttg ctcaggctcc gcctacagct caactccctg ccactggcca gcccactgtt 720

aacaacgact attcctatta ccacatttct gaagcacaaa atgtctccag tcatgttcca 780

taccctgtag cgttacatgt aaatatagtc aatgtccctc agccagctgc cgcagccatt 840

cagagacact ataatgatga agaccctgag aaggaaaagc gaataaagga attagaattg 900

ctcctaatgt caaccgagaa tgagctaaaa ggacagcagg tgctaccaac acagaaccac 960

acatgcagct accccgggtg gcacagcacc accattgccg accacaccag acctcatgga 1020

gacagtgcac ctgtttcctg tttgggagaa caccactcca ctccatctct gccagcggat 1080

cctggctccc tacctgaaga aagcgcctcg ccagcaaggt gcatgatcgt ccaccagggc 1140

accattctgg ataatgttaa gaacctctta gaatttgcag aaacactcca atttatagat 1200

tctgattctt catcatggtg tgatctcagc agttttgaat tctttgaaga agcagatttt 1260

tcacctagcc aacatcacac aggcaaagcc ctacagcttc agcaaagaga gggcaatggg 1320

actaaacctg caggagaacc tagcccaagg gtgaacaaac gtatgttgag tgagagttca 1380

cttgacccac ccaaggtctt acctcctgca aggcacagca caattccact ggtcatcctt 1440

cgaaaaaaac ggggccaggc cagcccctta gccactggag actgtagctc cttcatattt 1500

gctgacgtca gcagttcaac tcccaagcgt tcccctgtca aaagcctacc cttctctccc 1560

tcgcagttct taaacacttc cagtaaccat gaaaactcag acttggaaat gccttcttta 1620

acttccaccc ccctcattgg tcacaaattg actgttacaa caccatttca tagagaccag 1680

actgtgaaaa ctcaaaagga aaatactgtt tttagaaccc cagctatcaa aaggtcaatc 1740

ttagaaagct ctccaagaac tcctacacca ttcaaacatg cacttgcagc tcaagaaatt 1800

aaatacggtc ccctgaagat gctacctcag acaccctctc atctagtaga agatctgcag 1860

gatgtgatca aacaggaatc tgatgaatct ggaattgttg ctgagtttca agaaaatgga 1920

ccacccttac tgaagaaaat caaacaagag gtggaatctc caactgataa atcaggaaac 1980

ttcttctgct cacaccactg ggaaggggac agtctgaata cccaactgtt cacgcagacc 2040

tcgcctgtgg cagatgcacc gaatattctt acaagctccg ttttaatggc accagcatca 2100

gaagatgaag acaatgttct caaagcattt acagtaccta aaaacaggtc cctggcgagc 2160

ccccttgcagc cttgtagcag tacctgggaa cctgcatcct gtggaaagat ggaggagcag 2220

atgacatctt ccagtcaagc tcgtaaatac gtgaatgcat tctcagcccg gacgctggtc 2280

atg 2283

<210> 178

<211> 993

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> JUN

<400> 178

atgactgcaa agatggaaac gaccttctat gacgatgccc tcaacgcctc gttcctcccg 60

tccgagagcg gaccttatgg ctacagtaac cccaagatcc tgaaacagag catgaccctg 120

aacctggccg acccagtggg gagcctgaag ccgcacctcc gcgccaagaa ctcggacctc 180

ctcacctcgc ccgacgtggg gctgctcaag ctggcgtcgc ccgagctgga gcgcctgata 240

atccagtcca gcaacgggca catcaccacc acgccgaccc ccacccagtt cctgtgcccc 300

aagaacgtga cagatgagca ggagggcttc gccgagggct tcgtgcgcgc cctggccgaa 360

ctgcacagcc agaacacgct gcccagcgtc acgtcggcgg cgcagccggt caacggggca 420

ggcatggtgg ctcccgcggt agcctcggtg gcaggggggca gcggcagcgg cggcttcagc 480

gccagcctgc acagcgagcc gccggtctac gcaaacctca gcaacttcaa cccaggcgcg 540

ctgagcagcg gcggcggggc gccctcctac ggcgcggccg gcctggcctt tcccgcgcaa 600

ccccagcagc agcagcagcc gccgcaccac ctgccccagc agatgcccgt gcagcacccg 660

cggctgcagg ccctgaagga ggagcctcag acagtgcccg agatgcccgg cgagacaccg 720

cccctgtccc ccatcgacat ggagtcccag gagcggatca aggcggagag gaagcgcatg 780

aggaaccgca tcgctgcctc caagtgccga aaaaggaagc tggagagaat cgcccggctg 840

gaggaaaaag tgaaaacctt gaaagctcag aactcggagc tggcgtccac ggccaacatg 900

ctcagggaac aggtggcaca gcttaaacag aaagtcatga accacgttaa cagtgggtgc 960

caactcatgc taacgcagca gttgcaaaca ttt 993

<210> 179

<211> 3633

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ERBB

<

400> 179

atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctcctggcgc tgctggctgc gctctgcccg 60

gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120

ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180

gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240

accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtgga gcgaattcct 300

ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360

gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccat gagaaattta 420

caggaaatcc tgcatggcgc cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480

agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540

cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600

ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgccca gcagtgctcc 660

gggcgctgcc gtggcaagtc ccccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720

acaggccccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780

aaggacacct gccccccact catgctctac aaccccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840

cccgagggca aatacagctt tggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900

gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960

gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020

ggtattggtg aatttaaaga ctcactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080

aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140

ttcacacata ctcctcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200

atcacagggt ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260

gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcagtc 1320

gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380

gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440

tttgggacct ccggtcagaa aaccaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500

gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tcccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560

agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcaac 1620

cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccaccca 1680

gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740

cagtgtgccc actacattga cggcccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800

ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860

catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtcc aacgaatggg 1920

cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tcctcttgct gctggtggtg 1980

gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg 2040

aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100

caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160

ggtgcgttcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaaatt 2220

cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280

gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcatc 2340

tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400

tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460

atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgcga cctggcagcc 2520

aggaacgtac tggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580

ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640

atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700

ggggtgactg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760

agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820

atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccaaag 2880

ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccgag acccccagcg ctaccttgtc 2940

attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000

ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060

cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120

accagcaaca attccaccgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180

aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240

agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300

cccgctggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaaccc cgcgcccagc 3360

agagacccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac 3420

actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480

ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540

gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600

gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

<210> 180

<211> 5589

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BRCA1

<400> 180

atggatttat ctgctcttcg cgttgaagaa gtacaaaatg tcattaatgc tatgcagaaa 60

atcttagagt gtcccatctg tctggagttg atcaaggaac ctgtctccac aaagtgtgac 120

cacatatttt gcaaattttg catgctgaaa cttctcaacc agaagaaagg gccttcacag 180

tgtccttttat gtaagaatga tataaccaaa aggagcctac aagaaagtac gagatttagt 240

caacttgttg aagagctatt gaaaatcatt tgtgcttttc agcttgacac aggtttggag 300

tatgcaaaca gctataattt tgcaaaaaag gaaaataact ctcctgaaca tctaaaagat 360

gaagtttcta tcatccaaag tatgggctac agaaaccgtg ccaaaagact tctacagagt 420

gaacccgaaa atccttcctt gcaggaaacc agtctcagtg tccaactctc taaccttgga 480

actgtgagaa ctctgaggac aaagcagcgg atacaacctc aaaagacgtc tgtctacatt 540

gaattgggat ctgattcttc tgaagatacc gttaataagg caacttattg cagtgtggga 600

gatcaagaat tgttacaaat caccctcaa ggaaccaggg atgaaatcag tttggattct 660

gcaaaaaagg ctgcttgtga attttctgag acggatgtaa caaatactga acatcatcaa 720

cccagtaata atgatttgaa caccactgag aagcgtgcag ctgagaggca tccagaaaag 780

tatcagggta gttctgtttc aaacttgcat gtggagccat gtggcacaaa tactcatgcc 840

agctcattac agcatgagaa cagcagttta ttactcacta aagacagaat gaatgtagaa 900

aaggctgaat tctgtaataa aagcaaacag cctggcttag caaggagcca acataacaga 960

tgggctggaa gtaaggaaac atgtaatgat aggcggactc ccagcacaga aaaaaaggta 1020

gatctgaatg ctgatcccct gtgtgagaga aaagaatgga ataagcagaa actgccatgc 1080

tcagagaatc ctagagatac tgaagatgtt ccttggataa cactaaatag cagcattcag 1140

aaagttaatg agtggttttc cagaagtgat gaactgttag gttctgatga ctcacatgat 1200

ggggagtctg aatcaaatgc caaagtagct gatgtattgg acgttctaaa tgaggtagat 1260

gaatattctg gttcttcaga gaaaatagac ttactggcca gtgatcctca tgaggcttta 1320

atatgtaaaa gtgaaagagt tcactccaaa tcagtagaga gtaatattga agacaaaata 1380

tttgggaaaa cctatcggaa gaaggcaagc ctccccaact taagccatgt aactgaaaat 1440

ctaattatag gagcatttgt tactgagcca cagataatac aagagcgtcc cctcacaaat 1500

aaattaaagc gtaaaaggag acctacatca ggccttcatc ctgaggattt tatcaagaaa 1560

gcagatttgg cagttcaaaa gactcctgaa atgataaatc agggaactaa ccaaacggag 1620

cagaatggtc aagtgatgaa tattactaat agtggtcatg agaataaaac aaaaggtgat 1680

tctattcaga atgagaaaaa tcctaaccca atagaatcac tcgaaaaaga atctgctttc 1740

aaaacgaaag ctgaacctat aagcagcagt ataagcaata tggaactcga attaaatatc 1800

cacaattcaa aagcacctaa aaagaatagg ctgaggagga agtcttctac caggcatatt 1860

catgcgcttg aactagtagt cagtagaaat ctaagcccac ctaattgtac tgaattgcaa 1920

attgatagtt gttctagcag tgaagagata aagaaaaaaa agtacaacca aatgccagtc 1980

aggcacagca gaaacctaca actcatggaa ggtaaagaac ctgcaactgg agccaagaag 2040

agtaacaagc caaatgaaca gacaagtaaa agacatgaca gcgatacttt cccagagctg 2100

aagttaacaa atgcacctgg ttcttttact aagtgttcaa ataccagtga acttaaagaa 2160

tttgtcaatc ctagccttcc aagagaagaa aaagaagaga aactagaaac agttaaagtg 2220

tctaataatg ctgaagaccc caaagatctc atgttaagtg gagaaagggt tttgcaaact 2280

gaaagatctg tagagagtag cagtatttca ttggtacctg gtactgatta tggcactcag 2340

gaaagtatct cgttactgga agttagcact ctagggaagg caaaaacaga accaaataaa 2400

tgtgtgagtc agtgtgcagc atttgaaaac cccaagggac taattcatgg ttgttccaaa 2460

gataatagaa atgacacaga aggctttaag tatccattgg gacatgaagt taaccacagt 2520

cgggaaacaa gcatagaaat ggaagaaagt gaacttgatg ctcagtattt gcagaataca 2580

ttcaaggttt caaagcgcca gtcatttgct ccgttttcaa atccaggaaa tgcagaagag 2640

gaatgtgcaa cattctctgc ccactctggg tccttaaaga aacaaagtcc aaaagtcact 2700

tttgaatgtg aacaaaagga agaaaatcaa ggaaagaatg agtctaatat caagcctgta 2760

cagacagtta atatcactgc aggctttcct gtggttggtc agaaagataa gccagttgat 2820

aatgccaaat gtagtatcaa aggaggctct aggttttgtc tatcatctca gttcagaggc 2880

aacgaaactg gactcattac tccaaataaa catggacttt tacaaaaccc atatcgtata 2940

ccaccacttt ttcccatcaa gtcatttgtt aaaactaaat gtaagaaaaa tctgctagag 3000

gaaaactttg aggaacattc aatgtcacct gaaagagaaa tgggaaatga gaacattcca 3060

agtacagtga gcacaattag ccgtaataac attagagaaa atgtttttaa agaagccagc 3120

tcaagcaata ttaatgaagt aggttccagt actaatgaag tgggctccag tattaatgaa 3180

ataggttcca gtgatgaaaa cattcaagca gaactaggta gaaacagagg gccaaaattg 3240

aatgctatgc ttagattagg ggttttgcaa cctgaggtct ataaacaaag tcttcctgga 3300

agtaattgta agcatcctga aataaaaaag caagaatatg aagaagtagt tcagactgtt 3360

aatacagatt tctctccata tctgatttca gataacttag aacagcctat gggaagtagt 3420

catgcatctc aggtttgttc tgagacacct gatgacctgt tagatgatgg tgaaataaag 3480

gaagatacta gttttgctga aaatgacatt aaggaaagtt ctgctgtttt tagcaaaagc 3540

gtccagaaag gagagcttag caggagtcct agccctttca cccatacaca tttggctcag 3600

ggttaccgaa gaggggccaa gaaattagag tcctcagaag agaacttatc tagtgaggat 3660

gaagagcttc cctgcttcca acacttgtta tttggtaaag taaacaatat accttctcag 3720

tctactaggc atagcaccgt tgctaccgag tgtctgtcta agaacacaga ggagaattta 3780

ttatcattga agaatagctt aaatgactgc agtaaccagg taatattggc aaaggcatct 3840

caggaacatc accttagtga ggaaacaaaa tgttctgcta gcttgttttc ttcacagtgc 3900

agtgaattgg aagacttgac tgcaaataca aacacccagg atcctttctt gattggttct 3960

tccaaacaaa tgaggcatca gtctgaaagc cagggagttg gtctgagtga caaggaattg 4020

gtttcagatg atgaagaaag aggaacgggc ttggaagaaa ataatcaaga agagcaaagc 4080

atggattcaa acttaggtga agcagcatct gggtgtgaga gtgaaacaag cgtctctgaa 4140

gactgctcag ggctatcctc tcagagtgac attttaacca ctcagcagag ggataccatg 4200

caacataacc tgataaagct ccagcaggaa atggctgaac tagaagctgt gttagaacag 4260

catgggagcc agccttctaa cagctaccct tccatcataa gtgactcttc tgcccttgag 4320

gacctgcgaa atccagaaca aagcacatca gaaaaagcag tattaacttc acagaaaagt 4380

agtgaatacc ctataagcca gaatccagaa ggcctttctg ctgacaagtt tgaggtgtct 4440

gcagatagtt ctaccagtaa aaataaagaa ccaggagtgg aaaggtcatc cccttctaaa 4500

tgcccatcat tagatgatag gtggtacatg cacagttgct ctgggagtct tcagaataga 4560

aactacccat ctcaagagga gctcattaag gttgttgatg tggaggagca acagctggaa 4620

gagtctgggc cacacgattt gacggaaaca tcttacttgc caaggcaaga tctagaggga 4680

acccccttacc tggaatctgg aatcagcctc ttctctgatg accctgaatc tgatccttct 4740

gaagacagag ccccagagtc agctcgtgtt ggcaacatac catcttcaac ctctgcattg 4800

aaagttcccc aattgaaagt tgcagaatct gcccagagtc cagctgctgc tcatactact 4860

gatactgctg ggtataatgc aatggaagaa agtgtgagca gggagaagcc agaattgaca 4920

gcttcaacag aaagggtcaa caaaagaatg tccatggtgg tgtctggcct gaccccagaa 4980

gaatttatgc tcgtgtacaa gtttgccaga aaacaccaca tcactttaac taatctaatt 5040

actgaagaga ctactcatgt tgttatgaaa acagatgctg agtttgtgtg tgaacggaca 5100

ctgaaatatt ttctaggaat tgcgggagga aaatgggtag ttagctattt ctgggtgacc 5160

cagtctatta aagaaagaaa aatgctgaat gagcatgatt ttgaagtcag aggagatgtg 5220

gtcaatggaa gaaaccacca aggtccaaag cgagcaagag aatcccagga cagaaagatc 5280

ttcaggggggc tagaaatctg ttgctatggg cccttcacca acatgcccac agatcaactg 5340

gaatggatgg tacagctgtg tggtgcttct gtggtgaagg agctttcatc attcaccctt 5400

ggcacaggtg tccacccaat tgtggttgtg cagccagatg cctggacaga ggacaatggc 5460

ttccatgcaa ttgggcagat gtgtgaggca cctgtggtga cccgagagtg ggtgttggac 5520

agtgtagcac tctaccagtg ccaggagctg gacacctacc tgatacccca gatcccccac 5580

agccactac 5589

<210

> 181

<211> 10254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BRCA2

<400> 181

atgcctattg gatccaaaga gaggccaaca ttttttgaaa tttttaagac acgctgcaac 60

aaagcagatt taggaccaat aagtcttaat tggtttgaag aactttcttc agaagctcca 120

ccctataatt ctgaacctgc agaagaatct gaacataaaa acaacaatta cgaaccaaac 180

ctatttaaaa ctccacaaag gaaaccatct tataatcagc tggcttcaac tccaataata 240

ttcaaagagc aagggctgac tctgccgctg taccaatctc ctgtaaaaga attagataaa 300

ttcaaattag acttaggaag gaatgttccc aatagtagac ataaaagtct tcgcacagtg 360

aaaactaaaa tggatcaagc agatgatgtt tcctgtccac ttctaaattc ttgtcttagt 420

gaaagtcctg ttgttctaca atgtacacat gtaacaccac aaagagataa gtcagtggta 480

tgtgggagtt tgtttcatac accaaagttt gtgaagggtc gtcagacacc aaaacatatt 540

tctgaaagtc taggagctga ggtggatcct gatatgtctt ggtcaagttc tttagctaca 600

ccacccaccc ttagttctac tgtgctcata gtcagaaatg aagaagcatc tgaaactgta 660

tttcctcatg atactactgc taatgtgaaa agctattttt ccaatcatga tgaaagtctg 720

aagaaaaatg atagatttat cgcttctgtg acagacagtg aaaacacaaa tcaaagagaa 780

gctgcaagtc atggatttgg aaaaacatca gggaattcat ttaaagtaaa tagctgcaaa 840

gaccacattg gaaagtcaat gccaaatgtc ctagaagatg aagtatatga aacagttgta 900

gatacctctg aagaagatag tttttcatta tgtttttcta aatgtagaac aaaaaatcta 960

caaaaagtaa gaactagcaa gactaggaaa aaaattttcc atgaagcaaa cgctgatgaa 1020

tgtgaaaaat ctaaaaacca agtgaaagaa aaatactcat ttgtatctga agtggaacca 1080

aatgatactg atccattaga ttcaaatgta gcaaatcaga agccctttga gagtggaagt 1140

gacaaaatct ccaaggaagt tgtaccgtct ttggcctgtg aatggtctca actaaccctt 1200

tcaggtctaa atggagccca gatggagaaa ataccctat tgcatatttc ttcatgtgac 1260

caaaatattt cagaaaaaga cctattagac acagagaaca aaagaaagaa agattttctt 1320

acttcagaga attctttgcc acgtatttct agcctaccaa aatcagagaa gccattaaat 1380

gaggaaacag tggtaaataa gagagatgaa gagcagcatc ttgaatctca tacagactgc 1440

attcttgcag taaagcaggc aatatctgga acttctccag tggcttcttc atttcagggt 1500

atcaaaaagt ctatattcag aataagagaa tcacctaaag agactttcaa tgcaagtttt 1560

tcaggtcata tgactgatcc aaactttaaa aaagaaactg aagcctctga aagtggactg 1620

gaaatacata ctgtttgctc acagaaggag gactccttat gtccaaattt aattgataat 1680

ggaagctggc cagccaccac cacacagaat tctgtagctt tgaagaatgc aggtttaata 1740

tccactttga aaaagaaaac aaataagttt atttatgcta tacatgatga aacatcttat 1800

aaaggaaaaa aaataccgaa agaccaaaaa tcagaactaa ttaactgttc agcccagttt 1860

gaagcaaatg cttttgaagc accacttaca tttgcaaatg ctgattcagg tttattgcat 1920

tcttctgtga aaagaagctg ttcacagaat gattctgaag aaccaacttt gtccttaact 1980

agctcttttg ggacaattct gaggaaatgt tctagaaatg aaacatgttc taataataca 2040

gtaatctctc aggatcttga ttataaagaa gcaaaatgta ataaggaaaa actacagtta 2100

tttattaccc cagaagctga ttctctgtca tgcctgcagg aaggacagtg tgaaaatgat 2160

ccaaaaagca aaaaagtttc agatataaaa gaagaggtct tggctgcagc atgtcaccca 2220

gtacaacatt caaaagtgga atacagtgat actgactttc aatcccagaa aagtctttta 2280

tatgatcatg aaaatgccag cactcttatt ttaactccta cttccaagga tgttctgtca 2340

aacctagtca tgatttctag aggcaaagaa tcatacaaaa tgtcagacaa gctcaaaggt 2400

aacaattatg aatctgatgt tgaattaacc aaaaatattc ccatggaaaa gaatcaagat 2460

gtatgtgctt taaatgaaaa ttataaaaac gttgagctgt tgccacctga aaaatacatg 2520

agagtagcat caccttcaag aaaggtacaa ttcaaccaaa acacaaatct aagagtaatc 2580

caaaaaaatc aagaagaaac tacttcaatt tcaaaaataa ctgtcaatcc agactctgaa 2640

gaacttttct cagacaatga gaataatttt gtcttccaag tagctaatga aaggaataat 2700

cttgctttag gaaatactaa ggaacttcat gaaacagact tgacttgtgt aaacgaaccc 2760

attttcaaga actctaccat ggttttatat ggagacacag gtgataaaca agcaacccaa 2820

gtgtcaatta aaaaagattt ggtttatgtt cttgcagagg agaacaaaaa tagtgtaaag 2880

cagcatataa aaatgactct aggtcaagat ttaaaatcgg acatctcctt gaatatagat 2940

aaaataccag aaaaaaataa tgattacatg aacaaatggg caggactctt aggtccaatt 3000

tcaaatcaca gttttggagg tagcttcaga acagcttcaa ataaggaaat caagctctct 3060

gaacataaca ttaagaagag caaaatgttc ttcaaagata ttgaagaaca atatcctact 3120

agtttagctt gtgttgaaat tgtaaatacc ttggcattag ataatcaaaa gaaactgagc 3180

aagcctcagt caattaatac tgtatctgca catttacaga gtagtgtagt tgtttctgat 3240

tgtaaaaata gtcatataac ccctcagatg ttattttcca agcaggattt taattcaaac 3300

cataatttaa cacctagcca aaaggcagaa attacagaac tttctactat attagaagaa 3360

tcaggaagtc agtttgaatt tactcagttt agaaaaccaa gctacatatt gcagaagagt 3420

acatttgaag tgcctgaaaa ccagatgact atcttaaaga ccacttctga ggaatgcaga 3480

gatgctgatc ttcatgtcat aatgaatgcc ccatcgattg gtcaggtaga cagcagcaag 3540

caatttgaag gtacagttga aattaaacgg aagtttgctg gcctgttgaa aaatgactgt 3600

aacaaaagtg cttctggtta tttaacagat gaaaatgaag tggggtttag gggcttttat 3660

tctgctcatg gcacaaaact gaatgtttct actgaagctc tgcaaaaagc tgtgaaactg 3720

tttagtgata ttgagaatat tagtgaggaa acttctgcag aggtacatcc aataagttta 3780

tcttcaagta aatgtcatga ttctgttgtt tcaatgttta agatagaaaa tcataatgat 3840

aaaactgtaa gtgaaaaaaa taataaatgc caactgatat tacaaaataa tattgaaatg 3900

actactggca cttttgttga agaaattact gaaaattaca agagaaatac tgaaaatgaa 3960

gataacaaat atactgctgc cagtagaaat tctcataact tagaatttga tggcagtgat 4020

tcaagtaaaa atgatactgt ttgtattcat aaagatgaaa cggacttgct atttactgat 4080

cagcacaaca tatgtcttaa attatctggc cagtttatga aggagggaaa cactcagatt 4140

aaagaagatt tgtcagattt aacttttttg gaagttgcga aagctcaaga agcatgtcat 4200

ggtaatactt caaataaaga acagttaact gctactaaaa cggagcaaaa tataaaagat 4260

tttgagactt ctgatacatt ttttcagact gcaagtggga aaaatattag tgtcgccaaa 4320

gagtcattta ataaaattgt aaatttcttt gatcagaaac cagaagaatt gcataacttt 4380

tccttaaatt ctgaattaca ttctgacata agaaagaaca aaatggacat tctaagttat 4440

gaggaaacag acatagttaa acacaaaata ctgaaagaaa gtgtcccagt tggtactgga 4500

aatcaactag tgaccttcca gggacaaccc gaacgtgatg aaaagatcaa agaacctact 4560

ctattgggtt ttcatacagc tagcgggaaa aaagttaaaa ttgcaaagga atctttggac 4620

aaagtgaaaa acctttttga tgaaaaagag caaggtacta gtgaaatcac cagttttagc 4680

catcaatggg caaagaccct aaagtacaga gaggcctgta aagaccttga attagcatgt 4740

gagaccattg agatcacagc tgccccaaag tgtaaagaaa tgcagaattc tctcaataat 4800

gataaaaacc ttgtttctat tgagactgtg gtgccaccta agctcttaag tgataattta 4860

tgtagacaaa ctgaaaatct caaaacatca aaaagtatct ttttgaaagt taaagtacat 4920

gaaaatgtag aaaaagaaac agcaaaaagt cctgcaactt gttacacaaa tcagtcccct 4980

tattcagtca ttgaaaattc agccttagct ttttacacaa gttgtagtag aaaaacttct 5040

gtgagtcaga cttcattact tgaagcaaaa aaatggctta gagaaggaat atttgatggt 5100

caaccagaaa gaataaatac tgcagattat gtaggaaatt atttgtatga aaataattca 5160

aacagtacta tagctgaaaa tgacaaaaat catctctccg aaaaacaaga tacttattta 5220

agtaacagta gcatgtctaa cagctattcc taccattctg atgaggtata taatgattca 5280

ggatatctct caaaaaataa acttgattct ggtattgagc cagtattgaa gaatgttgaa 5340

gatcaaaaaa acactagttt ttccaaagta atatccaatg taaaagatgc aaatgcatac 5400

ccacaaactg taaatgaaga tatttgcgtt gaggaacttg tgactagctc ttcaccctgc 5460

aaaaataaaa atgcagccat taaattgtcc atatctaata gtaataattt tgaggtaggg 5520

ccacctgcat ttaggatagc cagtggtaaa atcgtttgtg tttcacatga aacaattaaa 5580

aaagtgaaag acatatttac agacagtttc agtaaagtaa ttaaggaaaa caacgagaat 5640

aaatcaaaaa tttgccaaac gaaaattatg gcaggttgtt acgaggcatt ggatgattca 5700

gaggatattc ttcataactc tctagataat gatgaatgta gcacgcattc acataaggtt 5760

tttgctgaca ttcagagtga agaaatttta caacataacc aaaatatgtc tggattggag 5820

aaagtttcta aaatatcacc ttgtgatgtt agtttggaaa cttcagatat atgtaaatgt 5880

agtataggga agcttcataa gtcagtctca tctgcaaata cttgtgggat ttttagcaca 5940

gcaagtggaa aatctgtcca ggtatcagat gcttcattac aaaacgcaag acaagtgttt 6000

tctgaaatag aagatagtac caagcaagtc ttttccaaag tattgtttaa aagtaacgaa 6060

cattcagacc agctcacaag agaagaaaat actgctatac gtactccaga acatttaata 6120

tcccaaaaag gcttttcata taatgtggta aattcatctg ctttctctgg atttagtaca 6180

gcaagtggaa agcaagtttc cattttagaa agttccttac acaaagttaa gggagtgtta 6240

gaggaatttg atttaatcag aactgagcat agtcttcact attcacctac gtctagacaa 6300

aatgtatcaa aaatacttcc tcgtgttgat aagagaaacc cagagcactg tgtaaactca 6360

gaaatggaaa aaacctgcag taaagaattt aaattatcaa ataacttaaa tgttgaaggt 6420

ggttcttcag aaaataatca ctctattaaa gtttctccat atctctctca atttcaacaa 6480

gacaaacaac agttggtatt aggaaccaaa gtgtcacttg ttgagaacat tcatgttttg 6540

ggaaaagaac aggcttcacc taaaaacgta aaaatggaaa ttggtaaaac tgaaactttt 6600

tctgatgttc ctgtgaaaac aaatatagaa gtttgttcta cttactccaa agattcagaa 6660

aactactttg aaacagaagc agtagaaatt gctaaagctt ttatggaaga tgatgaactg 6720

acagattcta aactgccaag tcatgccaca cattctcttt ttacatgtcc cgaaaatgag 6780

gaaatggttt tgtcaaattc aagaattgga aaaagaagag gagagcccct tatcttagtg 6840

ggagaaccct caatcaaaag aaacttatta aatgaatttg acaggataat agaaaatcaa 6900

gaaaaatcct taaaggcttc aaaaagcact ccagatggca caataaaaga tcgaagattg 6960

tttatgcatc atgtttcttt agagccgatt acctgtgtac cctttcgcac aactaaggaa 7020

cgtcaagaga tacagaatcc aaattttacc gcacctggtc aagaatttct gtctaaatct 7080

catttgtatg aacatctgac tttggaaaaa tcttcaagca atttagcagt ttcaggacat 7140

ccattttatc aagtttctgc tacaagaaat gaaaaaatga gacacttgat tactacaggc 7200

agaccaacca aagtctttgt tccacctttt aaaactaaat cacattttca cagagttgaa 7260

cagtgtgtta ggaatattaa cttggaggaa aacagacaaa agcaaaacat tgatggacat 7320

ggctctgatg atagtaaaaa taagattaat gacaatgaga ttcatcagtt taacaaaaac 7380

aactccaatc aagcagcagc tgtaactttc acaaagtgtg aagaagaacc tttagattta 7440

attacaagtc ttcagaatgc cagagatata caggatatgc gaattaagaa gaaacaaagg 7500

caacgcgtct ttccacagcc aggcagtctg tatcttgcaa aaacatccac tctgcctcga 7560

atctctctga aagcagcagt aggaggccaa gttccctctg cgtgttctca taaacagctg 7620

tatacgtatg gcgtttctaa acattgcata aaaattaaca gcaaaaatgc agagtctttt 7680

cagtttcaca ctgaagatta ttttggtaag gaaagtttat ggactggaaa aggaatacag 7740

ttggctgatg gtggatggct cataccctcc aatgatggaa aggctggaaa agaagaattt 7800

tatagggctc tgtgtgacac tccaggtgtg gatccaaagc ttatttctag aatttgggtt 7860

tataatcact atagatggat catatggaaa ctggcagcta tggaatgtgc ctttcctaag 7920

gaatttgcta atagatgcct aagcccagaa agggtgcttc ttcaactaaa atacagatat 7980

gatacggaaa ttgatagaag cagaagatcg gctataaaaa agataatgga aagggatgac 8040

acagctgcaa aaacacttgt tctctgtgtt tctgacataa tttcattgag cgcaaatata 8100

tctgaaactt ctagcaataa aactagtagt gcagataccc aaaaagtggc cattattgaa 8160

cttacagatg ggtggtatgc tgttaaggcc cagttagatc ctcccctctt agctgtctta 8220

aagaatggca gactgacagt tggtcagaag attattcttc atggagcaga actggtgggc 8280

tctcctgatg cctgtacacc tcttgaagcc ccagaatctc ttatgttaaa gatttctgct 8340

aacagtactc ggcctgctcg ctggtatacc aaacttggat tctttcctga ccctagacct 8400

tttcctctgc ccttatcatc gcttttcagt gatggaggaa atgttggttg tgttgatgta 8460

attattcaaa gagcataccc tatacagtgg atggagaaga catcatctgg attatacata 8520

tttcgcaatg aaagagagga agaaaaggaa gcagcaaaat atgtggaggc ccaacaaaag 8580

agactagaag ccttattcac taaaattcag gaggaatttg aagaacatga agaaaacaca 8640

acaaaaccat atttaccatc acgtgcacta acaagacagc aagttcgtgc tttgcaagat 8700

ggtgcagagc tttatgaagc agtgaagaat gcagcagacc cagcttacct tgagggttat 8760

ttcagtgaag agcagttaag agccttgaat aatcacaggc aaatgttgaa tgataagaaa 8820

caagctcaga tccagttgga aattaggaag gccatggaat ctgctgaaca aaaggaacaa 8880

ggtttatcaa gggatgtcac aaccgtgtgg aagttgcgta ttgtaagcta ttcaaaaaaa 8940

gaaaaagatt cagttatact gagtatttgg cgtccatcat cagatttata ttctctgtta 9000

acagaaggaa agagatacag aatttatcat cttgcaactt caaaatctaa aagtaaatct 9060

gaaagagcta acatacagtt agcagcgaca aaaaaaactc agtatcaaca actaccggtt 9120

tcagatgaaa ttttatttca gatttaccag ccacgggagc cccttcactt cagcaaattt 9180

ttagatccag actttcagcc atcttgttct gaggtggacc taataggatt tgtcgtttct 9240

gttgtgaaaa aaacaggact tgcccctttc gtctatttgt cagacgaatg ttacaattta 9300

ctggcaataa agttttggat agaccttaat gaggacatta ttaagcctca tatgttaatt 9360

gctgcaagca acctccagtg gcgaccagaa tccaaatcag gccttcttac tttatttgct 9420

ggagattttt ctgtgttttc tgctagtcca aaagagggcc actttcaaga gacattcaac 9480

aaaatgaaaa atactgttga gaatattgac atactttgca atgaagcaga aaacaagctt 9540

atgcatatac tgcatgcaaa tgatcccaag tggtccaccc caactaaaga ctgtacttca 9600

gggccgtaca ctgctcaaat cattcctggt acaggaaaca agcttctgat gtcttctcct 9660

aattgtgaga tatattatca aagtccttta tcactttgta tggccaaaag gaagtctgtt 9720

tccacacctg tctcagccca gatgacttca aagtcttgta aaggggagaa agagattgat 9780

gaccaaaaga actgcaaaaa gagaagagcc ttggatttct tgagtagact gcctttacct 9840

ccacctgtta gtcccatttg tacatttgtt tctccggctg cacagaaggc atttcagcca 9900

ccaaggagtt gtggcaccaa atacgaaaca cccataaaga aaaaagaact gaattctcct 9960

cagatgactc catttaaaaa attcaatgaa atttctcttt tggaaagtaa ttcaatagct 10020

gacgaagaac ttgcattgat aaatacccaa gctcttttgt ctggttcaac aggagaaaaa 10080

caatttatat ctgtcagtga atccactagg actgctccca ccagttcaga agattatctc 10140

agactgaaac gacgttgtac tacatctctg atcaaagaac aggagagttc ccaggccagt 10200

acggaagaat gtgagaaaaa taagcaggac acaattacaa ctaaaaaata tatc 10254

<210> 182

<211> 2487

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MCC

<400> 182

atgaattccg gagttgccat gaaatatgga aacgactcct cggccgagct gagtgagctc 60

cattcagcag ccctggcatc actaaaggga gatatagtgg aacttaataa acgtctccag 120

caaacagaga gggaacggga ccttctggaa aagaaattgg ccaaggcaca gtgcgagcag 180

tcccacctca tgagagagca tgaggatgtc caggagcgaa cgacgcttcg ctatgaggaa 240

cgcatcacag agctccacag cgtcattgcg gagctcaaca agaagataga ccgtctgcaa 300

ggcaccacca tcagggagga agatgagtac tcagaactgc gatcagaact cagccagagc 360

caacacgagg tcaacgagga ctctcgaagc atggaccaag accagacctc tgtctctatc 420

cccgaaaacc agtctaccat ggttactgct gacatggaca actgcagtga cctgaactca 480

gaactgcaga gggtgctgac agggctggag aatgttgtct gcggcaggaa gaagagcagc 540

tgcagcctct ccgtggccga ggtggacagg cacattgagc agctcaccac agccagcgag 600

cactgtgacc tggctattaa gacagtcgag gagattgagg gggtgcttgg ccgggacctg 660

tatcccaacc tggctgaaga gaggtctcgg tgggagaagg agctggctgg gctgagggaa 720

gagaatgaga gcctgactgc catgctgtgc agcaaagagg aagaactgaa ccggactaag 780

gccaccatga atgccatccg ggaagagcgg gaccggctcc ggaggcgggt cagagagctt 840

caaactcgac tacagagcgt gcaggccaca ggtccctcca gccctggccg cctcacttcc 900

accaaccgcc cgattaaccc cagcactggg gagctgagca caagcagcag cagcaatgac 960

attcccatcg ccaagattgc tgagagggtg aagctatcaa agacaaggtc cgaatcgtca 1020

tcatctgatc ggccagtcct gggctcagaa atcagtagca taggggtatc cagcagtgtg 1080

gctgaacacc tggcccactc acttcaggac tgctccaata tccaagagat tttccaaaca 1140

ctctactcac acggatctgc catctcagaa agcaagatta gagagtttga ggtggaaaca 1200

gaacggctga atagccggat tgagcacctc aaatcccaaa atgacctcct gaccataacc 1260

ttggaggaat gtaaaagcaa tgctgagagg atgagcatgc tggtgggaaa atacgaatcc 1320

aatgccacag cgctgaggct ggccttgcag tacagcgagc agtgcatcga agcctacgaa 1380

ctcctcctgg cgctggcaga gagtgagcag agcctcatcc tggggcagtt ccgagcggcg 1440

ggcgtggggt cctcccctgg agaccagtcg ggggatgaaa acatcactca gatgctcaag 1500

cgagctcatg actgccggaa gacagctgag aacgctgcca aggccctgct catgaagctg 1560

gacggcagct gtgggggagc ctttgccgtg gccggctgca gcgtgcagcc ctgggagagc 1620

ctttcctcca acagccacac cagcacaacc agctccacag ccagtagttg cgacaccgag 1680

ttcactaaag aagacgagca gaggctgaag gattatatcc agcagctcaa gaatgacagg 1740

gctgcggtca agctgaccat gctggagctg gaaagcatcc acatcgatcc tctcagctat 1800

gacgtcaagc ctcggggaga cagccagagg ctggatctgg aaaacgcagt gcttatgcag 1860

gagctcatgg ccatgaagga ggagatggcc gagttgaagg cccagctcta cctactggag 1920

aaagagaaga aggccctgga gctgaagctg agcacgcggg aggcccagga gcaggcctac 1980

ctggtgcaca ttgagcacct gaagtccgag gtggaggagc agaaggagca gcggatgcga 2040

tccctcagct ccaccagcag cggcagcaaa gataaacctg gcaaggagtg tgctgatgct 2100

gcctccccag ctctgtccct agctgaactc aggacaacgt gcagcgagaa tgagctggct 2160

gcggagttca ccaacgccat tcgtcgagaa aagaagttga aggccagagt tcaagagctg 2220

gtgagtgcct tggagagact caccaagagc agtgaaatcc gacatcagca atctgcagag 2280

ttcgtgaatg atctaaagcg ggccaacagc aacctggtgg ctgcctatga gaaagcaaag 2340

aaaaagcatc aaaacaaact gaagaagtta gagtcgcaga tgatggccat ggtggagaga 2400

catgagaccc aagtgaggat gctcaagcaa agaatagctc tgctagagga ggagaactcc 2460

aggccacaca ccaatgaaac ttcgctt 2487

<210> 183

<211> 2253

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> EZH2, isoform 1

<400> 183

atgggccaga ctgggaagaa atctgagaag ggaccagttt gttggcggaa gcgtgtaaaa 60

tcagagtaca tgcgactgag acagctcaag aggttcagac gagctgatga agtaaagagt 120

atgtttagtt ccaatcgtca gaaaattttg gaaagaacgg aaatcttaaa ccaagaatgg 180

aaacagcgaa ggatacagcc tgtgcacatc ctgacttctg tgagctcatt gcgcgggact 240

agggagtgtt cggtgaccag tgacttggat tttccaacac aagtcatccc attaaagact 300

ctgaatgcag ttgcttcagt acccataatg tattcttggt ctcccctaca gcagaatttt 360
atggtggaag atgaaactgt tttacataac attccttata tgggagatga agttttagat 420
caggatggta ctttcattga agaactaata aaaaattatg atgggaaagt acacggggat 480
agagaatgtg ggtttataaa tgatgaaatt tttgtggagt tggtgaatgc ccttggtcaa 540
tataatgatg atgacgatga tgatgatgga gacgatcctg aagaaagaga agaaaagcag 600
aaagatctgg aggatcaccg agatgataaa gaaagccgcc cacctcggaa atttccttct 660
gataaaattt ttgaagccat ttcctcaatg tttccagata agggcacagc agaagaacta 720
aaggaaaaat ataaagaact caccgaacag cagctcccag gcgcacttcc tcctgaatgt 780

acccccaaca tagatggacc aaatgctaaa tctgttcaga gagagcaaag cttacactcc 840
tttcatacgc ttttctgtag gcgatgtttt aaatatgact gcttcctaca tcgtaagtgc 900
aattattctt ttcatgcaac acccaacact tataagcgga agaacacaga aacagctcta 960
gacaacaaac cttgtggacc acagtgttac cagcatttgg agggagcaaa ggagtttgct 1020
gctgctctca ccgctgagcg gataaagacc ccaccaaaac gtccaggagg ccgcagaaga 1080
ggacggcttc ccaataacag tagcaggccc agcacccccа ccattaatgt gctggaatca 1140
aaggatacag acagtgatag ggaagcaggg actgaaacgg ggggagagaa caatgataaa 1200
gaagaagaag agaagaaaga tgaaacttcg agctcctctg aagcaaattc tcggtgtcaa 1260

acaccaataa agatgaagcc aaatattgaa cctcctgaga atgtggagtg gagtggtgct 1320
gaagcctcaa tgtttagagt cctcattggc acttactatg acaatttctg tgccattgct 1380
aggttaattg ggaccaaaac atgtagacag gtgtatgagt ttagagtcaa agaatctagc 1440
atcatagctc cagctcccgc tgaggatgtg gatactcctc caaggaaaaa gaagaggaaa 1500
caccggttgt gggctgcaca ctgcagaaag atacagctga aaaaggacgg ctcctctaac 1560
catgtttaca actatcaacc ctgtgatcat ccacggcagc cttgtgacag ttcgtgccct 1620
tgtgtgatag cacaaaattt ttgtgaaaag ttttgtcaat gtagttcaga gtgtcaaaac 1680
cgctttccgg gatgccgctg caaagcacag tgcaacacca agcagtgccc gtgctacctg 1740

gctgtccgag agtgtgaccc tgacctctgt cttacttgtg gagccgctga ccattgggac 1800
agtaaaaatg tgtcctgcaa gaactgcagt attcagcggg gctccaaaaa gcatctattg 1860
ctggcaccat ctgacgtggc aggctggggg atttttatca aagatcctgt gcagaaaaat 1920
gaattcatct cagaatactg tggagagatt atttctcaag atgaagctga cagaagaggg 1980
aaagtgtatg ataaatacat gtgcagcttt ctgttcaact tgaacaatga ttttgtggtg 2040
gatgcaaccc gcaagggtaa caaaattcgt tttgcaaatc attcggtaaa tccaaactgc 2100

tatgcaaaag ttatgatggt taacggtgat cacaggatag gtatttttgc caagagagcc 2160

atccagactg gcgaagagct gttttttgat tacagataca gccaggctga tgccctgaag 2220

tatgtcggca tcgaaagaga aatggaaatc cct 2253

<210> 184

<211> 1053

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NIPP1/PPP1R8, isoform alpha

<400> 184

atggcggcag ccgcgaactc cggctctagc ctcccgctgt tcgactgccc aacctgggca 60

ggtaagcccc ctcccggttt acatctggat gtagtcaaag gagacaaact aattgagaaa 120

ctgattattg atgagaagaa gtattactta tttgggagaa accctgattt gtgtgacttt 180

accattgacc accagtcttg ctctcgggtc catgctgcac ttgtctacca caagcatctg 240

aagagagttt tcctgataga tctcaacagt acacacggca ctttcttggg tcacattcgg 300

ttggaacctc acaagcctca gcaaattccc atcgattcca cggtctcatt tggcgcatcc 360

acaagggcat acactctgcg cgagaagcct cagacattgc catcggctgt gaaaggagat 420

gagaagatgg gtggagagga tgatgaactc aagggcttac tggggcttcc agaggaggaa 480

actgagcttg ataacctgac agagttcaac actgcccaca acaagcggat ttctaccctt 540

accattgagg agggaaatct ggacattcaa agaccaaaga ggaagaggaa gaactcacgg 600

gtgacattca gtgaggatga tgagatcatc aacccagagg atgtggatcc ctcagttggt 660

cgattcagga acatggtgca aactgcagtg gtcccagtca agaagaagcg tgtggagggc 720

cctggctccc tgggcctgga ggaatcaggg agcaggcgca tgcagaactt tgccttcagc 780

ggaggactct acgggggcct gccccccaca cacagtgaag caggctccca gccacatggc 840

atccatggga cagcactcat cggtggcttg cccatgccat acccaaacct tgcccctgat 900

gtggacttga ctcctgttgt gccgtcagca gtgaacatga accctgcacc aaaccctgca 960

gtctataacc ctgaagctgt aaatgaaccc aagaagaaga aatatgcaaa agaggcttgg 1020

ccaggcaaga agcccacacc ttccttgctg att 1053

<210> 185

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PPP1CA, isoform 1

<400> 185

atgtccgaca gcgagaagct caacctggac tcgatcatcg ggcgcctgct ggaagtgcag 60

ggctcgcggc ctggcaagaa tgtacagctg acagagaacg agatccgcgg tctgtgcctg 120

aaatcccggg agatttttct gagccagccc attcttctgg agctggaggc acccctcaag 180

atctgcggtg acatacacgg ccagtactac gaccttctgc gactatttga gtatggcggt 240

ttccctcccg agagcaacta cctctttctg ggggactatg tggacagggg caagcagtcc 300

ttggagacca tctgcctgct gctggcctat aagatcaagt accccgagaa cttcttcctg 360

ctccgtggga accacgagtg tgccagcatc aaccgcatct atggtttcta cgatgagtgc 420

aagagacgct acaacatcaa actgtggaaa accttcactg actgcttcaa ctgcctgccc 480

atcgcggcca tagtggacga aaagatcttc tgctgccacg gaggcctgtc cccggacctg 540

cagtctatgg agcagattcg gcggatcatg cggcccacag atgtgcctga ccagggcctg 600

ctgtgtgacc tgctgtggtc tgaccctgac aaggacgtgc agggctgggg cgagaacgac 660

cgtggcgtct cttttacctt tggagccgag gtggtggcca agttcctcca caagcacgac 720

ttggacctca tctgccgagc acaccaggtg gtagaagacg gctacgagtt ctttgccaag 780

cggcagctgg tgacactttt ctcagctccc aactactgtg gcgagtttga caatgctggc 840

gccatgatga gtgtggacga gaccctcatg tgctctttcc agatcctcaa gcccgccgac 900

aagaacaagg ggaagtacgg gcagttcagt ggcctgaacc ctggaggccg acccatcacc 960

ccaccccgca attccgccaa agccaagaaa 990

<210> 186

<211> 1818

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TAK1/MAP3K7, isoform 1B

<400> 186

atgtctacag cctctgccgc ctcctcctcc tcctcgtctt cggccggtga gatgatcgaa 60

gccccttccc aggtcctcaa ctttgaagag atcgactaca aggagatcga ggtggaagag 120

gttgttggaa gaggagcctt tggagttgtt tgcaaagcta agtggagagc aaaagatgtt 180

gctattaaac aaatagaaag tgaatctgag aggaaagcgt ttattgtaga gcttcggcag 240

ttatcccgtg tgaaccatcc taatattgta aagctttatg gagcctgctt gaatccagtg 300

tgtcttgtga tggaatatgc tgaaggggggc tctttatata atgtgctgca tggtgctgaa 360

ccattgccat attatactgc tgcccacgca atgagttggt gtttacagtg ttcccaagga 420

gtggcttatc ttcacagcat gcaacccaaa gcgctaattc acagggacct gaaaccacca 480

aacttactgc tggttgcagg ggggacagtt ctaaaaattt gtgattttgg tacagcctgt 540

gacattcaga cacacatgac caataacaag gggagtgctg cttggatggc acctgaagtt 600

tttgaaggta gtaattacag tgaaaaatgt gacgtcttca gctggggtat tattctttgg 660

gaagtgataa cgcgtcggaa acccttttgat gagattggtg gcccagcttt ccgaatcatg 720

tgggctgttc ataatggtac tcgaccacca ctgataaaaa atttacctaa gcccattgag 780

agcctgatga ctcgttgttg gtctaaagat ccttcccagc gcccttcaat ggaggaaatt 840

gtgaaaataa tgactcactt gatgcggtac tttccaggag cagatgagcc attacagtat 900

ccttgtcagt attcagatga aggacagagc aactctgcca ccagtacagg ctcattcatg 960

gacattgctt ctacaaatac gagtaacaaa agtgacacta atatggagca agttcctgcc 1020

acaaatgata ctattaagcg cttagaatca aaattgttga aaaatcaggc aaagcaacag 1080

agtgaatctg gacgtttaag cttgggagcc tcccgtggga gcagtgtgga gagcttgccc 1140

ccaacctctg agggcaagag gatgagtgct gacatgtctg aaatagaagc taggatcgcc 1200

gcaaccacag cctattccaa gcctaaacgg ggccaccgta aaactgcttc atttggcaac 1260

attctggatg tccctgagat cgtcatatca ggcaacggac agccaagacg tagatccatc 1320

caagacttga ctgtaactgg aacagaacct ggtcaggtga gcagtaggtc atccagtccc 1380

agtgtcagaa tgattactac ctcaggacca acctcagaaa agccaactcg aagtcatcca 1440

tggacccctg atgattccac agataccaat ggatcagata actccatccc aatggcttat 1500

cttacactgg atcaccaact acagcctcta gcaccgtgcc caaactccaa agaatctatg 1560

gcagtgtttg aacagcattg taaaatggca caagaatata tgaaagttca aacagaaatt 1620

gcattgttat tacagagaaa gcaagaacta gttgcagaac tggaccagga tgaaaaggac 1680

cagcaaaata catctcgcct ggtacaggaa cataaaaagc ttttagatga aaacaaaagc 1740

ctttctactt actaccagca atgcaaaaaa caactagagg tcatcagaag tcagcagcag 1800

aaacgacaag gcacttca 1818

<210> 187

<211> 204

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> CMV promoter

<400> 187

gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 60

ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac 120

tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg 180

tgggaggtct atataagcag agct 204

<210> 188

<211> 1212

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<

220>

<223> Caspase-1, isoform alpha

<400> 188

atggccgaca aggtcctgaa ggagaagaga aagctgttta tccgttccat gggtgaaggt 60

acaataaatg gcttactgga tgaattatta cagacaaggg tgctgaacaa ggaagagatg 120

gagaaagtaa aacgtgaaaa tgctacagtt atggataaga cccgagcttt gattgactcc 180

gttattccga aaggggcaca ggcatgccaa atttgcatca catacatttg tgaagaagac 240

agttacctgg cagggacgct gggactctca gcagatcaaa catctggaaa ttaccttaat 300

atgcaagact ctcaaggagt actttcttcc tttccagctc ctcaggcagt gcaggacaac 360

ccagctatgc ccacatcctc aggctcagaa gggaatgtca agctttgctc cctagaagaa 420

gctcaaagga tatggaaaca aaagtcggca gagatttatc caataatgga caagtcaagc 480

cgcacacgtc ttgctctcat tatctgcaat gaagaatttg acagtattcc tagaagaact 540

ggagctgagg ttgacatcac aggcatgaca atgctgctac aaaatctggg gtacagcgta 600

gatgtgaaaa aaaatctcac tgcttcggac atgactacag agctggaggc atttgcacac 660

cgcccagagc acaagacctc tgacagcacg ttcctggtgt tcatgtctca tggtattcgg 720

gaaggcattt gtgggaagaa acactctgag caagtcccag atatactaca actcaatgca 780

atctttaaca tgttgaatac caagaactgc ccaagtttga aggacaaacc gaaggtgatc 840

atcatccagg cctgccgtgg tgacagccct ggtgtggtgt ggtttaaaga ttcagtagga 900

gtttctggaa acctatcttt accaactaca gaagagtttg aggatgatgc tattaagaaa 960

gcccacatag agaaggattt tatcgctttc tgctcttcca caccagataa tgtttcttgg 1020

agacatccca caatgggctc tgtttttatt ggaagactca ttgaacatat gcaagaatat 1080

gcctgttcct gtgatgtgga ggaaattttc cgcaaggttc gattttcatt tgagcagcca 1140

gatggtagag cgcagatgcc caccactgaa agagtgactt tgacaagatg tttctacctc 1200

ttcccaggac at 1212

<210> 189

<211> 885

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cyclin-D1/CCND1

<400> 189

atggaacacc agctcctgtg ctgcgaagtg gaaaccatcc gccgcgcgta ccccgatgcc 60

aacctcctca acgaccgggt gctgcgggcc atgctgaagg cggaggagac ctgcgcgccc 120

tcggtgtcct acttcaaatg tgtgcagaag gaggtcctgc cgtccatgcg gaagatcgtc 180

gccacctgga tgctggaggt ctgcgaggaa cagaagtgcg aggaggaggt cttcccgctg 240

gccatgaact acctggaccg cttcctgtcg ctggagcccg tgaaaaagag ccgcctgcag 300

ctgctggggg ccacttgcat gttcgtggcc tctaagatga aggagaccat ccccctgacg 360

gccgagaagc tgtgcatcta caccgacaac tccatccggc ccgaggagct gctgcaaatg 420

gagctgctcc tggtgaacaa gctcaagtgg aacctggccg caatgacccc gcacgatttc 480

attgaacact tcctctccaa aatgccagag gcggaggaga acaaacagat catccgcaaa 540

cacgcgcaga ccttcgttgc cctctgtgcc acagatgtga agttcatttc caatccgccc 600

tccatggtgg cagcggggag cgtggtggcc gcagtgcaag gcctgaacct gaggagcccc 660

aacaacttcc tgtcctacta ccgcctcaca cgcttcctct ccagagtgat caagtgtgac 720

ccggactgcc tccgggcctg ccaggagcag atcgaagccc tgctggagtc aagcctgcgc 780

caggcccagc agaacatgga ccccaaggcc gccgaggagg aggaagagga ggaggaggag 840

gtggacctgg cttgcacacc caccgacgtg cgggacgtgg acatc 885

<210> 190

<211> 996

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> A2b receptor (ADORA2B)

<400> 190

atgctgctgg agacacagga cgcgctgtac gtggcgctgg agctggtcat cgccgcgctt 60

tcggtggcgg gcaacgtgct ggtgtgcgcc gcggtgggca cggcgaacac tctgcagacg 120

cccaccaact acttcctggt gtccctggct gcggccgacg tggccgtggg gctcttcgcc 180

atccccttg ccatcaccat cagcctgggc ttctgcactg acttctacgg ctgcctcttc 240

ctcgcctgct tcgtgctggt gctcacgcag agctccatct tcagccttct ggccgtggca 300

gtcgacagat acctggccat ctgtgtcccg ctcaggtata aaagtttggt cacggggacc 360

cgagcaagag gggtcattgc tgtcctctgg gtccttgcct ttggcatcgg attgactcca 420

ttcctggggt ggaacagtaa agacagtgcc accaacaact gcacagaacc ctgggatgga 480

accacgaatg aaagctgctg ccttgtgaag tgtctctttg agaatgtggt ccccatgagc 540

tacatggtat atttcaattt ctttgggtgt gttctgcccc cactgcttat aatgctggtg 600

atctacatta agatcttcct ggtggcctgc aggcagcttc agcgcactga gctgatggac 660

cactcgagga ccaccctcca gcgggagatc catgcagcca agtcactggc catgattgtg 720

gggatttttg ccctgtgctg gttacctgtg catgctgtta actgtgtcac tcttttccag 780

ccagctcagg gtaaaaataa gcccaagtgg gcaatgaata tggccattct tctgtcacat 840

gccaattcag ttgtcaatcc cattgtctat gcttaccgga accgagactt ccgctacact 900

tttcacaaaa ttatctccag gtatcttctc tgccaagcag atgtcaagag tgggaatggt 960

caggctgggg tacagcctgc tctcggtgtg ggccta 996

<210> 191

<211> 1242

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HHLA2, isoform 1

<400> 191

atgaaggcac agacagcact gtctttcttc ctcattctca taacatctct gagtggatct 60

caaggcatat tccctttggc tttcttcatt tatgttccta tgaatgaaca aatcgtcatt 120

ggaagacttg atgaagatat aattctccct tcttcatttg agaggggatc cgaagtcgta 180

atacactgga agtatcaaga tagctataag gttcacagtt actacaaagg cagtgaccat 240

ttggaaagcc aagatcccag atatgcaaac aggacatccc ttttctataa tgagattcaa 300

aatgggaatg cgtcgctatt tttcagaaga gtaagccttc tggacgaagg aatttacacc 360

tgctatgtag gaacagcaat tcaagtgatt acaaacaaag tggtgctaaa ggtgggagtt 420

tttctcacac ccgtgatgaa gtatgaaaag aggaacacaa acagcttctt aatatgcagc 480

gtgttaagtg tttatcctcg tccaattatc acgtggaaaa tggacaacac acctatctct 540

gaaaacaaca tggaagaaac agggtctttg gattcttttt ctattaacag cccactgaat 600

attacaggat caaattcatc ttatgaatgt acaattgaaa attcactgct gaagcaaaca 660

tggacagggc gctggacgat gaaagatggc cttcataaaa tgcaaagtga acacgtttca 720

ctctcatgtc aacctgtaaa tgattatttt tcaccaaacc aagacttcaa agttacttgg 780

tccagaatga aaagtgggac tttctctgtc ctggcttact atctgagctc ctcacaaaat 840

acaattatca atgaatcccg attctcatgg aacaaagagc tgataaacca gagtgacttc 900

tctatgaatt tgatggatct taatctttca gacagtgggg aatatttatg caatatttct 960

tcggatgaat atactttact taccatccac acagtgcatg tagaaccgag ccaagaaaca 1020

gcttcccata acaaaggctt atggattttg gtgccctctg cgattttggc agcttttctg 1080

ctgatttgga gcgtaaaatg ttgcagagcc cagctagaag ccaggaggag cagacaccct 1140

gctgatggag cccaacaaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgctg tcccagtgca 1200

cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag ta 1242

<210> 192

<211> 1128

<212> DNA

<213> Herpes simplex

<220>

<223> herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)

<400> 192

atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60

ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120

cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg 180

gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240

gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300

tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta 360

atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420

cctcatgtcg gggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccggccct caccctcatc 480

ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctacccgg ccgcgcgata ccttatgggc 540

agcatgaccc cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc 600

acaaacatcg tgttgggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660

cagcgccccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg 720

ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780

cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggccca 840

cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggccccc 900

aacggcgacc tgtataacgt gtttgcctgg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt 960

cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgccctg 1020

ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca ccccaggctc cataccgacg 1080

atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaac 1128

<210> 193

<211> 1173

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform 1

<400> 193

atgccgccct ccgggctgcg gctgctgccg ctgctgctac cgctgctgtg gctactggtg 60

ctgacgcctg gccggccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg 120

gtgaagcgga agcgcatcga ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggctcgcc 180

agccccccga gccaggggga ggtgccgccc ggcccgctgc ccgaggccgt gctcgccctg 240

tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag 300

gccgactact acgccaagga ggtcacccgc gtgctaatgg tggaaaccca caacgaaatc 360

tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc 420

cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggctc 480

aagttaaaag tggagcagca cgtggagctg taccagaaat acagcaacaa ttcctggcga 540

tacctcagca accggctgct ggcacccagc gactcgccag agtggttatc ttttgatgtc 600

accggagttg tgcggcagtg gttgagccgt ggaggggaaa ttgagggctt tcgccttagc 660

gcccactgct cctgtgacag cagggataac acactgcaag tggacatcaa cgggttcact 720

accggccgcc gaggtgacct ggccaccatt catggcatga accggccttt cctgcttctc 780

atggccaccc cgctggagag ggcccagcat ctgcaaagct cccggcaccg ccgagccctg 840

gacaccaact attgcttcag ctccacggag aagaactgct gcgtgcggca gctgtacatt 900

gacttccgca aggacctcgg ctggaagtgg atccacgagc ccaagggcta ccatgccaac 960

ttctgcctcg ggccctgccc ctacatttgg agcctggaca cgcagtacag caaggtcctg 1020

gccctgtaca accagcataa cccgggcgcc tcggcggcgc cgtgctgcgt gccgcaggcg 1080

ctggagccgc tgcccatcgt gtactacgtg ggccgcaagc ccaaggtgga gcagctgtcc 1140

aacatgatcg tgcgctcctg caagtgcagc tga 1173

<210> 194

<211> 699

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF

<400> 194

atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctcta cctccaccat 60

gccaagtggt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180

atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240

atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300

aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420

aaaaaatcag ttcgaggaaa gggaaagggg caaaaacgaa agcgcaagaa atcccggtat 480

aagtcctgga gcgtgtacgt tggtgcccgc tgctgtctaa tgccctggag cctccctggc 540

ccccatccct gtgggccttg ctcagagcgg agaaagcatt tgtttgtaca agatccgcag 600

acgtgtaaat gttcctgcaa aaacacagac tcgcgttgca aggcgaggca gcttgagtta 660

aacgaacgta cttgcagatg tgacaagccg aggcggtga 699

<210> 195

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform 1 shRNA target 1

<400> 195

gaaacccaca acgaaatct 19

<210> 196

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 2

<400> 196

gtacacacag catatatat 19

<210> 197

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 3

<400> 197

ctgctgaggc tcaagttaa 19

<210> 198

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 4

<400> 198

gtggagctgt accagaaat 19

<210> 199

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 5

<400> 199

gactcgccag agtggttat 19

<210> 200

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 6

<400> 200

gagccgtgga ggggaaatt 19

<210> 201

<

211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 7

<400> 201

cctgtgacag cagggataa 19

<210> 202

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 8

<400> 202

gccctggaca ccaactatt 19

<210> 203

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 9

<400

> 203

ccctgtacaa ccagcataa 19

<210> 204

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 1

<400> 204

gagatcgagt acatcttca 19

<210> 205

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 2

<400> 205

gcagattatg cggatcaaa 19

<210> 206

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 3

<400> 206

gatagagcaa gacaagaaa 19

<210> 207

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 4

<400> 207

ggagaaagca tttgtttgt 19

<210> 208

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 5

<400> 208

gatccgcaga cgtgtaaat 19

<210> 209

<211

> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 6

<400> 209

gcgaggcagc ttgagttaa 19

<210> 210

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ARI-134

<400> 210

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg ccacactgta tggactattc tagagatagt ccatacagtg 840

tggctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140

aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380

tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440

caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500

tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggcc gactacaagc gaattatcta gagtaattcg 1620

cttgtagtcg gctttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680

tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740

ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800

actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860

attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920

ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980

tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100

caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160

gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820

aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 211

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ARI-135

<400> 211

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg agctggctcc tggtgaattc tagagattca ccaggagcca 840

gctctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140

aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380

tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440

caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500

tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggcc gactacaagc gaattatcta gagtaattcg 1620

cttgtagtcg gctttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680

tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740

ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800

actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860

attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920

ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980

tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100

caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160

gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820

aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 212

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ARI-136

<400> 212

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg cagctggaat tctttctatc tagagtagaa agaattccag 840

ctgctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900

aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960

aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020

catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080

accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140

aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380

tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440

caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500

tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560

tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggcc gactacaagc gaattatcta gagtaattcg 1620

cttgtagtcg gctttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680

tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740

ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800

actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860

attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920

ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980

tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040

gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100

caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160

gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820

aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120

taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240

tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840

agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 213

<211> 3890

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ARI-137

<400> 213

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720

tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg atgtgacctt ctacaagatt ctagagatct tgtagaaggt 840

cacatctttt ttcgacagat ctggcgcgcc atagtggcca gcggccgcag gtaagccagc 900

ccaggcctcg ccctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct gcatccaggg 960

acaggcccca gccgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttcctcaggt ctgcccgggt 1020

ggcatccctg tgacccctcc ccagtgcctc tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc 1080

ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt gcatcatttt gtctgactag gtgtccttct 1140

ataatattat ggggtggagg ggggtggtat ggagcaaggg gcccaagtta acttgtttat 1200

tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 1260

tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg 1320

gatccaaggt cgggcaggaa gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac 1380

gatacaaggc tgttagagag ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag 1440

tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat 1500

gttttaaaat ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt 1560

tatatatctt gtggaaagga cgaaactagg ccgactacaa gcgaattatc tagagtaatt 1620

cgcttgtagt cggctttttt cgagtagcta gagaattcat ggtaatagcg atgactaata 1680

cgtagatgta ctgccaagta ggaaagtccc ataaggtcat gtactgggca taatgccagg 1740

cgggccattt accgtcattg acgtcaatag ggggcgtact tggcatatga tacacttgat 1800

gtactgccaa gtgggcagtt taccgtaaat agtccaccca ttgacgtcaa tggaaagtcc 1860

ctattggcgt tactatggga acatacgtca ttattgacgt caatgggcgg gggtcgttgg 1920

gcggtcagcc aggcgggcca tttaccgtaa gttatgtaac gcggaactcc atatatgggc 1980

tatgaactaa tgaccccgta attgattact attaataact agacccagct ttcttgtaca 2040

aagttggcat tataagaaag cattgcttat caatttgttg caacgaacag gtcactatca 2100

gtcaaaataa aatcattatt tgccatccag ctgatatccc ctatagtgag tcgtattaca 2160

tggtcatagc tgtttcctgg cagctctggc ccgtgtctca aaatctctga tgttacattg 2220

cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata 2280

caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcgag gccgcgatta aattccaaca 2340

tggatgctga tttatatggg tataaatggg ctcgcgataa tgtcgggcaa tcaggtgcga 2400

caatctatcg cttgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag 2460

gtagcgttgc caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg acggaattta 2520

tgcctcttcc gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca 2580

ctgcgatccc cggaaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa 2640

atattgttga tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt 2700

gtccttttaa cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg 2760

gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctgtt gaacaagtct 2820

ggaaagaaat gcataaactt ttgccattct caccggattc agtcgtcact catggtgatt 2880

tctcacttga taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgtatt gatgttggac 2940

gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc ctcggtgagt 3000

tttctccttc attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat cctgatatga 3060

ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta atcagaattg gttaattggt 3120

tgtaacactg gcagagcatt acgctgactt gacgggacgg cgcaagctca tgaccaaaat 3180

cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 3240

gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 3300

cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 3360

ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 3420

accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag 3480

tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 3540

cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 3600

gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc 3660

ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca 3720

cgagggagct tccagggggа aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 3780

tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 3840

ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 3890

<210> 214

<211> 3379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<

221> misc_feature

<222> (1018)...(1038)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1060)...(1080)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> source

<222> (1)...(3379)

<223> ARI-205

<400> 214

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720

tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780

gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840

aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900

ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960

agtccggatc aacgccctag gtttatgttt ggatgaactg acatacgcgt atccgtcnnn 1020

nnnnnnnnnn nnnnnnnngt agtgaaatat atattaaacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1080

tacggtaacg cggaattcgc aactatttta tcaatttttt gcgtcgactc gagtagctag 1140

agaattcatg gtaatagcga tgactaatac gtagatgtac tgccaagtag gaaagtccca 1200

taaggtcatg tactgggcat aatgccaggc gggccattta ccgtcattga cgtcaatagg 1260

gggcgtactt ggcatatgat acacttgatg tactgccaag tgggcagttt accgtaaata 1320

gtccacccat tgacgtcaat ggaaagtccc tattggcgtt actatgggaa catacgtcat 1380

tattgacgtc aatgggcggg ggtcgttggg cggtcagcca ggcgggccat ttaccgtaag 1440

ttatgtaacg cggaactcca tatatgggct atgaactaat gaccccgtaa ttgattacta 1500

ttaataacta gacccagctt tcttgtacaa agttggcatt ataagaaagc attgcttatc 1560

aatttgttgc aacgaacagg tcactatcag tcaaaataaa atcattattt gccatccagc 1620

tgatatcccc tatagtgagt cgtattacat ggtcatagct gtttcctggc agctctggcc 1680

cgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat 1740

aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata ttcaacggga 1800

aacgtcgagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc 1860

tcgcgataat gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcgc ttgtatggga agcccgatgc 1920

gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat 1980

ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg 2040

tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc ggaaaaacag cattccaggt 2100

attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttcctgcg 2160

ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct 2220

cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga 2280

gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt tgccattctc 2340

accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcacttgat aaccttattt ttgacgaggg 2400

gaaattaata ggttgtattg atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct 2460

tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca 2520

aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctcgatga 2580

gtttttctaa tcagaattgg ttaattggtt gtaacactgg cagagcatta cgctgacttg 2640

acgggacggc gcaagctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttacgcgt cgttccactg 2700

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2760

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2820

agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2880

tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2940

atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3000

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 3060

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 3120

gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 3180

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 3240

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 3300

gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc 3360

cttttgctgg ccttttgct 3379

<210> 215

<211> 4744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3377)...(3398)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (3418)...(3439)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> source

<222> (1)...(4744)

<223> ARI-206

<400> 215

aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 60

tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 120

tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 180

cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 240

agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 300

tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 360

aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 420

ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 480

cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 540

accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 600

ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 660

ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgacg cgtaactcac gttaagggat 720

tttggtcatg agcttgcgcc gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac 780

caattaacca attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc 840

atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac 900

tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt 960

ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa 1020

tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag 1080

acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaaccg 1140

ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa 1200

ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt 1260

tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg tttttccggg gatcgcagtg 1320

gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata 1380

aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct 1440

ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaagcg atagattgtc 1500

gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg 1560

ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat ggctcataac acccttgta 1620

ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg atatattttt atcttgtgca 1680

atgtaacatc agagattttg agacacgggc cagagctgcc aggaaacagc tatgaccatg 1740

taatacgact cactataggg gatatcagct ggatggcaaa taatgatttt attttgactg 1800

atagtgacct gttcgttgca acaaattgat aagcaatgct ttcttataat gccaactttg 1860

tacaagaaag ctgggtctag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 1920

ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 1980

aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 2040

actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 2100

caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 2160

tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 2220

ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 2280

cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 2340

tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 2400

atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctctctg gctaactaga 2460

gaacccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actataggga gacccaagct 2520

tagatctgtt tccggtcgcc accatgagcg agctgatcaa ggagaacatg cacatgaagc 2580

tgtacatgga gggcaccgtg aacaaccacc acttcaagtg cacatccgag ggcgaaggca 2640

agccctacga gggcacccag accatgaaga tcaaggtggt cgagggcggc cctctcccct 2700

tcgccttcga catcctggct accagcttca tgtacggcag caaagccttc atcaaccaca 2760

cccagggcat ccccgacttc tttaagcagt ccttccctga gggcttcaca tgggagagaa 2820

tcaccacata cgaagacggg ggcgtgctga ccgctaccca ggacaccagc ttccagaacg 2880

gctgcatcat ctacaacgtc aagatcaacg gggtgaactt cccatccaac ggccctgtga 2940

tgcagaagaa aacacgcggc tgggaggcca acaccgagat gctgtacccc gctgacggcg 3000

gcctgagagg ccacagccag atggccctga agctcgtggg cgggggctac ctgcactgct 3060

ccttcaagac cacatacaga tccaagaaac ccgctaagaa cctcaagatg cccggcttcc 3120

acttcgtgga ccacagactg gaaagaatca aggaggccga caaagagacc tacgtcgagc 3180

agcacgagat ggctgtggcc aagtactgcg acctccctag caaactgggg cacagataat 3240

cgatagtttg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat cgttgcctgc acatcttgga 3300

aacacttgct gggattactt cttcaggtta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 3360

ctgttgacag tgagcgnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnta gtgaagccac agatgtannn 3420

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt gcctactgcc tcggaattca aggggctact ttaggagcaa 3480

ttatcttgtt tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacatttt tacaaagctg 3540

aattaaaatg gtataaatta aatcactttt ttcaattctc tagaggtacc gcatgcgtac 3600

gtggccagcg gccgcaggta agccagccca ggcctcgccc tccagctcaa ggcgggacag 3660

gtgccctaga gtagcctgca tccagggaca ggccccagcc gggtgctgac acgtccacct 3720

ccatctcttc ctcaggtctg cccgggtggc atccctgtga cccctcccca gtgcctctcc 3780

tggccctgga agttgccact ccagtgccca ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca 3840

tcattttgtc tgactaggtg tccttctata atattatggg gtggaggggg gtggtatgga 3900

gcaaggggcc caagttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 3960

catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 4020

actcatcaat gtatcttatc atgtctggat ccagtcgact gaattggttc ctttaaagcc 4080

tgctttttg tacaaagttg gcattataaa aaagcattgc tcatcaattt gttgcaacga 4140

acaggtcact atcagtcaaa ataaaatcat tatttggggc ccgagcttaa gactggccgt 4200

cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaacat ccatgctagc gttaacgcga gagtagggaa 4260

ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcggaaga ctgggccttt cgttttatct 4320

gttgtttgtc ggtgaacgct ctcctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg 4380

ttgtgaagca acggcccgga gggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc 4440

aaactaagca gaaggccatc ctgacggatg gccttttttgc gtttctacaa actcttcctg 4500

gctagcggta cgcgtattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct 4560

gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4620

gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4680

ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4740

aaag 4744

<210> 216

<211> 3377

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1018)...(1036)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1058)...(1078)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> source

<222> (1)...(3377)

<223> ARI-207

<400> 216

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720

tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780

gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840

aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900

ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960

agtccggatc aacgccctag gtttatgttt ggatgaactg acatacgcgt atccgtcnnn 1020

nnnnnnnnnn nnnnnngtag tgaaatatat attaaacnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnta 1080

cggtaacgcg gaattcgcaa ctattttatc aatttttttgc gtcgactcga gtagctagag 1140

aattcatggt aatagcgatg actaatacgt agatgtactg ccaagtagga aagtcccata 1200

aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg 1260

gcgtacttgg catatgatac acttgatgta ctgccaagtg ggcagtttac cgtaaatagt 1320

ccacccattg acgtcaatgg aaagtcccta ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta 1380

ttgacgtcaa tgggcggggg tcgttgggcg gtcagccagg cgggccattt accgtaagtt 1440

atgtaacgcg gaactccata tatgggctat gaactaatga ccccgtaatt gattactatt 1500

aataactaga cccagctttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat tgcttatcaa 1560

tttgttgcaa cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttgc catccagctg 1620

atatccccta tagtgagtcg tattacatgg tcatagctgt ttcctggcag ctctggcccg 1680

tgtctcaaaa tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa tatatcatca tgaacaataa 1740

aactgtctgc ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat gagccatatt caacgggaaa 1800

cgtcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg atgctgattt atatgggtat aaatgggctc 1860

gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc 1920

cagagttgtt tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg 1980

tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac catcaagcat tttatccgta 2040

ctcctgatga tgcatggtta ctcaccactg cgatccccgg aaaaacagca ttccaggtat 2100

tagaagaata tcctgattca ggtgaaaata ttgttgatgc gctggcagtg ttcctgcgcc 2160

ggttgcattc gattcctgtt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg 2220

ctcaggcgca atcacgaatg aataacggtt tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc 2280

gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaacttttg ccattctcac 2340

cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa ccttattttt gacgagggga 2400

aattaatagg ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg 2460

ccatcctatg gaactgcctc ggtgagtttt ctccttcatt acagaaacgg ctttttcaaa 2520

aatatggtat tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt 2580

ttttctaatc agaattggtt aattggttgt aacactggca gagcattacg ctgacttgac 2640

gggacggcgc aagctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttacgcgtcg ttccactgag 2700

cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa 2760

tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag 2820

agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 2880

tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 2940

acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 3000

ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 3060

gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 3120

gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa 3180

gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc 3240

tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 3300

caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct 3360

tttgctggcc ttttgct 3377

<210> 217

<211> 4738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3377)...(3395)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (3415)...(3433)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> source

<222> (1)...(4738)

<223> ARI-208

<400> 217

aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 60

ttttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 120

tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 180

cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 240

agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 300

tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 360

aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 420

ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 480

cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 540

accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 600

ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 660

ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgacg cgtaactcac gttaagggat 720

tttggtcatg agcttgcgcc gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac 780

caattaacca attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc 840

atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac 900

tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt 960

ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa 1020

tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag 1080

acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaaccg 1140

ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa 1200

ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt 1260

tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg tttttccggg gatcgcagtg 1320

gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata 1380

aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct 1440

ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaagcg atagattgtc 1500

gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg 1560

ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat ggctcataac acccttgta 1620

ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg atatatttttt atcttgtgca 1680

atgtaacatc agagattttg agacacgggc cagagctgcc aggaaacagc tatgaccatg 1740

taatacgact cactataggg gatatcagct ggatggcaaa taatgatttt attttgactg 1800

atagtgacct gttcgttgca acaaattgat aagcaatgct ttcttataat gccaactttg 1860

tacaagaaag ctgggtctag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 1920

ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 1980

aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 2040

actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 2100

caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 2160

tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 2220

ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 2280

cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 2340

tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 2400

atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctctctg gctaactaga 2460

gaacccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actataggga gacccaagct 2520

tagatctgtt tccggtcgcc accatgagcg agctgatcaa ggagaacatg cacatgaagc 2580

tgtacatgga gggcaccgtg aacaaccacc acttcaagtg cacatccgag ggcgaaggca 2640

agccctacga gggcacccag accatgaaga tcaaggtggt cgagggcggc cctctcccct 2700

tcgccttcga catcctggct accagcttca tgtacggcag caaagccttc atcaaccaca 2760

cccagggcat ccccgacttc tttaagcagt ccttccctga gggcttcaca tgggagagaa 2820

tcaccacata cgaagacggg ggcgtgctga ccgctaccca ggacaccagc ttccagaacg 2880

gctgcatcat ctacaacgtc aagatcaacg gggtgaactt cccatccaac ggccctgtga 2940

tgcagaagaa aacacgcggc tgggaggcca acaccgagat gctgtacccc gctgacggcg 3000

gcctgagagg ccacagccag atggccctga agctcgtggg cgggggctac ctgcactgct 3060

ccttcaagac cacatacaga tccaagaaac ccgctaagaa cctcaagatg cccggcttcc 3120

acttcgtgga ccacagactg gaaagaatca aggaggccga caaagagacc tacgtcgagc 3180

agcacgagat ggctgtggcc aagtactgcg acctccctag caaactgggg cacagataat 3240

cgatagtttg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat cgttgcctgc acatcttgga 3300

aacacttgct gggattactt cttcaggtta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 3360

ctgttgacag tgagcgnnnn nnnnnnnnnn nnnnntagtg aagccacaga tgtannnnnn 3420

nnnnnnnnnn nnntgcctac tgcctcggaa ttcaaggggc tactttagga gcaattatct 3480

tgtttactaa aactgaatac cttgctatct ctttgataca tttttacaaa gctgaattaa 3540

aatggtataa attaaatcac ttttttcaat tctctagagg taccgcatgc gtacgtggcc 3600

agcggccgca ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 3660

tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 3720

cttcctcagg tctgcccggg tggcatccct gtgacccctc cccagtgcct ctcctggccc 3780

tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat aaaattaagt tgcatcattt 3840

tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag gggggtggta tggagcaagg 3900

ggcccaagtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 3960

aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 4020

caatgtatct tatcatgtct ggatccagtc gactgaattg gttcctttaa agcctgcttt 4080

tttgtacaaa gttggcatta taaaaaagca ttgctcatca atttgttgca acgaacaggt 4140

cactatcagt caaaataaaa tcattatttg gggcccgagc ttaagactgg ccgtcgtttt 4200

acaacgtcgt gactgggaaa acatccatgc tagcgttaac gcgagagtag ggaactgcca 4260

ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcgg aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt 4320

tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgtga 4380

agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaacta 4440

agcagaaggc atcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactctt cctggctagc 4500

ggtacgcgta ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg 4560

ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 4620

ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 4680

agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaag 4738

<210> 218

<211> 6329

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> pKD46

<400> 218

catcgattta ttatgacaac ttgacggcta catcattcac tttttcttca caaccggcac 60

ggaactcgct cgggctggcc ccggtgcatt ttttaaatac ccgcgagaaa tagagttgat 120

cgtcaaaacc aacattgcga ccgacggtgg cgataggcat ccgggtggtg ctcaaaagca 180

gcttcgcctg gctgatacgt tggtcctcgc gccagcttaa gacgctaatc cctaactgct 240

ggcggaaaag atgtgacaga cgcgacggcg acaagcaaac atgctgtgcg acgctggcga 300

tatcaaaatt gctgtctgcc aggtgatcgc tgatgtactg acaagcctcg cgtacccgat 360

tatccatcgg tggatggagc gactcgttaa tcgcttccat gcgccgcagt aacaattgct 420

caagcagatt tatcgccagc agctccgaat agcgcccttc cccttgcccg gcgttaatga 480
tttgcccaaa caggtcgctg aaatgcggct ggtgcgcttc atccgggcga aagaaccccg 540
tattggcaaa tattgacggc cagttaagcc attcatgcca gtaggcgcgc ggacgaaagt 600
aaacccactg gtgataccat tcgcgagcct ccggatgacg accgtagtga tgaatctctc 660
ctggcgggaa cagcaaaata tcacccggtc ggcaaacaaa ttctcgtccc tgatttttca 720
ccacccccctg accgcgaatg gtgagattga gaatataacc tttcattccc agcggtcggt 780
cgataaaaaa atcgagataa ccgttggcct caatcggcgt taaacccgcc accagatggg 840
cattaaacga gtatcccggc agcaggggat cattttgcgc ttcagccata cttttcatac 900

tcccgccatt cagagaagaa accaattgtc catattgcat cagacattgc cgtcactgcg 960
tcttttactg gctcttctcg ctaaccaaac cggtaacccc gcttattaaa agcattctgt 1020
aacaaagcgg gaccaaagcc atgacaaaaa cgcgtaacaa aagtgtctat aatcacggca 1080
gaaaagtcca cattgattat ttgcacggcg tcacactttg ctatgccata gcatttttat 1140
ccataagatt agcggatcct acctgacgct ttttatcgca actctctact gtttctccat 1200
acccgttttt ttgggaattc gagctctaag gaggttataa aaaatggata ttaatactga 1260
aactgagatc aagcaaaagc attcactaac ccccttttcct gttttcctaa tcagcccggc 1320
atttcgcggg cgatattttc acagctattt caggagttca gccatgaacg cttattacat 1380

tcaggatcgt cttgaggctc agagctgggc gcgtcactac cagcagctcg cccgtgaaga 1440
gaaagaggca gaactggcag acgacatgga aaaaggcctg ccccagcacc tgtttgaatc 1500
gctatgcatc gatcatttgc aacgccacgg ggccagcaaa aaatccatta cccgtgcgtt 1560
tgatgacgat gttgagtttc aggagcgcat ggcagaacac atccggtaca tggttgaaac 1620
cattgctcac caccaggttg atattgattc agaggtataa aacgaatgag tactgcactc 1680
gcaacgctgg ctgggaagct ggctgaacgt gtcggcatgg attctgtcga cccacaggaa 1740
ctgatcacca ctcttcgcca gacggcattt aaaggtgatg ccagcgatgc gcagttcatc 1800
gcattactga tcgttgccaa ccagtacggc cttaatccgt ggacgaaaga aatttacgcc 1860

tttcctgata agcagaatgg catcgttccg gtggtgggcg ttgatggctg gtcccgcatc 1920
atcaatgaaa accagcagtt tgatggcatg gactttgagc aggacaatga atcctgtaca 1980
tgccggattt accgcaagga ccgtaatcat ccgatctgcg ttaccgaatg gatggatgaa 2040
tgccgccgcg aaccattcaa aactcgcgaa ggcagagaaa tcacggggcc gtggcagtcg 2100
catcccaaac ggatgttacg tcataaagcc atgattcagt gtgcccgtct ggccttcgga 2160
tttgctggta tctatgacaa ggatgaagcc gagcgcattg tcgaaaatac tgcatacact 2220

gcagaacgtc agccggaacg cgacatcact ccggttaacg atgaaaccat gcaggagatt 2280

aacactctgc tgatcgccct ggataaaaca tgggatgacg acttattgcc gctctgttcc 2340

cagatatttc gccgcgacat tcgtgcatcg tcagaactga cacaggccga agcagtaaaa 2400

gctcttggat tcctgaaaca gaaagccgca gagcagaagg tggcagcatg acaccggaca 2460

ttatcctgca gcgtaccggg atcgatgtga gagctgtcga acaggggggat gatgcgtggc 2520

acaaattacg gctcggcgtc atcaccgctt cagaagttca caacgtgata gcaaaacccc 2580

gctccggaaa gaagtggcct gacatgaaaa tgtcctactt ccacaccctg cttgctgagg 2640

tttgcaccgg tgtggctccg gaagttaacg ctaaagcact ggcctgggga aaacagtacg 2700

agaacgacgc cagaaccctg tttgaattca cttccggcgt gaatgttact gaatccccga 2760

tcatctatcg cgacgaaagt atgcgtaccg cctgctctcc cgatggttta tgcagtgacg 2820

gcaacggcct tgaactgaaa tgcccgttta cctcccggga tttcatgaag ttccggctcg 2880

gtggtttcga ggccataaag tcagcttaca tggcccaggt gcagtacagc atgtgggtga 2940

cgcgaaaaaa tgcctggtac tttgccaact atgacccgcg tatgaagcgt gaaggcctgc 3000

attatgtcgt gattgagcgg gatgaaaagt acatggcgag ttttgacgag atcgtgccgg 3060

agttcatcga aaaaatggac gaggcactgg ctgaaattgg ttttgtattt ggggagcaat 3120

ggcgatgacg catcctcacg ataatatccg ggtaggcgca atcactttcg tctactccgt 3180

tacaaagcga ggctgggtat ttcccggcct ttctgttatc cgaaatccac tgaaagcaca 3240

gcggctggct gaggagataa ataataaacg aggggctgta tgcacaaagc atcttctgtt 3300

gagttaagaa cgagtatcga gatggcacat agccttgctc aaattggaat caggtttgtg 3360

ccaataccag tagaaacaga cgaagaatcc atgggtatgg acagttttcc ctttgatatg 3420

taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gttagtcttg atgcttcact gatagataca 3480

agagccataa gaacctcaga tccttccgta tttagccagt atgttctcta gtgtggttcg 3540

ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca tacttacttt gcatgtcact 3600

caaaaatttt gcctcaaaac tggtgagctg aatttttgca gttaaagcat cgtgtagtgt 3660

ttttcttagt ccgttacgta ggtaggaatc tgatgtaatg gttgttggta ttttgtcacc 3720

attcattttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga tccatttgtc tatctagttc 3780

aacttggaaa atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgctta tcaaccacca atttcatatt 3840

gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc cattggttaa gccttttaaa 3900

ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat gaacttaaat tcatcaaggc taatctctat 3960

atttgccttg tgagttttct tttgtgttag ttcttttaat aaccactcat aaatcctcat 4020

agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta tattttatga atttttttaa 4080

ctggaaaaga taaggcaata tctcttcact aaaaactaat tctaattttt cgcttgagaa 4140

cttggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta accaaaggat tcctgatttc 4200

cacagttctc gtcatcagct ctctggttgc tttagctaat acaccataag cattttccct 4260

actgatgttc atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct 4320

tgtagggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag cataaaatta gcttggtttc 4380

atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt gctttgaaaa caactaattc 4440

agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta taccaattga gatgggctag 4500

tcaatgataa ttactagtcc ttttcctttg agttgtgggt atctgtaaat tctgctagac 4560

ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta aattccgcta gacctttgtg 4620

tgtttttttt gtttatattc aagtggttat aatttataga ataaagaaag aataaaaaaa 4680

gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta ctttagtcag ttccgcagta 4740

ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc tcctctacaa aacagacctt aaaaccctaa 4800

aggcttaagt agcaccctcg caagctcggt tgcggccgca atcgggcaaa tcgctgaata 4860

ttccttttgt ctccgaccat caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc 4920

gctgcgctca cggctctggc agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg 4980

attcatgcaa ggaaactacc cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt 5040

tttatggcgg gtctgctatg tggtgctatc tgacttttg ctgttcagca gttcctgccc 5100

tctgattttc cagtctgacc acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa 5160

tgcacccagt aaggcagcgg tatcatcaac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 5220

acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 5280

ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 5340

ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 5400

tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 5460

tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca 5520

gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 5580

tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 5640

tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 5700

ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc atgttgtgca aaaaagcggt 5760

tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 5820

ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 5880

gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 5940

ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat 6000

cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 6060

ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 6120

ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 6180

gaaatgttga atactcatac tcttccttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 6240

ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 6300

gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctg 6329

<210> 219

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asd-1 primer

<400> 219

ccttcctaac gcaaattccc tg 22

<210> 220

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asd-2 primer

<400> 220

ccaatgctct gcttaactcc tg 22

<210> 221

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asd-3 primer

<400> 221

gcctcgccat gtttcagtac g 21

<210> 222

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> asd-4 primer

<400> 222

ggtctggtgc attccgagta c 21

<210> 223

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv-3 primer

<400> 223

cataatctgg gtccttggtc tgc 23

<210> 224

<211> 5728

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pJW168 plasmid

<400> 224

ttactaatcg ccatcttcca gcaggcgcac cattgcccct gtttcactat ccaggttacg 60

gatatagttc atgacaatat ttacattggt ccagccacca gcttgcatga tctccggtat 120

tgaaactcca gcgcgggcca tatctcgcgc ggctccgaca cgggcactgt gtccagacca 180

ggccaggtat ctctgaccag agtcatcctt agcgccgtaa atcaatcgat gagttgcttc 240

aaaaatccct tccagggcgc gagttgatag ctggctggtg gcagatggcg cggcaacacc 300

atttttctg acccggcaaa acaggtagtt attcggatca tcagctacac cagagacgga 360

aatccatcgc tcgaccagtt tagttacccc caggctaagt gccttctcta cacctgcggt 420

gctaaccagc gttttcgttc tgccaatatg gattaacatt ctcccaccgt cagtacgtga 480

gatatcttta accctgatcc tggcaatttc ggctatacgt aacagggtgt tataagcaat 540

ccccagaaat gccagattac gtatatcctg gcagcgatcg ctattttcca tgagtgaacg 600

aacctggtcg aaatcagtgc gttcgaacgc tagagcctgt tttgcacgtt caccggcatc 660

aacgttttct tttcggatcc gccgcataac cagtgaaaca gcattgctgt cacttggtcg 720

tggcagcccg gaccgacgat gaagcatgtt tagctggccc aaatgttgct ggatagtttt 780

tactgccaga ccgcgcgcct gaagatatag aagataatcg cgaacatctt caggttctgc 840

gggaaaccat ttccggttat tcaacttgca ccatgccgcc cacgaccggc aaacggacag 900

aagcattttc caggtatgct cagaaaacgc ctggcgatcc ctgaacatgt ccatcaggtt 960

cttgcgaacc tcatcactcg ttgcatcgac cggtaatgca ggcaaatttt ggtgtacggg 1020

cagtaaattg gacatgtcaa cggtacctgc agtctagagt cgaggcctgt ttcctgtgtg 1080

aaattgttat ccgctcacaa ttccacacat tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 1140

ctggggtgcc taatgagtga gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1200

cacattatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctgc 1260

ctcgcgcgtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 1320

acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 1380

gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagacg gagtgtatcc 1440

gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat gatagcgccc ggaagagagt 1500

caattcaggg tggtgaatgt gaaaccagta acgttatacg atgtcgcaga gtatgccggt 1560

gtctcttatc agaccgtttc ccgcgtggtg aaccaggcca gccacgtttc tgcgaaaacg 1620

cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca ttcccaaccg cgtggcacaa 1680

caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca cctccagtct ggccctgcac 1740

gcgccgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg atcaactggg tgccagcgtg 1800

gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta aagcggcggt gcacaatctt 1860

ctcgcgcaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc tggatgacca ggatgccatt 1920

gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc ttgatgtctc tgaccagaca 1980

cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa gacggtacgc gactgggcgt ggagcatctg 2040

gtcgcattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc cattaagttc tgtctcggcg 2100

cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcactcgca atcaaattca gccgatagcg 2160

gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac aaaccatgca aatgctgaat 2220

gagggcatcg ttcccactgc gatgctggtt gccaacgatc agatggcgct gggcgcaatg 2280

cgcgccatta ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata tctcggtagt gggatacgac 2340

gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgttaacca ccatcaaaca ggattttcgc 2400

ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct ctcagggcca ggcggtgaag 2460

ggcaatcagc tgttgcccgt ctcactggtg aaaagaaaaa ccaccctggc gcccaatacg 2520

caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc 2580

cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aatcaatgtg agttagctca ctcattaggc 2640

accccaggct ttacacttta tgcttccgac catactggct taactatgcg gcatcagagc 2700

agattgtact gagagtgcac catcgatgca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 2760

acccctattt gtttatttttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 2820

ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 2880

gtcgccctta ttccctttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg 2940

ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 3000

gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 3060

agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 3120

caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 3180

gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg 3240

agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 3300

gctttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 3360

aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 3420

ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 3480

tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 3540

tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 3600

gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 3660

atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 3720

ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 3780

aaaaggatct aggtgaagat ccttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 3840

ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtt gatgataccg ctgccttact gggtgcatta 3900

gccagtctga atgacctgtc acgggataat ccgaagtggt cagactggaa aatcagaggg 3960

caggaactgc tgaacagcaa aaagtcagat agcaccacat agcagacccg ccataaaacg 4020

ccctgagaag cccgtgacgg gcttttcttg tattatgggt agtttccttg catgaatcca 4080

taaaaggcgc ctgtagtgcc atttaccccc attcactgcc agagccgtga gcgcagcgaa 4140

ctgaatgtca cgaaaaagac agcgactcag gtgcctgatg gtcggagaca aaaggaatat 4200

tcagcgattt gcccgattgc ggccgcaacc gagcttgcga gggtgctact taagccttta 4260

gggttttaag gtctgttttg tagaggagca aacagcgttt gcgacatcct tttgtaatac 4320

tgcggaactg actaaagtag tgagttatac acagggctgg gatctattct ttttatcttt 4380

ttttattctt tctttattct ataaattata accacttgaa tataaacaaa aaaaacacac 4440

aaaggtctag cggaatttac agagggtcta gcagaattta caagttttcc agcaaaggtc 4500

tagcagaatt tacagatacc cacaactcaa aggaaaagga ctagtaatta tcattgacta 4560

gcccatctca attggtatag tgattaaaat cacctagacc aattgagatg tatgtctgaa 4620

ttagttgttt tcaaagcaaa tgaactagcg attagtcgct atgacttaac ggagcatgaa 4680

accaagctaa ttttatgctg tgtggcacta ctcaacccca cgattgaaaa ccctacaagg 4740

aaagaacgga cggtatcgtt cacttataac caatacgttc agatgatgaa catcagtagg 4800

gaaaatgctt atggtgtatt agctaaagca accagagagc tgatgacgag aactgtggaa 4860

atcaggaatc ctttggttaa aggctttgag attttccagt ggacaaacta tgccaagttc 4920

tcaagcgaaa aattagaatt agtttttagt gaagagatat tgccttatct tttccagtta 4980

aaaaaattca taaaatataa tctggaacat gttaagtctt ttgaaaacaa atactctatg 5040

aggatttatg agtggttatt aaaagaacta acacaaaaga aaactcacaa ggcaaatata 5100

gagattagcc ttgatgaatt taagttcatg ttaatgcttg aaaataacta ccatgagttt 5160

aaaaggctta accaatgggt tttgaaacca ataagtaaag atttaaacac ttacagcaat 5220

atgaaattgg tggttgataa gcgaggccgc ccgactgata cgttgatttt ccaagttgaa 5280

ctagatagac aaatggatct cgtaaccgaa cttgagaaca accagataaa aatgaatggt 5340

gacaaaatac caacaaccat tacatcagat tcctacctac ataacggact aagaaaaaca 5400

ctacacgatg ctttaactgc aaaaattcag ctcaccagtt ttgaggcaaa atttttgagt 5460

gacatgcaaa gtaagyatga tctcaatggt tcgttctcat ggctcacgca aaaacaacga 5520

accacactag agaacatact ggctaaatac ggaaggatct gaggttctta tggctcttgt 5580

atctatcagt gaagcatcaa gactaacaaa caaaagtaga acaactgttc accgttacat 5640

atcaaaggga aaactgtcca tacccatggg ctagctgatc agccagtgcc aagcttgctc 5700

aatcaatcac cggatccccc gggaattc 5728

<210> 225

<211> 3736

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pATIU6 plasmid

<400> 225

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaatggatc caaggtcggg 120

caggaagagg gcctatttcc catgattcct tcatatttgc atatacgata caaggctgtt 180

agagagataa ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga 240

cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt gcagttttaa aattatgttt taaaatggac 300

tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg 360

aaaggacgaa actagttttt tctcgagtag ctagagaatt cttaagccag ccccgacacc 420

cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac 480

aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac 540

gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc atgataataa 600

tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gaagcttcgc ggaaccccta 660

tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 720

aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 780

ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga 840

aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 900

acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 960

ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 1020

gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 1080

atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 1140

acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 1200

tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 1260

ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 1320

aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 1380

aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 1440

ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 1500

atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 1560

aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taaaagcttc 1620

tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 1680

aaaggatcta ggtgaagatc ctttatggtg aaggatgcgc cacaggatac tggcgcgcat 1740

acacagcaca tctctttgca ggaaaaaaac gctatgaaaa atgttggttt tatcggctgg 1800

cgcggaatgg tcggctctgt tctcatgcaa cgcatggtag aggagcgcga tttcgacgct 1860

attcgccctg ttttcttttc tacctcccag tttggacagg cggcgcccac cttcggcgac 1920

acctccaccg gcacgctaca ggacgctttt gatctggatg cgctaaaagc gctcgatatc 1980

atcgtgacct gccagggcgg cgattatacc aacgaaattt atccaaagct gcgcgaaagc 2040

ggatggcagg gttactggat tgatgcggct tctacgctgc gcatgaaaga tgatgccatt 2100

attattctcg acccggtcaa ccaggacgtg attaccgacg gcctgaacaa tggcgtgaag 2160

acctttgtgg gcggtaactg taccgttagc ctgatgttga tgtcgctggg cggtctcttt 2220

gcccataatc tcgttgactg ggtatccgtc gcgacctatc aggccgcctc cggcggcggc 2280

gcgcgccata tgcgcgagct gttaacccag atgggtcagt tgtatggcca tgtcgccgat 2340

gaactggcga cgccgtcttc cgcaattctt gatattgaac gcaaagttac ggcattgacc 2400

cgcagcggcg agctgccggt tgataacttt ggcgtaccgc tggcgggaag cctgatcccc 2460

tggatcgaca aacagctcga taacggccag agccgcgaag agtggaaagg ccaggcggaa 2520

accaacaaga ttctcaatac tgcctctgtg attccggttg atggtttgtg tgtgcgcgtc 2580

ggcgcgctgc gctgtcacag ccaggcgttc accatcaagc tgaaaaaaga ggtatccatt 2640

ccgacggtgg aagaactgct ggcggcacat aatccgtggg cgaaagtggt gccgaacgat 2700

cgtgatatca ctatgcgcga attaaccccg gcggcggtga ccggcacgtt gactacgccg 2760

gttggtcgtc tgcgtaagct gaacatgggg ccagagttct tgtcggcgtt taccgtaggc 2820

gaccagttgt tatggggcgc cgccgagccg ctgcgtcgaa tgctgcgcca gttggcgtag 2880

ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 2940

ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct 3000

tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 3060

ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag 3120

tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 3180

tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 3240

actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 3300

cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 3360

gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 3420

tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 3480

ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 3540

ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc 3600

cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 3660

cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 3720

gcgaggaagc ggaaga 3736

<210> 226

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APR-001 Kan PrimerF

<400> 226

aaaaaagctt gcagctctgg cccgtg 26

<210> 227

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APR-002 Kan PrimerR

<400> 227

aaaaaagctt ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatga 38

<210> 228

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APR-003 pATI ori T148CF

<400> 228

acactagaag gacagtattt ggtatctg 28

<210> 229

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APR-004 pATI ori T148CR

<400> 229

agccgtagtt aggccacc 18

<210> 230

<211> 3203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> pSL0147 plasmid

<400> 230

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920

ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980

cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040

cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100

acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160

cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220

accatgatta cgccaagctc ggcgcgccat tgggatggaa cgcgttatcg gcaatctgga 2280

ggcaaagttt aatgataatt ttgcaaaaat aatgcgcgga ataatgatgc ataaagcggc 2340

tatttcgccg cctaagaaaa agatcggggg aagtgaaaaa ttttctaaag ttcgaaattc 2400

aggtgccgat acaagggtta cggtgagaaa ccgtgggcaa cagcccaata acatcaagtt 2460

gtaattgata aggaaaagat catgggctag cctcaataag cttcttgcct ttctgcagac 2520

caaggaccca gattatgttg cagcaggccg gtacctccgt tctggcgcag gcgaaccagg 2580

ttccgcaaaa cgtcctctct ttactgcgtt aatccggcga ttgattcacc gacacgtggt 2640

acacaatcaa ggcagcgaaa gctgcctttt ttaattccgg agcctgtgta atgaaagaaa 2700

tcaccgtcac tgaacctgcc tttgtcaccc gcttttcctg ttctggctcg gcctgtcgcg 2760

accactgttg taagggctgg aaagttccat cccaatacgc gtcaattcac tggccgtcgt 2820

tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca 2880

tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 2940

gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg 3000

cggtatttca caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 3060

aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 3120

ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 3180

accgtcatca ccgaaacgcg cga 3203

<210

> 231

<211> 3196

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pSL0148 plasmid

<400> 231

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

ggggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
accatgatta cgccaagctc ggcgcgccat tgggatggaa cttccagacg acaagagtat 2280

cgcctttatt tacatacttt aacgctcgtt tcaggccggg gcggtttgca atcttgccac 2340
tgatacggtc ctcaaaaatg cggtcacaat ttgcactagt aagcgcatta cgctgtaaat 2400
cgatattttg gtcaattgtt gacacccgaa tatacccaat agtagccatg attttctcct 2460
ttacatcaga taaggaagaa ttttagtcgc ttttctcatg gaggattgct gctagcctca 2520
ataagcttct tgcctttctg cagaccaagg acccagatta tgtatggaat gtatggctgt 2580
aaatgatatt tcctacgggc gagaagctga aatatggccg cgggattatt ctatgcttgc 2640
tcgtcgagtt caatttctac gttttaatga tatccctgtt cgattggtga gtaataatgc 2700
ccggataatc acaggctaca ttgcgaagtt taatccgaag gaaaatttga ttctggcttc 2760

ggataaacct aaaggagttc catcccaata cgcgtcaatt cactggccgt cgttttacaa 2820
cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc 2880
ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 2940
agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 3000
tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag 3060
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 3120
gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 3180
tcaccgaaac gcgcga 3196

<210> 232
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> flic-1 primer

<400> 232

cgttatcggc aatctggagg c 21

<210> 233

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> flic-2 primer

<400> 233

ccagccctta caacagtggt c 21

<210> 234

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> flic-3 primer

<400> 234

gtctgtcaac aactggtcta acgg 24

<210> 235

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> flic-4 primer

<400> 235

agacggtcct catccagata agg 23

<210> 236

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fljb-1 primer sequence

<400> 236

ttccagacga caagagtatc gc 22

<210> 237

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fljb-2 primer

<400> 237

cctttaggtt tatccgaagc cagaatc 27

<210> 238

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fljb-3 primer

<400> 238

caccaggttt ttcacgctgc 20

<210> 239

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fljb-4 primer

<400> 239

acacgcattt acgcctgtcg 20

<210> 240

<211> 1518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cytoLLO ORF

<400> 240

atgaaagacg cctccgcgtt taacaaggag aactccatca gctccatggc cccgcccgct 60

tccccgccgg cgagccctaa aaccccgatc gagaaaaagc acgccgacga gattgacaaa 120

tatattcaag gtttagacta caataagaac aacgtgctgg tgtatcacgg cgatgcggtg 180

accaatgttc cgccgcgcaa gggctacaaa gatggtaacg aatatatcgt ggttgagaaa 240

aagaaaaaaa gcatcaacca gaacaacgcc gatatccaag ttgtgaacgc catcagctct 300

ttaacctatc cgggcgcgct ggtgaaagcc aacagcgaac tggtggaaaa ccagcccgat 360

gtgctgccgg tgaaacgcga ttctttaacg ctgagcattg atttaccggg catgacgaac 420

caagataaca aaatcgtggt gaagaacgcg accaagtcca acgtgaacaa cgcggtgaac 480

acgctggtgg aacgctggaa cgaaaaatac gcccaagctt acccgaacgt gagcgcgaag 540

attgactacg acgacgaaat ggcctacagc gagagccagc tgatcgcgaa attcggcacc 600

gcgttcaaag cggtgaacaa ctctttaaac gtgaactttg gcgcgatcag cgaaggcaaa 660

atgcaagaag aggtgatcag ctttaaacaa atctattata acgtgaatgt taacgagccg 720

acgcgtccga gccgcttttt cggcaaagcg gtgacgaagg aacagctgca agcgcttggc 780

gtgaacgcgg aaaaccctcc ggcctatatt tccagcgtgg cgtatggccg ccaagtttat 840

ctgaagctga gcacgaacag ccacagcacc aaagttaagg cggcctttga tgcggcggtg 900

agcggcaaaa gcgttagcgg cgacgttgag ctgacgaaca tcatcaagaa cagctccttt 960

aaagcggtga tctatggcgg tagcgcgaaa gacgaagtgc agatcatcga cggcaattta 1020

ggtgatctgc gcgatatttt aaaaaagggc gccaccttca accgtgagac gcccggtgtg 1080

ccgatcgcct acaccaccaa ctttttaaag gataacgagc tggccgtgat caaaaacaat 1140

tccgaatata tcgaaaccac gagcaaggcg tataccgatg gcaagatcaa cattgaccac 1200

agcggtggct atgtggcgca gttcaacatc agctgggatg aagtgaacta tgatccggag 1260

ggcaacgaga tcgtgcagca caagaactgg tccgagaaca acaaatccaa gctggcgcat 1320

ttcaccagca gcatctatct gccgggcaac gcgcgcaaca ttaatgtgta cgcgaaagag 1380

tgcacgggtc ttgcgtggga atggtggcgc accgtgatcg atgatcgcaa tttaccgctg 1440

gtgaaaaacc gcaacatctc catctggggc accactttat acccgaaata ttccaacaaa 1500

gttgataacc ctattgag 1518

<210> 241

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LLO promoter

<400> 241

attatgtctt gacatgtagt gagtgggctg gtataatgca gcaag 45

<210> 242

<211> 1176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Asd Gene ORF

<400> 242

ctacgccaac tggcgcagca ttcgacgcag cggctcggcg gcgccccata acaactggtc 60

gcctacggta aacgccgaca agaactctgg ccccatgttc agcttacgca gacgaccaac 120

cggcgtagtc aacgtgccgg tcaccgccgc cggggttaat tcgcgcatag tgatatcacg 180

atcgttcggc accactttcg cccacggatt atgtgccgcc agcagttctt ccaccgtcgg 240

aatggatacc tctttttca gcttgatggt gaacgcctgg ctgtgacagc gcagcgcgcc 300

gacgcgcaca cacaaaccat caaccggaat cacagaggca gtattgagaa tcttgttggt 360

ttccgcctgg cctttccact cttcgcggct ctggccgtta tcgagctgtt tgtcgatcca 420

ggggatcagg cttcccgcca gcggtacgcc aaagttatca accggcagct cgccgctgcg 480

ggtcaatgcc gtaactttgc gttcaatatc aagaattgcg gaagacggcg tcgccagttc 540

atcggcgaca tggccataca actgacccat ctgggttaac agctcgcgca tatggcgcgc 600

gccgccgccg gaggcggcct gataggtcgc gacggatacc cagtcaacga gattatgggc 660

aaagagaccg cccagcgaca tcaacatcag gctaacggta cagttaccgc ccacaaaggt 720

cttcacgcca ttgttcaggc cgtcggtaat cacgtcctgg ttgaccgggt cgagaataat 780

aatggcatca tctttcatgc gcagcgtaga agccgcatca atccagtaac cctgccatcc 840

gctttcgcgc agctttggat aaatttcgtt ggtataatcg ccgccctggc aggtcacgat 900

gatatcgagc gcttttagcg catccagatc aaaagcgtcc tgtagcgtgc cggtggaggt 960

gtcgccgaag gtgggcgccg cctgtccaaa ctgggaggta gaaaagaaaa cagggcgaat 1020

agcgtcgaaa tcgcgctcct ctaccatgcg ttgcatgaga acagagccga ccattccgcg 1080

ccagccgata aaaccaacat ttttcatagc gtttttttcc tgcaaagaga tgtgctgtgt 1140

atgcgcgcca gtatcctgtg gcgcatcctt caccat 1176

<210> 243

<211> 589

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pBR322 Origin

<400> 243

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 60

agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 120

cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 180

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 240

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 300

ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 360

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 420

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 480

gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 540

tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa 589

<210> 244

<211> 3269

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pEQU6 shSCR

<400> 244

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240

tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300

gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360

acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480

gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540

aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600

ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720

tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780

gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840

aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900

ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960

agcaacaaga tgaagagcac caattctaga gattggtgct cttcatcttg ttgttttttc 1020

gagtagctag agaattcatg gtaatagcga tgactaatac gtagatgtac tgccaagtag 1080

gaaagtccca taaggtcatg tactgggcat aatgccaggc gggccattta ccgtcattga 1140

cgtcaatagg gggcgtactt ggcatatgat acacttgatg tactgccaag tgggcagttt 1200

accgtaaata gtccacccat tgacgtcaat ggaaagtccc tattggcgtt actatgggaa 1260

catacgtcat tattgacgtc aatgggcggg ggtcgttggg cggtcagcca ggcgggccat 1320

ttaccgtaag ttatgtaacg cggaactcca tatatgggct atgaactaat gaccccgtaa 1380

ttgattacta ttaataacta gacccagctt tcttgtacaa agttggcatt ataagaaagc 1440

attgcttatc aatttgttgc aacgaacagg tcactatcag tcaaaataaa atcattattt 1500

gccatccagc tgatatcccc tatagtgagt cgtattacat ggtcatagct gtttcctggc 1560

agctctggcc cgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat 1620

catgaacaat aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata 1680

ttcaacggga aacgtcgagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt 1740

ataaatgggc tcgcgataat gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcgc ttgtatggga 1800

agcccgatgc gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta 1860

cagatgagat ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc 1920

attttatccg tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc ggaaaaacag 1980

cattccaggt attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag 2040

tgttcctgcg ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg 2100

tatttcgtct cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt 2160

ttgatgacga gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt 2220

tgccattctc accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcacttgat aaccttattt 2280

ttgacgaggg gaaattaata ggttgtattg atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat 2340

accaggatct tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac 2400

ggctttttca aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga 2460

tgctcgatga gtttttctaa tcagaattgg ttaattggtt gtaacactgg cagagcatta 2520

cgctgacttg acgggacggc gcaagctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttacgcgt 2580

cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 2640

ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 2700

tgccggatca agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 2760

taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 2820

caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 2880

agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 2940

gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 3000

gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3060

ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 3120

acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 3180

tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac 3240

ggttcctggc cttttgctgg ccttttgct 3269

<210> 245

<211> 4642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> pATI2.0 U6-H1 Plasmid

<400> 245

accggtctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 60

agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca accggtcttg cacctcagca 120

aaaggccatc cgtcaggatg gccttctgct tagtttgatg cctggcagtt tatggcgggc 180

gtcctgcccg ccaccctccg ggccgttgct tcacaacgtt caaatccgct cccggcggat 240

ttgtcctact caggagagcg ttcaccgaca aacaacagat aaaacgaaag gcccagtctt 300

ccgactgagc ctttcgtttt atttgggccg gccatgcctg gcagttccct actctcgcgt 360

taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttctta agctcgggcc cttaaaggaa 420

ccaattcagt cgagaattac tagtggtacc atatttgcat gtcgctatgt gttctgggaa 480

atcaccataa acgtgaaatg tctttggatt tgggaatctt ataagttctg tatgagacca 540

ctccctaggt ttttgtcgac agatctggcg cgccgactac caaaatgact tcggatatga 600

ccattatggt gcccgacttc gtaatttacg cgtacccatt tggatgacgg tgcgtccatg 660

tttgttctgc atgcctgaga tagtaaggcc gacccccaac aatccacaag gccacgattg 720

acacatgagg ttccttttte aaacctgaac ctttagttca cacaggtggc tgcgccgccg 780

tgaatggtgg cagtagttac ttctaatcaa gctcaatccc tcggctctga agaggacata 840

gtagacctca tctggtcttt cgactacggg gggtaacaga tgtcggtggt ataacaatcc 900

tccacgagat catttcacgt aagcatgact tttacaccta tcggaatcat ataactgtta 960

ggcaatggtt tatgattggg cgacagacgt cagatcggcg aacctttacg tagccccccg 1020

ttcatctaga caggaagagg gcctatttcc catgattcct tcatatttgc atatacgata 1080

caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca 1140

aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt gcagttttaa aattatgttt 1200

taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat ttcgatttct tggctttata 1260

tatcttgtgg aaaggacgaa acttgttttt tctcgagtag ctagagaatt cgtcgacgga 1320

actccatata tgggctatga actaatgacc ccgtaattga ttactattaa taactagcca 1380

tccagctgat atccgccggc gctgcagcta cgccaactgg cgcagcattc gacgcagcgg 1440

ctcggcggcg ccccataaca actggtcgcc tacggtaaac gccgacaaga actctggccc 1500

catgttcagc ttacgcagac gaccaaccgg cgtagtcaac gtgccggtca ccgccgccgg 1560

ggttaattcg cgcatagtga tatcacgatc gttcggcacc actttcgccc acggattatg 1620

tgccgccagc agttcttcca ccgtcggaat ggatacctct tttttcagct tgatggtgaa 1680

cgcctggctg tgacagcgca gcgcgccgac gcgcacacac aaaccatcaa ccggaatcac 1740

agaggcagta ttgagaatct tgttggtttc cgcctggcct ttccactctt cgcggctctg 1800

gccgttatcg agctgtttgt cgatccaggg gatcaggctt cccgccagcg gtacgccaaa 1860

gttatcaacc ggcagctcgc cgctgcgggt caatgccgta actttgcgtt caatatcaag 1920

aattgcggaa gacggcgtcg ccagttcatc ggcgacatgg ccatacaact gacccatctg 1980

ggttaacagc tcgcgcatat ggcgcgcgcc gccgccggag gcggcctgat aggtcgcgac 2040

ggatacccag tcaacgagat tatgggcaaa gagaccgccc agcgacatca acatcaggct 2100

aacggtacag ttaccgccca caaaggtctt cacgccattg ttcaggccgt cggtaatcac 2160

gtcctggttg accgggtcga gaataataat ggcatcatct ttcatgcgca gcgtagaagc 2220

cgcatcaatc cagtaaccct gccatccgct ttcgcgcagc tttggataaa tttcgttggt 2280

ataatcgccg ccctggcagg tcacgatgat atcgagcgct tttagcgcat ccagatcaaa 2340

agcgtcctgt agcgtgccgg tggaggtgtc gccgaaggtg ggcgccgcct gtccaaactg 2400

ggaggtagaa aagaaaacag ggcgaatagc gtcgaaatcg cgctcctcta ccatgcgttg 2460

catgagaaca gagccgacca ttccgcgcca gccgataaaa ccaacatttt tcatagcgtt 2520

tttttcctgc aaagagatgt gctgtgtatg cgcgccagta tcctgtggcg catccttcac 2580

cataaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa 2640

gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtc tgcaggatat cccatgggca ttggcgcaga 2700

aaaaaatgcc tgatgcgacg ctgcgcgtct tatactccca catatgccag attcagcaac 2760

ggatacggct tccccaactt gcccacttcc atacgtgtcc tccttaccag aaatttatcc 2820

ttaaccatgg aagctttgca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2880

caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2940

aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 3000

gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 3060

atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 3120

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 3180

cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 3240

gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 3300

attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 3360

ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 3420

ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 3480

aaagaaatgc ataaacttttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 3540

tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 3600

gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3660

tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3720

aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaaa gctttcagaa ttggttaatt 3780

ggttgtaaca ctggcagagc attacgctga cttgacggga cggcgcaagc tcatggatcc 3840

caattggcgg ccgcttaatt aaacatgtga gctcgatgta cattcgaagg accccaaaat 3900

cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 3960

gatcttcatc gatttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 4020

aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 4080

aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt 4140

taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 4200

taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 4260

agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 4320

tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 4380

cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 4440

agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 4500

gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga 4560

aaatcgattc cggaaacgcc aggctcttcc aacgcggcct ttttacggtt gaagagccct 4620

ggccttttgc tggccttttg ct 4642

<210

> 246

<211> 1261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ASD gene orf + 85 bp upstream

<400> 246

ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 60

aaaaggatct aggtgaagat cctttatggt gaaggatgcg ccacaggata ctggcgcgca 120

tacacagcac atctctttgc aggaaaaaaa cgctatgaaa aatgttggtt ttatcggctg 180

gcgcggaatg gtcggctctg ttctcatgca acgcatggta gaggagcgcg atttcgacgc 240

tattcgccct gttttctttt ctacctccca gtttggacag gcggcgccca ccttcggcga 300

cacctccacc ggcacgctac aggacgcttt tgatctggat gcgctaaaag cgctcgatat 360

catcgtgacc tgccagggcg gcgattatac caacgaaatt tatccaaagc tgcgcgaaag 420

cggatggcag ggttactgga ttgatgcggc ttctacgctg cgcatgaaag atgatgccat 480

tattattctc gacccggtca accaggacgt gattaccgac ggcctgaaca atggcgtgaa 540

gacctttgtg ggcggtaact gtaccgttag cctgatgttg atgtcgctgg gcggtctctt 600

tgcccataat ctcgttgact gggtatccgt cgcgacctat caggccgcct ccggcggcgg 660

cgcgcgccat atgcgcgagc tgttaaccca gatgggtcag ttgtatggcc atgtcgccga 720

tgaactggcg acgccgtctt ccgcaattct tgatattgaa cgcaaagtta cggcattgac 780

ccgcagcggc gagctgccgg ttgataactt tggcgtaccg ctggcgggaa gcctgatccc 840

ctggatcgac aaacagctcg ataacggcca gagccgcgaa gagtggaaag gccaggcgga 900

aaccaacaag attctcaata ctgcctctgt gattccggtt gatggtttgt gtgtgcgcgt 960

cggcgcgctg cgctgtcaca gccaggcgtt caccatcaag ctgaaaaaag aggtatccat 1020

tccgacggtg gaagaactgc tggcggcaca taatccgtgg gcgaaagtgg tgccgaacga 1080

tcgtgatatc actatgcgcg aattaacccc ggcggcggtg accggcacgt tgactacgcc 1140

ggttggtcgt ctgcgtaagc tgaacatggg gccagagttc ttgtcggcgt ttaccgtagg 1200

cgaccagttg ttatggggcg ccgccgagcc gctgcgtcga atgctgcgcc agttggcgta 1260

g 1261

<210> 247

<211> 4112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pATI2.0 synthetic v26 scramble pBR322ori.dna

<400> 247

accggtctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 60

agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca accggtcttg cacctcagca 120

aaaggccatc cgtcaggatg gccttctgct tagtttgatg cctggcagtt tatggcgggc 180

gtcctgcccg ccaccctccg ggccgttgct tcacaacgtt caaatccgct cccggcggat 240

ttgtcctact caggagagcg ttcaccgaca aacaacagat aaaacgaaag gcccagtctt 300

ccgactgagc ctttcgtttt atttgggccg gccatgcctg gcagttccct actctcgcgt 360

taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttctta agctcgggcc cttaaaggaa 420

ccaattcagt cgagaattac tagtggtacc caggaagagg gcctatttcc catgattcct 480

tcatatttgc atatacgata caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta 540

aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt 600

gcagttttaa aattatgttt taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat 660

ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg aaaggacgaa actagcaaca agatgaagag 720

caccaattct agagattggt gctcttcatc ttgttgtttt tctcgagtag ctagagaatt 780

cgtcgacgga actccatata tgggctatga actaatgacc ccgtaattga ttactattaa 840

taactagcca tccagctgat atccgccggc gctgcagcta cgccaactgg cgcagcattc 900

gacgcagcgg ctcggcggcg ccccataaca actggtcgcc tacggtaaac gccgacaaga 960

actctggccc catgttcagc ttacgcagac gaccaaccgg cgtagtcaac gtgccggtca 1020

ccgccgccgg ggttaattcg cgcatagtga tatcacgatc gttcggcacc actttcgccc 1080

acggattatg tgccgccagc agttcttcca ccgtcggaat ggatacctct tttttcagct 1140

tgatggtgaa cgcctggctg tgacagcgca gcgcgccgac gcgcacacac aaaccatcaa 1200

ccggaatcac agaggcagta ttgagaatct tgttggtttc cgcctggcct ttccactctt 1260

cgcggctctg gccgttatcg agctgtttgt cgatccaggg gatcaggctt cccgccagcg 1320

gtacgccaaa gttatcaacc ggcagctcgc cgctgcgggt caatgccgta actttgcgtt 1380

caatatcaag aattgcggaa gacggcgtcg ccagttcatc ggcgacatgg ccatacaact 1440

gacccatctg ggttaacagc tcgcgcatat ggcgcgcgcc gccgccggag gcggcctgat 1500

aggtcgcgac ggatacccag tcaacgagat tatgggcaaa gagaccgccc agcgacatca 1560

acatcaggct aacggtacag ttaccgccca caaaggtctt cacgccattg ttcaggccgt 1620

cggtaatcac gtcctggttg accgggtcga gaataataat ggcatcatct ttcatgcgca 1680

gcgtagaagc cgcatcaatc cagtaaccct gccatccgct ttcgcgcagc tttggataaa 1740

tttcgttggt ataatcgccg ccctggcagg tcacgatgat atcgagcgct tttagcgcat 1800

ccagatcaaa agcgtcctgt agcgtgccgg tggaggtgtc gccgaaggtg ggcgccgcct 1860

gtccaaactg ggaggtagaa aagaaaacag ggcgaatagc gtcgaaatcg cgctcctcta 1920

ccatgcgttg catgagaaca gagccgacca ttccgcgcca gccgataaaa ccaacatttt 1980

tcatagcgtt tttttcctgc aaagagatgt gctgtgtatg cgcgccagta tcctgtggcg 2040

catccttcac cataaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa 2100

tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtc tgcaggatat cccatgggca 2160

ttggcgcaga aaaaaatgcc tgatgcgacg ctgcgcgtct tatactccca catatgccag 2220

attcagcaac ggatacggct tccccaactt gcccacttcc atacgtgtcc tccttaccag 2280

aaatttatcc ttaaccatgg aagctttgca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg 2340

ttacattgca caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa 2400

cagtaataca aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa 2460

ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc 2520

aggtgcgaca atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca 2580

tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac 2640

ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt 2700

actcaccact gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc 2760

aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt 2820

ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat 2880

gaataacggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga 2940

acaagtctgg aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca 3000

tggtgatttc tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga 3060

tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct 3120

cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc 3180

tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaaa gctttcagaa 3240

ttggttaatt ggttgtaaca ctggcagagc attacgctga cttgacggga cggcgcaagc 3300

tcatggatcc caattggcgg ccgcttaatt aaacatgtga gctcgatgta cattcgaagg 3360

accccaaaat cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 3420

aagatcaaag gatcttcatc gatttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg 3480

caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 3540

ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 3600

tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg 3660

ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 3720

tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 3780

cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 3840

gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 3900

ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 3960

gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg 4020

agcctatgga aaatcgattc cggaaacgcc aggctcttcc aacgcggcct ttttacggtt 4080

gaagagccct ggccttttgc tggccttttg ct 4112

<210

> 248

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> miR-16-2

<400> 248

ccggatcaac gccctaggtt tatgtttgga tgaactgaca tacttgttcc actctagcag 60

cacgtaaata ttggcgtagt gaaatatata ttaaacacca atattactgt gctgctttag 120

tgtgacaggg atacagcaac tattttatca attgtttgcg tcgac 165

<210> 249

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (55)...(75)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (97)...(117)

<223> n may be any nucleotide

<220>

<221> source

<222> (1)...(165)

<223> microRNA backbone where Ns represent inserted
anti-sense and sense microRNAs

<400> 249

ccggatcaac gccctaggtt tatgtttgga tgaactgaca tacgcgtatc cgtcnnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnnnngtagt gaaatatata ttaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnntac 120

ggtaacgcgg aattcgcaac tattttatca atttttgcg tcgac 165

<210> 250

<211> 708

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> endA

<400> 250

atgtaccgta atttctcttt tgccgctgtg ttgctggccg cagcgttttc aggccaggcc 60

ctggccgatg gcattaacaa tttttctcag gccaaagcgg cgagcgtcaa agtcaatgct 120

gacgcgcccg gcagctttta ctgcgggtgc caaatccgct ggcagggtaa aaaaggcgtc 180

gtagacctgg agtcctgcgg ctataaggtg cgtaaaaacg agaatcgcgc cagacgcatt 240

gagtgggagc acgttgtccc cgcctggcaa ttcggtcatc agcgccagtg ctggcaggac 300

ggcgggcgaa aaaactgcgc taaagacccg gtctaccgca aaatggaaag cgatatgcat 360

aacctgcaac ccgcgattgg cgaagtgaat ggcgatcgcg gcaactttat gtatagccag 420

tggaacggcg gcgaaggtca gtacgggcag tgcgccatga aagtagattt caaagcgaag 480

ctcgccgagc cgcccgcccg cgcccgtggc gcaatcgccc gcacttattt ttatatgcgc 540

gaccaatacc aactgaaact ttcccgccaa caaacgcagc tttttaacgt ctgggataag 600

cagtaccccg ttaccgcctg ggagtgcgag cgcgatgcgc gtatcgcgaa ggtccagggt 660

aatcataatc cctatgtgca acgcgcttgc caggcgcgaa agagctaa 708

<210> 251

<211> 235

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> endonuclease I (encoded by endA)

<400> 251

Met Tyr Arg Asn Phe Ser Phe Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Phe

1 5 10 15

Ser Gly Gln Ala Leu Ala Asp Gly Ile Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys

20 25 30

Ala Ala Ser Val Lys Val Asn Ala Asp Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Cys

35 40 45

Gly Cys Gln Ile Arg Trp Gln Gly Lys Lys Gly Val Val Asp Leu Glu

50 55 60

Ser Cys Gly Tyr Lys Val Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Arg Arg Ile

65 70 75 80

Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln

85 90 95

Cys Trp Gln Asp Gly Gly Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr

100 105 110

Arg Lys Met Glu Ser Asp Met His Asn Leu Gln Pro Ala Ile Gly Glu

115 120 125

Val Asn Gly Asp Arg Gly Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly

130 135 140

Glu Gly Gln Tyr Gly Gln Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Ala Lys

145 150 155 160

Ile Ala Glu Pro Pro Ala Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Ile Tyr

165 170 175

Phe Tyr Met Arg Asp Gln Tyr Gln Leu Lys Leu Ser Arg Gln Gln Thr

180 185 190

Gln Leu Phe Asn Val Trp Asp Lys Gln Tyr Pro Val Thr Ala Trp Glu

195 200 205

Cys Glu Arg Asp Ala Arg Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro

210 215 220

Tyr Val Gln Arg Ala Cys Gln Ala Arg Lys Ser

225 230 235

<210> 252

<211> 78

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> microRNA-103a1 (miR-103a1)

<400> 252

tactgccctc ggcttcttta cagtgctgcc ttgttgcata tggatcaagc agcattgtac 60

agggctatga aggcattg 78

<210> 253

<211> 71

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> microRNA-30a (miR-30a)

<400

> 253

gcgactgtaa acatcctcga ctggaagctg tgaagccaca gatgggcttt cagtcggatg 60

tttgcagctg c 71

<210> 254

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pMB1 origin of replication

<400> 254

aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 60

ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag 120

gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgta gccgtagtta 180

ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 240

ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 300

ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg 360

gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 420

cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag 480

cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 540

cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 600

aacgccagca acgcg 615

<210> 255

<211> 913

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p15A origin of replication

<400> 255

gcgctagcgg agtgtatact ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg 60

cttcatgtgg caggagaaaa aaggctgcac cggtgcgtca gcagaatatg tgatacagga 120

tatattccgc ttcctcgctc actgactcgc tacgctcggt cgttcgactg cggcgagcgg 180

aaatggctta cgaacggggc ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg 240

aagtgagagg gccgcggcaa agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca 300

cgaaatctga cgctcaaatc agtggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 360

gtttcccct ggcggctccc tcgtgcgctc tcctgttcct gcctttcggt ttaccggtgt 420

cattccgctg ttatggccgc gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg 480

cagttcgctc caagctggac tgtatgcacg aaccccccgt tcagtccgac cgctgcgcct 540

tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag 600

cagccactgg taattgattt agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa 660

actgaaagga caagttttgg tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag 720

ttggtagctc agagaacctt cgaaaaaccg ccctgcaagg cggtttttc gttttcagag 780

caagagatta cgcgcagacc aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa 840

tatttctaga tttcagtgca atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata 900

cgatataagt tgt 913

<210> 256

<211> 223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pSC101 origin of replication

<400> 256

gagttataca cagggctggg atctattctt tttatctttt tttattcttt ctttattcta 60

taaattataa ccacttgaat ataaacaaaa aaaacacaca aaggtctagc ggaatttaca 120

gagggtctag cagaatttac aagttttcca gcaaaggtct agcagaattt acagataccc 180

acaactcaaa ggaaaaggac tagtaattat cattgactag ccc 223

<210> 257

<211> 602

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> ColE1 origin of replication

<400> 257

aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 60

accgctacca acggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 120

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagtcggg 180

ccactacttc aagaactctg tagcaccgtt tgtgccatca tcgctctgct aatccggtta 240

ccagtggctg ctgccagtgg cgttaaggcg tgccttaccg ggttggactc aagacgatag 300

ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt cgtgcacaca gcccagcttg 360

gagcgaacga cctacaccga actgagatac caacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 420

cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag 480

cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 540

cacctctgac ttgagcgtct atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 600

aa 602

<210> 258

<211> 201

<212> DNA

<213> Pseudomonas syringae

<220>

<223> pPS10 origin of replication

<400> 258

acctgaccgg cgcggaagcg ctcttgatct ttttttcttg tttttacttg ttgttccttg 60

ttttcgtaat tttaactata tgatttataa gaaaaaaaag ggtttaaagg ggacagattc 120

agggtttaaa ggggacagat tcagggttta aaggggacag attcagggtt taaaggggac 180

agattcaggc tgatatccac a 201

<210> 259

<211> 617

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> RK2 origin of replication

<400> 259

ccgggctggt tgccctcgcc gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca aacgcgccag 60

aaacgccgtc gaagccgtgt gcgagacacc gcggccgccg gcgttgtgga taccacgcgg 120

aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga cacttgaggg gccgactcac 180

ccggcgcggc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttcg gccggcgacg tggagctggc 240

cagcctcgca aatcggcgaa aacgcctgat tttacgcgag tttcccacag atgatgtgga 300

caagcctggg gataagtgcc ctgcggtatt gacacttgag gggcgcgact actgacagat 360

gaggggcgcg atccttgaca cttgaggggc agagtgatga cagatgaggg gcgcacctat 420

tgacatttga ggggctgtcc acaggcagaa aatccagcat ttgcaagggt ttccgcccgt 480

ttttcggcca ccgctaacct gtcttttaac ctgcttttaa accaatattt ataaaccttg 540

tttttaacca gggctgcgcc ctggcgcgtg accgcgcacg ccgaaggggg gtgccccccc 600

ttctcgaacc ctcccgg 617

<210> 260

<211> 639

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> R6K alpha origin of replication

<400> 260

tcttacttct ttgcgtagct gttaaataca gcgttgtttt gataaaatca tcattatcat 60

cgataatgct ttcttcaatt tttttatcct tactctttaa taaagcactt gctaataact 120

tcataccttt tgcaactgtc aaatttggtt catcagggta aatgctttta aggcatacta 180

acaaataatc atggtcttca tcttcaactc taaactgaat ttttttcatc ataactccca 240

acaagaaccg actgtaggtc accgggcaaa cgctgaaaaa taacgtcgaa tgacgtcatt 300

ttgcggcgtt tgccctatcc tgcatcgcag tagaaaatgc cacaactgaa attgtgcttc 360

agtatgtaca gaaatgcaaa atctgaggga tttcgtagct gaaagatcgc cagtcttcga 420

ccgtaaggat aggagttgct gtaagacctg tgcggggcgt tcgcttcgcg aacgggtctg 480

gcaggggggca caagcgctgt gctgtgatat atgcaaaaga agccacccac gaacgggagg 540

gcttcggcga atcgactata gtgatctatt tacccggctg attgtcgcct tctagccctc 600

gcgggcatca tgcaaccagt gcctgaattt agttatatg 639

<210> 261

<211> 1027

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> R6K beta origin of replication

<400> 261

tgaagctttt tttatgaatt tatctgaagc tgatgcagct tttctcaagg tatttgatga 60

aaccgtacct cccaaaaaag ctaaggggtg atatatggct aaaatttacg atttccctca 120

aggagccgaa cgccgcagga tgcaccgcaa aatccagtgg aacaacgctg taaaattatc 180

taaaaatggc tggagtaagc cagaggttaa acgctggtct tttttagcat tcatctcaac 240

tggctggtat tactttcgcc tttcggtagc agtcattttc catatcatta ctatttgtgg 300

tttagctgtg ctcgcggcgt taagcaatac gatattctgg attggtggcg cgatatgtct 360

tgtaacctgg tatacaaatg accatcaaat ttggagtact aacaatctta ctatccctat 420

tgttttcgga ctttgggtgt taagtttagt agctgcacca ctcatagatt ttttcagtca 480

aaaattgccc ttttatcgtc ttcttgtgcc tgatgcgaag cgtgaggaag tgggcgaaga 540

tgattcttaa agccctgccc tgtacggctt taacgccttc tcgcggtaga tctatggatg 600

ttgagaatgt agtatggtta tactgcgatg caggataggg caaacgccgt aaaatgacgt 660

ctttgacgtt atttttcagc gcttgcccgg tgacctacag tcggtgcttg ttgggagatt 720

ttatgaagtt tactagtaaa ggattttatc agtgataaat atgcaaaggc tattaacatt 780

ttaaatgata accttaaaga aaactactat gtttttttatg gtgtaaggtt aagtgaaatt 840

ctttttcctg caagtgatta tggtacagat gatttttttta aggagtttga ggaaataaac 900

aacgttacct tgcctttagt tgtttttgaa ataaatgaac gtgaacctgt gattgtaatt 960

ggttttgatg aaataaatcc tgcgattctt atagagaaat ccggtataaa ggttttagta 1020

atcggac 1027

<210> 262

<211> 442

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> R6K gamma origin of replication

<400> 262

gatcgctagt ttgttttgac tccatccatt agggcttcta aaacgccttc taaggccatg 60

tcagccgtta agtgttcctg tgtcactgaa aattgctttg agaggctcta agggcttctc 120

agtgcgttac atccctggct tgttgtccac aaccgttaaa ccttaaaagc tttaaaagcc 180

ttatatattc ttttttttct tataaaactt aaaaccttag aggctattta agttgctgat 240

ttatattaat tttattgttc aaacatgaga gcttagtacg tgaaacatga gagcttagta 300

cgttagccat gagagcttag tacgttagcc atgagggttt agttcgttaa acatgagagc 360

ttagtacgtt aaacatgaga gcttagtacg tgaaacatga gagcttagta cgtactatca 420

acaggttgaa ctgctgatct tc 442

<210> 263

<211> 242

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<220>

<223> P1 origin of plasmid replication oriR

<400> 263

tttcccgtca acacacatcc tatatcccgc cagcacacat tagcaacccg tcagcacaca 60

tttttatccc tccagcacac atcgttttcc ctccagcaca catcgcgata cacttctaag 120

ccagacgtgg cgcggcctgc aacgatcagg gatctatatg gatctaattg ggatctgtat 180

ggacctgatt attggatcta tccagtggat aatgtggata agtgaaaaac cggccaacgt 240

ag 242

<210> 264

<211> 792

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> R1 origin of replication

<400> 264

ttatccacat ttaactgcaa gggacttccc cataaggtta caaccgttca tgtcataaag 60

cgccagccgc cagtcttaca gggtgcaatg tatcttttaa acacctgttt atatctcctt 120

taaactactt aattacattc atttaaaaag aaaacctatt cactgcctgt cctgtggaca 180

gacagatatg cacctcccac cgcaagcggc gggccccgac cggagccact ttagttacaa 240

cacacaaaaa caacctccag aaaaaccccg gtccagcgca gaaccgaaac cacaaagccc 300

ctccctcata actgaaaagc ggccccgccc cggcccaaag ggccggaaca gagtcgcttt 360

taattatgaa tgttgtaact acatcttcat cgctgtcagt cttctcgctg gaagttctca 420

gtacacgctc gtaagcggcc ctcacggccc gctaacgcgg agatacgccc cgacttcggg 480

taaaccctcg tcgggaccac tccgaccgcg cacagaagct ctctcatggc tgaaagcggg 540

tatggtctgg cagggctggg gatgggtaag gtgaaatcta tcaatcagta ccggcttacg 600

ccgggcttcg gcggttttac tcctgtatca tatgaaacaa cagagtgccg ccttccatgc 660

cgctgatgcg gcatatcctg gtaacgatat ctgaattgtt atacatgtgt atatacgtgg 720

taatgacaaa aataggacaa gttaaaaatt tacaggcgat gcaatgattc aaacacgtaa 780

tcaatatctg ca 792

<210> 265

<211> 2920

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pWSK origin of replication

<400> 265

ccgatgccct tgagagcctt caacccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact 60

atcgtcgccg cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca gggtgccggc 120

agcgctctgg gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct 180

gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgcacgc cctcgctcaa gccttcgtca ctggtcccgc 240

caccaaacgt ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcggccg acgcgctggg 300

ctacgtcttg ctggcgttcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta tgattcttct 360

cgcttccggc ggcatcggga tgcccgcgtt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga 420

cgaccatcag ggacagcttc aaggatcgct cgcggctctt accagcctaa cttcgatcat 480

tggaccgctg atcgtcacgg cgatttatgc cgcctcggcg agcacatgga acgggttggc 540

atggattgta ggcgccgccc tataccttgt ctgcctcccc gcgttgcgtc gcggtgcatg 600

gagccgggcc acctcgacct gaatggaagc cggcggcacc tcgctaacgg attcaccact 660

ccgcagaccc gccataaaac gccctgagaa gcccgtgacg ggcttttctt gtattatggg 720

tagtttcctt gcatgaatcc ataaaaggcg cctgtagtgc catttacccc cattcactgc 780

cagagccgtg agcgcagcga actgaatgtc acgaaaaaga cagcgactca ggtgcctgat 840

ggtcggagac aaaaggaata ttcagcgatt tgcccgagct tgcgagggtg ctacttaagc 900

ctttagggtt ttaaggtctg ttttgtagag gagcaaacag cgtttgcgac atccttttgt 960

aatactgcgg aactgactaa agtagtgagt tatacacagg gctgggatct attcttttta 1020

tctttttta ttctttcttt attctataaa ttataaccac ttgaatataa acaaaaaaaa 1080

cacacaaagg tctagcggaa tttacagagg gtctagcaga atttacaagt tttccagcaa 1140

aggtctagca gaatttacag atacccacaa ctcaaaggaa aaggactagt aattatcatt 1200

gactagccca tctcaattgg tatagtgatt aaaatcacct agaccaattg agatgtatgt 1260

ctgaattagt tgttttcaaa gcaaatgaac tagcgattag tcgctatgac ttaacggagc 1320

atgaaaccaa gctaatttta tgctgtgtgg cactactcaa ccccacgatt gaaaacccta 1380

caaggaaaga acggacggta tcgttcactt ataaccaata cgctcagatg atgaacatca 1440

gtagggaaaa tgcttatggt gtattagcta aagcaaccag agagctgatg acgagaactg 1500

tggaaatcag gaatcctttg gttaaaggct ttgagatttt ccagtggaca aactatgcca 1560

agttctcaag cgaaaaatta gaattagttt ttagtgaaga gatattgcct tatcttttcc 1620

agttaaaaaa attcataaaa tataatctgg aacatgttaa gtcttttgaa aacaaatact 1680

ctatgaggat ttatgagtgg ttattaaaag aactaacaca aaagaaaact cacaaggcaa 1740

atatagagat tagccttgat gaatttaagt tcatgttaat gcttgaaaat aactaccatg 1800

agtttaaaag gcttaaccaa tgggttttga aaccaataag taaagattta aacacttaca 1860

gcaatatgaa attggtggtt gataagcgag gccgcccgac tgatacgttg attttccaag 1920

ttgaactaga tagacaaatg gatctcgtaa ccgaacttga gaacaaccag ataaaaatga 1980

atggtgacaa aataccaaca accattacat cagattccta cctacataac ggactaagaa 2040

aaacactaca cgatgcttta actgcaaaaa ttcagctcac cagttttgag gcaaaatttt 2100

tgagtgacat gcaaagtaag tatgatctca atggttcgtt ctcatggctc acgcaaaaac 2160

aacgaaccac actagagaac atactggcta aatacggaag gatctgaggt tcttatggct 2220

cttgtatcta tcagtgaagc atcaagacta acaaacaaaa gtagaacaac tgttcaccgt 2280

tacatatcaa agggaaaact gtccatatgc acagatgaaa acggtgtaaa aaagatagat 2340

acatcagagc ttttacgagt ttttggtgca ttcaaagctg ttcaccatga acagatcgac 2400

aatgtaacag atgaacagca tgtaacacct aatagaacag gtgaaaccag taaaacaaag 2460

caactagaac atgaaattga acacctgaga caacttgtta cagctcaaca gtcacacata 2520

gacagcctga aacaggcgat gctgcttatc gaatcaaagc tgccgacaac acgggagcca 2580

gtgacgcctc ccgtggggaa aaaatcatgg caattctgga agaaatagcg ctttcagccg 2640

gcaaaccggc tgaagccgga tctgcgattc tgataacaaa ctagcaacac cagaacagcc 2700

cgtttgcggg cagcaaaacc cgtacttttg gacgttccgg cggttttttg tggcgagtgg 2760

tgttcgggcg gtgcgcgcaa gatccattat gttaaacggg cgagtttaca tctcaaaacc 2820

gcccgcttaa caccatcaga aatcctcagc gcgattttaa gcaccaaccc ccccccgtaa 2880

cacccaaatc catactgaaa gtggctttgt tgaataaatc 2920

<210> 266

<211> 37

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

<223> ColE2 origin of replication

<400> 266

aaaatgagac cagataagcc ttatcagata acagcgc 37

<210> 267

<211> 668

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pUC origin of replication

<400> 267

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 60

cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 120

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 180

cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 240

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 300

ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 360

cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 420

aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 480

tacggctaca ctagaagaac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 540

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 600

tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 660

ttttctac 668

<210> 268

<211> 457

<212> DNA

<213> Bacteriophage F1

<220>

<223> F1 origin of replication

<400> 268

gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 60

gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc tttctcgcc 120

acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt 180

agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 240

ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt 300

ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc ttttgattta 360

taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 420

aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaattt 457

<210> 269

<211> 534

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-7

<400> 269

atgttccatg tttcttttag gtatatcttt ggacttcctc ccctgatcct tgttctgttg 60

ccagtagcat catctgattg tgatattgaa ggtaaagatg gcaaacaata tgagagtgtt 120

ctaatggtca gcatcgatca attattggac agcatgaaag aaattggtag caattgcctg 180

aataatgaat ttaacttttt taaaagacat atctgtgatg ctaataagga aggtatgttt 240

ttattccgtg ctgctcgcaa gttgaggcaa tttcttaaaa tgaatagcac tggtgatttt 300

gatctccact tattaaaagt ttcagaaggc acaacaatac tgttgaactg cactggccag 360

gttaaaggaa gaaaaccagc tgccctgggt gaagcccaac caacaaagag tttggaagaa 420

aataaatctt taaaggaaca gaaaaaactg aatgacttgt gtttcctaaa gagactatta 480

caagagataa aaacttgttg gaataaaatt ttgatgggca ctaaagaaca ctga 534

<210> 270

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL12B

<400> 270

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg ttttttctggc atctcccctc 60

gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat 120

gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacacccctg aagaagatgg tatcacctgg 180

accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa 240

gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300

ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag 360

aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc 420

acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480

ggctcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540

agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgccca 600

gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660

gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgaccc acccaagaac 720

ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780

acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840

agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900

cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960

gaatgggcat ctgtgccctg cagttag 987

<210> 271

<211> 762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL12A

<400> 271

atgtggcccc ctgggtcagc ctcccagcca ccgccctcac ctgccgcggc cacaggtctg 60

catccagcgg ctcgccctgt gtccctgcag tgccggctca gcatgtgtcc agcgcgcagc 120

ctcctccttg tggctaccct ggtcctcctg gaccacctca gtttggccag aaacctcccc 180

gtggccactc cagacccagg aatgttccca tgccttcacc actcccaaaa cctgctgagg 240

gccgtcagca acatgctcca gaaggccaga caaactctag aattttaccc ttgcacttct 300

gaagagattg atcatgaaga tatcacaaaa gataaaacca gcacagtgga ggcctgttta 360

ccattggaat taaccaagaa tgagagttgc ctaaattcca gagagacctc tttcataact 420

aatgggagtt gcctggcctc cagaaagacc tcttttatga tggccctgtg ccttagtagt 480

atttatgaag acttgaagat gtaccaggtg gagttcaaga ccatgaatgc aaagcttctg 540

atggatccta agaggcagat ctttctagat caaaacatgc tggcagttat tgatgagctg 600

atgcaggccc tgaatttcaa cagtgagact gtgccacaaa aatcctccct tgaagaaccg 660

gatttttata aaactaaaat caagctctgc atacttcttc atgctttcag aattcgggca 720

gtgactattg atagagtgat gagctatctg aatgcttcct aa 762

<210> 272

<211> 489

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-15

<

400> 272

atgagaattt cgaaaccaca tttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60

ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120

gcagggcttc ctaaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt 180

gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac 240

cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt 300

gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac 360

agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag 420

gaaaaaaata ttaaagaatt tttgcagagt tttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac 480

acttcttga 489

<210> 273

<211> 804

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL15RA

<400> 273

atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60

ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120

cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180

tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtgtt gaacaaggcc 240

acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgccctggtt 300

caccaaaggc cagcgccacc ctccacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag 360

agcctctccc cttctggaaa agagcccgca gcttcatctc ccagctcaaa caacacagcg 420

gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc cttcaaaatc accttccaca 480

ggaaccacag agataagcag tcatgagtcc tcccacggca ccccctctca gacaacagcc 540

aagaactggg aactcacagc atccgcctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc 600

cacagcgaca ccactgtggc tatctccacg tccactgtcc tgctgtgtgg gctgagcgct 660

gtgtctctcc tggcatgcta cctcaagtca aggcaaactc ccccgctggc cagcgttgaa 720

atggaagcca tggaggctct gccggtgact tgggggacca gcagcagaga tgaagacttg 780

gaaaactgct ctcaccacct atga 804

<210> 274

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CXCL9

<400> 274

atgaagaaaa gtggtgttct tttcctcttg ggcatcatct tgctggttct gattggagtg 60

caaggaaccc cagtagtgag aaagggtcgc tgttcctgca tcagcaccaa ccaagggact 120

atccacctac aatccttgaa agaccttaaa caatttgccc caagcccttc ctgcgagaaa 180

attgaaatca ttgctacact gaagaatgga gttcaaacat gtctaaaccc agattcagca 240

gatgtgaagg aactgattaa aaagtgggag aaacaggtca gccaaaagaa aaagcaaaag 300

aatgggaaaa aacatcaaaa aaagaaagtt ctgaaagttc gaaaatctca acgttctcgt 360

caaaagaaga ctacataa 378

<210> 275

<211> 297

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CXCL10

<400> 275

atgaatcaaa ctgccattct gatttgctgc cttatctttc tgactctaag tggcattcaa 60

ggagtacctc tctctagaac tgtacgctgt acctgcatca gcattagtaa tcaacctgtt 120

aatccaaggt ctttagaaaa acttgaaatt attcctgcaa gccaattttg tccacgtgtt 180

gagatcattg ctacaatgaa aaagaagggt gagaagagat gtctgaatcc agaatcgaag 240

gccatcaaga atttactgaa agcagttagc aaggaaaggt ctaaaagatc tccttaa 297

<210> 276

<211> 285

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CXCL11

<400> 276

atgagtgtga agggcatggc tatagccttg gctgtgatat tgtgtgctac agttgttcaa 60

ggcttcccca tgttcaaaag aggacgctgt ctttgcatag gccctggggt aaaagcagtg 120

aaagtggcag atattgagaa agcctccata atgtacccaa gtaacaactg tgacaaaata 180

gaagtgatta ttaccctgaa agaaaataaa ggacaacgat gcctaaatcc caaatcgaag 240

caagcaaggc ttataatcaa aaaagttgaa agaaagaatt tttaa 285

<210> 277

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CCL5

<400> 277

atgaaggtct ccgcggcagc cctcgctgtc atcctcattg ctactgccct ctgcgctcct 60

gcatctgcct ccccatattc ctcggacacc acaccctgct gctttgccta cattgcccgc 120

ccactgcccc gtgcccacat caaggagtat ttctacacca gtggcaagtg ctccaaccca 180

gcagtcgtcc acaggtcaag gatgccaaag agagagggac agcaagtctg gcaggatttc 240

ctgtatgact cccggctgaa caagggcaag ctttgtcacc cgaaagaacc gccaagtgtg 300

tgccaaccca gagaagaaat gggttcggga gtacatcaac tctttggaga tgagctagga 360

tggagagtcc ttgaacctga acttacacaa atttgcctgt ttctgcttgc tcttgtccta 420

gcttgggagg cttcccctca ctatcctacc ccacccgctc cttga 465

<210> 278

<211> 765

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB Ligand

<400> 278

atggaatacg cctctgacgc ttcactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60

gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120

ctcgctgccg cctgcgccgt cttcctcgcc tgcccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180

tcgcccggct ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagctttc gcccgacgat 240

cccgccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtggc ccaaaatgtt 300

ctgctgatcg atgggcccct gagctggtac agtgacccag gcctggcagg cgtgtccctg 360

acgggggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tggtggccaa ggctggagtc 420

tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctcaggctcc 480

gtttcacttg cgctgcacct gcagccactg cgctctgctg ctggggccgc cgccctggct 540

ttgaccgtgg acctgccacc cgcctcctcc gaggctcgga actcggcctt cggtttccag 600

ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgcctgggcg tccatcttca cactgaggcc 660

agggcacgcc atgcctggca gcttacccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720

acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 279

<211> 1368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF1A

<400> 279

atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccactgg tgctcctgga gctgttggtg 60

ggaatatacc cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga 120

gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc 180

aagtgccaca aaggaaccta cttgtacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac 240

tgcagggagt gtgagagcgg ctccttcacc gcttcagaaa accacctcag acactgcctc 300

agctgctcca aatgccgaaa ggaaatgggt caggtggaga tctcttcttg cacagtggac 360

cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt 420

ttccagtgct tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag 480

aaacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttctttc taagagaaaa cgagtgtgtc 540

tcctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc ccagattgag 600

aatgttaagg gcactgagga ctcaggcacc acagtgctgt tgcccctggt cattttcttt 660

ggtctttgcc ttttatccct cctcttcatt ggtttaatgt atcgctacca acggtggaag 720

tccaagctct actccattgt ttgtgggaaa tcgacacctg aaaaagaggg ggagcttgaa 780

ggaactacta ctaagcccct ggccccaaac ccaagcttca gtcccactcc aggcttcacc 840

cccaccctgg gcttcagtcc cgtgcccagt tccaccttca cctccagctc cacctatacc 900

cccggtgact gtcccaactt tgcggctccc cgcagagagg tggcaccacc ctatcagggg 960

gctgacccca tccttgcgac agccctcgcc tccgacccca tccccaaccc ccttcagaag 1020

tgggaggaca gcgcccacaa gccacagagc ctagacactg atgaccccgc gacgctgtac 1080

gccgtggtgg agaacgtgcc cccgttgcgc tggaaggaat tcgtgcggcg cctagggctg 1140

agcgaccacg agatcgatcg gctggagctg cagaacgggc gctgcctgcg cgaggcgcaa 1200

tacagcatgc tggcgacctg gaggcggcgc acgccgcggc gcgaggccac gctggagctg 1260

ctgggacgcg tgctccgcga catggacctg ctgggctgcc tggaggacat cgaggaggcg 1320

ctttgcggcc ccgccgccct cccgcccgcg cccagtcttc tcagatga 1368

<210> 280

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF1B

<400> 280

atggcgcccg tcgccgtctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg 60

cacgccttgc ccgcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 120

cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctcgccgggc 180

caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 240

agcacataca cccagctctg gaactgggtt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgctgt 300

agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 360

aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg 420

cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 480

tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 540

ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 600

acgtccacgt cccccacccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg 660

tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaaccca gcactgctcc aagcacctcc 720

ttcctgctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga cttcgctctt 780

ccagttggac tgattgtggg tgtgacagcc ttgggtctac taataatagg agtggtgaac 840

tgtgtcatca tgacccaggt gaaaaagaag cccttgtgcc tgcagagaga agccaaggtg 900

cctcacttgc ctgccgataa ggcccggggt acacagggcc ccgagcagca gcacctgctg 960

atcacagcgc cgagctccag cagcagctcc ctggagagct cggccagtgc gttggacaga 1020

agggcgccca ctcggaacca gccacaggca ccaggcgtgg aggccagtgg ggccggggag 1080

gcccgggcca gcaccgggag ctcagattct tcccctggtg gccatgggac ccaggtcaat 1140

gtcacctgca tcgtgaacgt ctgtagcagc tctgaccaca gctcacagtg ctcctcccaa 1200

gccagctcca caatgggaga cacagattcc agcccctcgg agtccccgaa ggacgagcag 1260

gtccccttct ccaaggagga atgtgccttt cggtcacagc tggagacgcc agagaccctg 1320

ctggggagca ccgaagagaa gcccctgccc cttggagtgc ctgatgctgg gatgaagccc 1380

agttaa 1386

<210> 281

<211> 1308

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> LTBR

<400> 281

atgctcctgc cttgggccac ctctgccccc ggcctggcct gggggcctct ggtgctgggc 60

ctcttcgggc tcctggcagc atcgcagccc caggcggtgc ctccatatgc gtcggagaac 120

cagacctgca gggaccagga aaaggaatac tatgagcccc agcaccgcat ctgctgctcc 180

cgctgcccgc caggcaccta tgtctcagct aaatgtagcc gcatccggga cacagtttgt 240

gccacatgtg ccgagaattc ctacaacgag cactggaact acctgaccat ctgccagctg 300

tgccgccccc gtgacccagt gatgggcctc gaggagattg ccccctgcac aagcaaacgg 360

aagacccagt gccgctgcca gccgggaatg ttctgtgctg cctgggccct cgagtgtaca 420

cactgcgagc tactttctga ctgcccgcct ggcactgaag ccgagctcaa agatgaagtt 480

gggaagggta acaaccactg cgtcccctgc aaggccgggc acttccagaa tacctcctcc 540

cccagcgccc gctgccagcc ccacaccagg tgtgagaacc aaggtctggt ggaggcagct 600

ccaggcactg cccagtccga cacaacctgc aaaaatccat tagagccact gccccccagag 660

atgtcaggaa ccatgctgat gctggccgtt ctgctgccac tggccttctt tctgctcctt 720

gccaccgtct tctcctgcat ctggaagagc cacccttctc tctgcaggaa actgggatcg 780

ctgctcaaga ggcgtccgca gggagaggga cccaatcctg tagctggaag ctgggagcct 840

ccgaaggccc atccatactt ccctgacttg gtacagccac tgctacccat ttctggagat 900

gtttccccag tatccactgg gctccccgca gccccagttt tggaggcagg ggtgccgcaa 960

cagcagagtc ctctggacct gaccagggag ccgcagttgg aacccgggga gcagagccag 1020

gtggcccacg gtaccaatgg cattcatgtc accggcgggt ctatgactat cactggcaac 1080

atctacatct acaatggacc agtactgggg ggaccaccgg gtcctggaga cctcccagct 1140

acccccgaac ctccataccc cattcccgaa gaggggggacc ctggccctcc cgggctctct 1200

acaccccacc aggaagatgg caaggcttgg cacctagcgg agacagagca ctgtggtgcc 1260

acaccctcta acaggggccc aaggaaccaa tttatcaccc atgactga 1308

<210> 282

<211> 1008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FAS

<400> 282

atgctgggca tctggaccct cctacctctg gttcttacgt ctgttgctag attatcgtcc 60

aaaagtgtta atgcccaagt gactgacatc aactccaagg gattggaatt gaggaagact 120

gttactacag ttgagactca gaacttggaa ggcctgcatc atgatggcca attctgccat 180

aagccctgtc ctccaggtga aaggaaagct agggactgca cagtcaatgg ggatgaacca 240

gactgcgtgc cctgccaaga agggaaggag tacacagaca aagcccattt ttcttccaaa 300

tgcagaagat gtagattgtg tgatgaagga catggcttag aagtggaaat aaactgcacc 360

cggacccaga ataccaagtg cagatgtaaa ccaaactttt tttgtaactc tactgtatgt 420

gaacactgtg acccttgcac caaatgtgaa catggaatca tcaaggaatg cacactcacc 480

agcaacacca agtgcaaaga ggaaggatcc agatctaact tggggtggct ttgtcttctt 540

cttttgccaa ttccactaat tgtttgggtg aagagaaagg aagtacagaa aacatgcaga 600

aagcacagaa aggaaaacca aggttctcat gaatctccaa ctttaaatcc tgaaacagtg 660

gcaataaatt tatctgatgt tgacttgagt aaatatatca ccactattgc tggagtcatg 720

acactaagtc aagttaaagg ctttgttcga aagaatggtg tcaatgaagc caaaatagat 780

gagatcaaga atgacaatgt ccaagacaca gcagaacaga aagttcaact gcttcgtaat 840

tggcatcaac ttcatggaaa gaaagaagcg tatgacacat tgattaaaga tctcaaaaaa 900

gccaatcttt gtactcttgc agagaaaatt cagactatca tcctcaagga cattactagt 960

gactcagaaa attcaaactt cagaaatgaa atccaaagct tggtctag 1008

<210> 283

<211> 903

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF6B

<400> 283

atgagggcgc tggaggggcc aggcctgtcg ctgctgtgcc tggtgttggc gctgcctgcc 60

ctgctgccgg tgccggctgt acgcggagtg gcagaaacac ccacctaccc ctggcgggac 120

gcagagacag gggagcggct ggtgtgcgcc cagtgccccc caggcacctt tgtgcagcgg 180

ccgtgccgcc gagacagccc cacgacgtgt ggcccgtgtc caccgcgcca ctacacgcag 240

ttctggaact acctagagcg ctgccgctac tgcaacgtcc tctgcgggga gcgtgaggag 300

gaggcacggg cttgccacgc cacccacaac cgtgcctgcc gctgccgcac cggcttcttc 360

gcgcacgctg gtttctgctt ggagcacgca tcgtgtccac ctggtgccgg cgtgattgcc 420

ccgggcaccc ccagccagaa cacgcagtgc cagccgtgcc ccccaggcac cttctcagcc 480

agcagctcca gctcagagca gtgccagccc caccgcaact gcacggccct gggcctggcc 540

ctcaatgtgc caggctcttc ctcccatgac accctgtgca ccagctgcac tggcttcccc 600

ctcagcacca gggtaccagg agctgaggag tgtgagcgtg ccgtcatcga ctttgtggct 660

ttccaggaca tctccatcaa gaggctgcag cggctgctgc aggccctcga ggccccggag 720

ggctggggtc cgacaccaag ggcgggccgc gcggccttgc agctgaagct gcgtcggcgg 780

ctcacggagc tcctgggggc gcaggacggg gcgctgctgg tgcggctgct gcaggcgctg 840

cgcgtggcca ggatgcccgg gctggagcgg agcgtccgtg agcgcttcct ccctgtgcac 900

tga 903

<210> 284

<211> 783

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD27

<400> 284

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct 60

actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcagggaaa gctgtgctgc 120

cagatgtgtg agccaggaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct 180

cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac 240

tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc 300

aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt 360

gatcctcttc caaacccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggccctgag cccacaccct 420

cagcccaccc acttacctta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg 480

cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccggactc tctctaccca ctggccaccc 540

caaagatccc tgtgcagctc cgattttatt cgcatccttg tgatcttctc tggaatgttc 600

cttgttttca ccctggccgg ggccctgttc ctccatcaac gaaggaaata tagatcaaac 660

aaaggagaaa gtcctgtgga gcctgcagag ccttgtcgtt acagctgccc cagggaggag 720

gagggcagca ccatccccat ccaggaggat taccgaaaac cggagcctgc ctgctccccc 780

tga 783

<210> 285

<211> 1788

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF8

<400> 285

atgcgcgtcc tcctcgccgc gctgggactg ctgttcctgg gggcgctacg agccttccca 60

caggatcgac ccttcgagga cacctgtcat ggaaacccca gccactacta tgacaaggct 120

gtcaggaggt gctgttaccg ctgccccatg gggctgttcc cgacacagca gtgcccacag 180

aggcctactg actgcaggaa gcagtgtgag cctgactact acctggatga ggccgaccgc 240

tgtacagcct gcgtgacttg ttctcgagac gacctcgtgg agaagacgcc gtgtgcatgg 300

aactcctccc gtgtctgcga atgtcgaccc ggcatgttct gttccacgtc tgccgtcaac 360

tcctgtgccc gctgcttctt ccattctgtc tgtccggcag ggatgattgt caagttccca 420

ggcacggcgc agaagaacac ggtctgtgag ccggcttccc caggggtcag ccctgcctgt 480

gccagcccag agaactgcaa ggaaccctcc agtggcacca tcccccaggc caagcccacc 540

ccggtgtccc cagcaacctc cagtgccagc accatgcctg taagaggggg cacccgcctc 600

gcccaggaag ctgcttctaa actgacgagg gctcccgact ctccctcctc tgtgggaagg 660

cctagttcag atccaggtct gtccccaaca cagccatgcc cagaggggtc tggtgattgc 720

agaaagcagt gtgagcccga ctactacctg gacgaggccg gccgctgcac ggcctgcgtg 780

agctgttctc gagatgacct tgtggagaag acgccatgtg catggaactc ctcccgcacc 840

tgcgaatgtc gacctggcat gatctgtgcc acatcagcca ccaactcctg tgcccgctgt 900

gtcccctacc caatctgtgc agcagagacg gtcaccaagc cccaggatat ggctgagaag 960

gacaccacct ttgaggcgcc acccctgggg acccagccgg actgcaaccc caccccagag 1020

aatggcgagg cgcctgccag caccagcccc actcagagct tgctggtgga ctcccaggcc 1080

agtaagacgc tgcccatccc aaccagcgct cccgtcgctc tctcctccac ggggaagccc 1140

gttctggatg cagggccagt gctcttctgg gtgatcctgg tgttggttgt ggtggtcggc 1200

tccagcgcct tcctcctgtg ccaccggagg gcctgcagga agcgaattcg gcagaagctc 1260

cacctgtgct acccggtcca gacctcccag cccaagctag agcttgtgga ttccagaccc 1320

aggaggagct caacgcagct gaggagtggt gcgtcggtga cagaacccgt cgcggaagag 1380

cgagggttaa tgagccagcc actgatggag acctgccaca gcgtgggggc agcctacctg 1440

gagagcctgc cgctgcagga tgccagcccg gccgggggcc cctcgtcccc cagggacctt 1500

cctgagcccc gggtgtccac ggagcacacc aataacaaga ttgagaaaat ctacatcatg 1560

aaggctgaca ccgtgatcgt ggggaccgtg aaggctgagc tgccggaggg ccggggcctg 1620

gcggggccag cagagcccga gttggaggag gagctggagg cggaccatac cccccactac 1680

cccgagcagg agacagaacc gcctctgggc agctgcagcg atgtcatgct ctcagtggaa 1740

gaggaaggga aagaagaccc cttgcccaca gctgcctctg gaaagtga 1788

<210> 286

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF10A

<400> 286

atggcgccac caccagctag agtacatcta ggtgcgttcc tggcagtgac tccgaatccc 60

gggagcgcag cgagtgggac agaggcagcc gcggccacac ccagcaaagt gtggggctct 120

tccgcgggga ggattgaacc acgaggcggg ggccgaggag cgctccctac ctccatggga 180

cagcacggac ccagtgcccg ggcccgggca gggcgcgccc caggacccag gccggcgcgg 240

gaagccagcc ctcggctccg ggtccacaag accttcaagt ttgtcgtcgt cggggtcctg 300

ctgcaggtcg tacctagctc agctgcaacc atcaaacttc atgatcaatc aattggcaca 360

cagcaatggg aacatagccc tttgggagag ttgtgtccac caggatctca tagatcagaa 420

catcctggag cctgtaaccg gtgcacagag ggtgtgggtt acaccaatgc ttccaacaat 480

ttgtttgctt gcctcccatg tacagcttgt aaatcagatg aagaagagag aagtccctgc 540

accacgacca ggaacacagc atgtcagtgc aaaccaggaa ctttccggaa tgacaattct 600

gctgagatgt gccggaagtg cagcagaggg tgccccagag ggatggtcaa ggtcaaggat 660

tgtacgccct ggagtgacat cgagtgtgtc cacaaagaat caggcaatgg acataatata 720

tgggtgattt tggttgtgac tttggttgtt ccgttgctgt tggtggctgt gctgattgtc 780

tgttgttgca tcggctcagg ttgtggaggg gaccccaagt gcatggacag ggtgtgtttc 840

tggcgcttgg gtctcctacg agggcctggg gctgaggaca atgctcacaa cgagattctg 900

agcaacgcag actcgctgtc cactttcgtc tctgagcagc aaatggaaag ccaggagccg 960

gcagatttga caggtgtcac tgtacagtcc ccaggggagg cacagtgtct gctgggaccg 1020

gcagaagctg aagggtctca gaggaggagg ctgctggttc cagcaaatgg tgctgacccc 1080

actgagactc tgatgctgtt ctttgacaag tttgcaaaca tcgtgccctt tgactcctgg 1140

gaccagctca tgaggcagct ggacctcacg aaaaatgaga tcgatgtggt cagagctggt 1200

acagcaggcc caggggatgc cttgtatgca atgctgatga aatgggtcaa caaaactgga 1260

cggaacgcct cgatccacac cctgctggat gccttggaga ggatggaaga gagacatgca 1320

agagagaaga ttcaggacct cttggtggac tctggaaagt tcatctactt agaagatggc 1380

acaggctctg ccgtgtcctt ggagtga 1407

<210> 287

<211> 1323

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF10B

<400> 287

atggaacaac ggggacagaa cgccccggcc gcttcggggg cccggaaaag gcacggccca 60

ggacccaggg aggcgcgggg agccaggcct gggccccggg tccccaagac ccttgtgctc 120

gttgtcgccg cggtcctgct gttggtctca gctgagtctg ctctgatcac ccaacaagac 180

ctagctcccc agcagagagc ggccccacaa caaaagaggt ccagcccctc agagggattg 240

tgtccacctg gacaccatat ctcagaagac ggtagagatt gcatctcctg caaatatgga 300

caggactata gcactcactg gaatgacctc cttttctgct tgcgctgcac caggtgtgat 360

tcaggtgaag tggagctaag tccctgcacc acgaccagaa acacagtgtg tcagtgcgaa 420

gaaggcacct tccgggaaga agattctcct gagatgtgcc ggaagtgccg cacagggtgt 480

cccagaggga tggtcaaggt cggtgattgt acaccctgga gtgacatcga atgtgtccac 540

aaagaatcag gtacaaagca cagtggggaa gtcccagctg tggaggagac ggtgacctcc 600

agcccaggga ctcctgcctc tccctgttct ctctcaggca tcatcatagg agtcacagtt 660

gcagccgtag tcttgattgt ggctgtgttt gtttgcaagt ctttactgtg gaagaaagtc 720

cttccttacc tgaaaggcat ctgctcaggt ggtggtgggg accctgagcg tgtggacaga 780

agctcacaac gacctggggc tgaggacaat gtcctcaatg agatcgtgag tatcttgcag 840

cccacccagg tccctgagca ggaaatggaa gtccaggagc cagcagagcc aacaggtgtc 900

aacatgttgt cccccgggga gtcagagcat ctgctggaac cggcagaagc tgaaaggtct 960

cagaggagga ggctgctggt tccagcaaat gaaggtgatc ccactgagac tctgagacag 1020

tgcttcgatg actttgcaga cttggtgccc tttgactcct gggagccgct catgaggaag 1080

ttgggcctca tggacaatga gataaaggtg gctaaagctg aggcagcggg ccacagggac 1140

accttgtaca cgatgctgat aaagtgggtc aacaaaaccg ggcgagatgc ctctgtccac 1200

accctgctgg atgccttgga gacgctggga gagagacttg ccaagcagaa gattgaggac 1260

cacttgttga gctctggaaa gttcatgtat ctagaaggta atgcagactc tgccatgtcc 1320

taa 1323

<210> 288

<211> 780

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF10C

<400> 288

atggcccgga tccccaagac cctaaagttc gtcgtcgtca tcgtcgcggt cctgctgcca 60

gtcctagctt actctgccac cactgcccgg caggaggaag ttccccagca gacagtggcc 120

ccacagcaac agaggcacag cttcaagggg gaggagtgtc cagcaggatc tcatagatca 180

gaacatactg gagcctgtaa cccgtgcaca gagggtgtgg attacaccaa cgcttccaac 240

aatgaacctt cttgcttccc atgtacagtt tgtaaatcag atcaaaaaca taaaagttcc 300

tgcaccatga ccagagacac agtgtgtcag tgtaaagaag gcaccttccg gaatgaaaac 360

tccccagaga tgtgccggaa gtgtagcagg tgccctagtg gggaagtcca agtcagtaat 420

tgtacgtcct gggatgatat ccagtgtgtt gaagaatttg gtgccaatgc cactgtggaa 480

accccagctg ctgaagagac aatgaacacc agcccgggga ctcctgcccc agctgctgaa 540

gagacaatga acaccagccc agggactcct gccccagctg ctgaagagac aatgaccacc 600

agcccgggga ctcctgcccc agctgctgaa gagacaatga ccaccagccc ggggactcct 660

gccccagctg ctgaagagac aatgaccacc agcccgggga ctcctgcctc ttctcattac 720

ctctcatgca ccatcgtagg gatcatagtt ctaattgtgc ttctgattgt gtttgtttga 780

<210> 289

<211> 1161

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF10D

<400> 289

atgggacttt ggggacaaag cgtcccgacc gcctcgagcg ctcgagcagg gcgctatcca 60

ggagccagga cagcgtcggg aaccagacca tggctcctgg accccaagat ccttaagttc 120

gtcgtcttca tcgtcgcggt tctgctgccg gtccgggttg actctgccac catcccccgg 180

caggacgaag ttccccagca gacagtggcc ccacagcaac agaggcgcag cctcaaggag 240

gaggagtgtc cagcaggatc tcatagatca gaatatactg gagcctgtaa cccgtgcaca 300

gagggtgtgg attacaccat tgcttccaac aatttgcctt cttgcctgct atgtacagtt 360

tgtaaatcag gtcaaacaaa taaaagttcc tgtaccacga ccagagacac cgtgtgtcag 420

tgtgaaaaag gaagcttcca ggataaaaac tcccctgaga tgtgccggac gtgtagaaca 480

gggtgtccca gagggatggt caaggtcagt aattgtacgc cccggagtga catcaagtgc 540

aaaaatgaat cagctgccag ttccactggg aaaaccccag cagcggagga gacagtgacc 600

accatcctgg ggatgcttgc ctctccctat cactacctta tcatcatagt ggttttagtc 660

atcattttag ctgtggttgt ggttggcttt tcatgtcgga agaaattcat ttcttacctc 720

aaaggcatct gctcaggtgg tggaggaggt cccgaacgtg tgcacagagt ccttttccgg 780

cggcgttcat gtccttcacg agttcctggg gcggaggaca atgcccgcaa cgagaccctg 840

agtaacagat acttgcagcc cacccaggtc tctgagcagg aaatccaagg tcaggagctg 900

gcagagctaa caggtgtgac tgtagagttg ccagaggagc cacagcgtct gctggaacag 960

gcagaagctg aagggtgtca gaggaggagg ctgctggttc cagtgaatga cgctgactcc 1020

gctgacatca gcaccttgct ggatgcctcg gcaacactgg aagaaggaca tgcaaaggaa 1080

acaattcagg accaactggt gggctccgaa aagctctttt atgaagaaga tgaggcaggc 1140

tctgctacgt cctgcctgtg a 1161

<210> 290

<211> 1851

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF11A

<400> 290

atggccccgc gcgcccggcg gcgccgcccg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg 60

ctcgcccggc tgcaggtggc tttgcagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat 120

gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc 180

actactacct ctgacagtgt atgtctgccc tgtggcccgg atgaatactt ggatagctgg 240

aatgaagaag ataaatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc 300
gtggtcgccg gcaacagcac gacccccggg cgctgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg 360
agccaggact gcgagtgctg ccgccgcaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420
cacccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgcagg ctacttctct 480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccctggacca actgtacctt ccttggaaag 540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagct 600
agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttgcccggtt taataattct gcttctcttc 660
gcgtctgtgg ccctggtggc tgccatcatc tttggcgttt gctataggaa aaaagggaaa 720

gcactcacag ctaatttgtg gcactggatc aatgaggctt gtggccgcct aagtggagat 780
aaggagtcct caggtgacag ttgtgtcagt acacacacgg caaactttgg tcagcaggga 840
gcatgtgaag gtgtcttact gctgactctg gaggagaaga catttccaga agatatgtgc 900
tacccagatc aaggtggtgt ctgtcagggc acatgtgtag gaggtggtcc ctacgcacaa 960
ggcgaagatg ccaggatgct ctcattggtc agcaagaccg agatagagga agacagcttc 1020
agacagatgc ccacagaaga tgaatacatg gacaggccct cccagcccac agaccagtta 1080
ctgttcctca ctgagcctgg aagcaaatcc acacctcctt tctctgaacc cctggaggtg 1140
ggggagaatg acagtttaag ccagtgcttc acggggacac agagcacagt gggttcagaa 1200

agctgcaact gcactgagcc cctgtgcagg actgattgga ctcccatgtc ctctgaaaac 1260
tacttgcaaa aagaggtgga cagtggccat tgcccgcact gggcagccag ccccagcccc 1320
aactgggcag atgtctgcac aggctgccgg aaccctcctg gggaggactg tgaacccctc 1380
gtgggttccc caaaacgtgg acccttgccc cagtgcgcct atggcatggg ccttcccccc 1440
gaagaagaag ccagcaggac ggaggccaga gaccagcccg aggatggggc tgatgggagg 1500
ctcccaagct cagcgagggc aggtgccggg tctggaagct cccctggtgg ccagtccccc 1560
gcatctggaa atgtgactgg aaacagtaac tccacgttca tctccagcgg gcaggtgatg 1620
aacttcaagg gcgacatcat cgtggtctac gtcagccaga cctcgcagga gggcgcggcg 1680

gcggctgcgg agcccatggg ccgcccggtg caggaggaga ccctggcgcg ccgagactcc 1740
ttcgcgggga acggcccgcg cttcccggac ccgtgcggcg gccccgaggg gctgcgggag 1800
ccggagaagg cctcgaggcc ggtgcaggag caaggcgggg ccaaggcttg a 1851

<210> 291

<211> 1206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF11B

<400> 291

atgaacaact tgctgtgctg cgcgctcgtg tttctggaca tctccattaa gtggaccacc 60

caggaaacgt ttcctccaaa gtaccttcat tatgacgaag aaacctctca tcagctgttg 120

tgtgacaaat gtcctcctgg tacctaccta aaacaacact gtacagcaaa gtggaagacc 180

gtgtgcgccc cttgccctga ccactactac acagacagct ggcacaccag tgacgagtgt 240

ctatactgca gccccgtgtg caaggagctg cagtacgtca agcaggagtg caatcgcacc 300

cacaaccgcg tgtgcgaatg caaggaaggg cgctaccttg agatagagtt ctgcttgaaa 360

cataggagct gccctcctgg atttggagtg gtgcaagctg gaaccccaga gcgaaataca 420

gtttgcaaaa gatgtccaga tgggttcttc tcaaatgaga cgtcatctaa agcaccctgt 480

agaaaacaca caaattgcag tgtctttggt ctcctgctaa ctcagaaagg aaatgcaaca 540

cacgacaaca tatgttccgg aaacagtgaa tcaactcaaa aatgtggaat agatgttacc 600

ctgtgtgagg aggcattctt caggtttgct gttcctacaa agtttacgcc taactggctt 660

agtgtcttgg tagacaattt gcctggcacc aaagtaaacg cagagagtgt agagaggata 720

aaacggcaac acagctcaca agaacagact ttccagctgc tgaagttatg gaaacatcaa 780

aacaaagacc aagatatagt caagaagatc atccaagata ttgacctctg tgaaaacagc 840

gtgcagcggc acattggaca tgctaacctc accttcgagc agcttcgtag cttgatggaa 900

agcttaccgg gaaagaaagt gggagcagaa gacattgaaa aaacaataaa ggcatgcaaa 960

cccagtgacc agatcctgaa gctgctcagt ttgtggcgaa taaaaaatgg cgaccaagac 1020

accttgaagg gcctaatgca cgcactaaag cactcaaaga cgtaccactt tcccaaaact 1080

gtcactcaga gtctaaagaa gaccatcagg ttccttcaca gcttcacaat gtacaaattg 1140

tatcagaagt tatttttaga aatgataggt aaccaggtcc aatcagtaaa aataagctgc 1200

ttataa 1206

<210> 292

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF12A

<400> 292

atggctcggg gctcgctgcg ccggttgctg cggctcctcg tgctggggct ctggctggcg 60

ttgctgcgct ccgtggccgg ggagcaagcg ccaggcaccg ccccctgctc ccgcggcagc 120

tcctggagcg cggacctgga caagtgcatg gactgcgcgt cttgcagggc gcgaccgcac 180

agcgacttct gcctgggctg cgctgcagca cctcctgccc ccttccggct gctttggccc 240

atccttgggg gcgctctgag cctgaccttc gtgctggggc tgctttctgg ctttttggtc 300

tggagacgat gccgcaggag agagaagttc accaccccca tagaggagac cggcggagag 360

ggctgcccag ctgtggcgct gatccagtga 390

<210> 293

<211> 882

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF13B

<400> 293

atgagtggcc tgggccggag caggcgaggt ggccggagcc gtgtggacca ggaggagcgc 60

tttccacagg gcctgtggac gggggtggct atgagatcct gccccgaaga gcagtactgg 120

gatcctctgc tgggtacctg catgtcctgc aaaaccattt gcaaccatca gagccagcgc 180

acctgtgcag ccttctgcag gtcactcagc tgccgcaagg agcaaggcaa gttctatgac 240

catctcctga gggactgcat cagctgtgcc tccatctgtg gacagcaccc taagcaatgt 300

gcatacttct gtgagaacaa gctcaggagc ccagtgaacc ttccaccaga gctcaggaga 360

cagcggagtg gagaagttga aaacaattca gacaactcgg gaaggtacca aggattggag 420

cacagaggct cagaagcaag tccagctctc ccggggctga agctgagtgc agatcaggtg 480

gccctggtct acagcacgct ggggctctgc ctgtgtgccg tcctctgctg cttcctggtg 540

gcggtggcct gcttcctcaa gaagaggggg gatccctgct cctgccagcc ccgctcaagg 600

ccccgtcaaa gtccggccaa gtcttcccag gatcacgcga tggaagccgg cagccctgtg 660

agcacatccc ccgagccagt ggagacctgc agcttctgct tccctgagtg cagggcgccc 720

acgcaggaga gcgcagtcac gcctgggacc cccgacccca cttgtgctgg aaggtggggg 780

tgccacacca ggaccacagt cctgcagcct tgcccacaca tcccagacag tggccttggc 840

attgtgtgtg tgcctgccca ggaggggggc ccaggtgcat aa 882

<210> 294

<211> 555

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF13C

<400> 294

atgaggcgag ggccccggag cctgcggggc agggacgcgc cagcccccac gccctgcgtc 60

ccggccgagt gcttcgacct gctggtccgc cactgcgtgg cctgcgggct cctgcgcacg 120

ccgcggccga aaccggccgg ggccagcagc cctgcgccca ggacggcgct gcagccgcag 180

gagtcggtgg gcgcgggggc cggcgaggcg gcgctgcccc tgcccgggct gctctttggc 240

gcccccgcgc tgctgggcct ggcactggtc ctggcgctgg tcctggtggg tctggtgagc 300

tggaggcggc gacagcggcg gcttcgcggc gcgtcctccg cagaggcccc cgacggagac 360

aaggacgccc cagagcccct ggacaaggtc atcattctgt ctccgggaat ctctgatgcc 420

acagctcctg cctggcctcc tcctggggaa gacccaggaa ccaccccacc tggccacagt 480

gtccctgtgc cagccacaga gctgggctcc actgaactgg tgaccaccaa gacggccggc 540

cctgagcaac aatag 555

<210> 295

<211> 852

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF14

<400> 295

atggagcctc ctggagactg ggggcctcct ccctggagat ccacccccaa aaccgacgtc 60

ttgaggctgg tgctgtatct caccttcctg ggagcccccc gctacgcccc agctctgccg 120

tcctgcaagg aggacgagta cccagtgggc tccgagtgct gccccaagtg cagtccaggt 180

tatcgtgtga aggaggcctg cggggagctg acgggcacag tgtgtgaacc ctgccctcca 240

ggcacctaca ttgcccacct caatggccta agcaagtgtc tgcagtgcca aatgtgtgac 300

ccagccatgg gcctgcgcgc gagccggaac tgctccagga cagagaacgc cgtgtgtggc 360

tgcagcccag gccacttctg catcgtccag gacggggacc actgcgccgc gtgccgcgct 420

tacgccacct ccagcccggg ccagagggtg cagaagggag gcaccgagag tcaggacacc 480

ctgtgtcaga actgcccccc ggggaccttc tctcccaatg ggaccctgga ggaatgtcag 540

caccagacca agtgcagctg gctggtgacg aaggccggag ctgggaccag cagctcccac 600

tgggtatggt ggtttctctc agggagcctc gtcatcgtca ttgtttgctc cacagttggc 660

ctaatcatat gtgtgaaaag aagaaagcca aggggtgatg tagtcaaggt gatcgtctcc 720

gtccagcgga aaagacagga ggcagaaggt gaggccacag tcattgaggc cctgcaggcc 780

cctccggacg tcaccacggt ggccgtggag gagacaatac cctcattcac ggggaggagc 840

ccaaaccact ga 852

<210> 296

<211> 1284

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NGFR

<400> 296

atgggggcag gtgccaccgg ccgcgccatg gacgggccgc gcctgctgct gttgctgctt 60

ctgggggtgt cccttggagg tgccaaggag gcatgcccca caggcctgta cacacacagc 120

ggtgagtgct gcaaagcctg caacctgggc gagggtgtgg cccagccttg tggagccaac 180

cagaccgtgt gtgagccctg cctggacagc gtgacgttct ccgacgtggt gagcgcgacc 240

gagccgtgca agccgtgcac cgagtgcgtg gggctccaga gcatgtcggc gccgtgcgtg 300

gaggccgacg acgccgtgtg ccgctgcgcc tacggctact accaggatga gacgactggg 360

cgctgcgagg cgtgccgcgt gtgcgaggcg ggctcgggcc tcgtgttctc ctgccaggac 420

aagcagaaca ccgtgtgcga ggagtgcccc gacggcacgt attccgacga ggccaaccac 480

gtggacccgt gcctgccctg caccgtgtgc gaggacaccg agcgccagct ccgcgagtgc 540

acacgctggg ccgacgccga gtgcgaggag atccctggcc gttggattac acggtccaca 600

cccccagagg gctcggacag cacagccccc agcacccagg agcctgaggc acctccagaa 660

caagacctca tagccagcac ggtggcaggt gtggtgacca cagtgatggg cagctcccag 720

cccgtggtga cccgaggcac caccgacaac ctcatccctg tctattgctc catcctggct 780

gctgtggttg tgggccttgt ggcctacata gccttcaaga ggtggaacag ctgcaagcag 840

aacaagcaag gagccaacag ccggccagtg aaccagacgc ccccaccaga gggagaaaaa 900

ctccacagcg acagtggcat ctccgtggac agccagagcc tgcatgacca gcagccccac 960

acgcagacag cctcgggcca ggccctcaag ggtgacggag gcctctacag cagcctgccc 1020

ccagccaagc gggaggaggt ggagaagctt ctcaacggct ctgcgggggа cacctggcgg 1080

cacctggcgg gcgagctggg ctaccagccc gagcacatag actcctttac ccatgaggcc 1140

tgccccgttc gcgccctgct tgcaagctgg gccacccagg acagcgccac actggacgcc 1200

ctcctggccg ccctgcgccg catccagcga gccgacctcg tggagagtct gtgcagtgag 1260

tccactgcca catccccggt gtga 1284

<210> 297

<211> 555

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF17

<400> 297

atgttgcaga tggctgggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgct 60

tgcatacctt gtcaacttcg atgttcttct aatactcctc ctctaacatg tcagcgttat 120

tgtaatgcaa gtgtgaccaa ttcagtgaaa ggaacgaatg cgattctctg gacctgtttg 180

ggactgagct taataatttc tttggcagtt ttcgtgctaa tgtttttgct aaggaagata 240

aactctgaac cattaaagga cgagtttaaa aacacaggat caggtctcct gggcatggct 300

aacattgacc tggaaaagag caggactggt gatgaaatta ttcttccgag aggcctcgag 360

tacacggtgg aagaatgcac ctgtgaagac tgcatcaaga gcaaaccgaa ggtcgactct 420

gaccattgct ttccactccc agctatggag gaaggcgcaa ccattcttgt caccacgaaa 480

acgaatgact attgcaagag cctgccagct gctttgagtg ctacggagat agagaaatca 540

atttctgcta ggtaa 555

<210> 298

<211> 1254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF19

<400> 298

atggctttaa aagtgctact agaacaagag aaaacgtttt tcactctttt agtattacta 60

ggctatttgt catgtaaagt gacttgtgaa tcaggagact gtagacagca agaattcagg 120

gatcggtctg gaaactgtgt tccctgcaac cagtgtgggc caggcatgga gttgtctaag 180

gaatgtggct tcggctatgg ggaggatgca cagtgtgtga cgtgccggct gcacaggttc 240

aaggaggact ggggcttcca gaaatgcaag ccctgtctgg actgcgcagt ggtgaaccgc 300

tttcagaagg caaattgttc agccaccagt gatgccatct gcggggactg cttgccagga 360

ttttatagga agacgaaact tgtcggcttt caagacatgg agtgtgtgcc ttgtggagac 420

cctcctcctc cttacgaacc gcactgtgcc agcaaggtca acctcgtgaa gatcgcgtcc 480

acggcctcca gcccacggga cacggcgctg gctgccgtta tctgcagcgc tctggccacc 540

gtcctgctgg ccctgctcat cctctgtgtc atctattgta agagacagtt tatggagaag 600

aaacccagct ggtctctgcg gtcacaggac attcagtaca acggctctga gctgtcgtgt 660

tttgacagac ctcagctcca cgaatatgcc cacagagcct gctgccagtg ccgccgtgac 720

tcagtgcaga cctgcgggcc ggtgcgcttg ctcccatcca tgtgctgtga ggaggcctgc 780

agccccaacc cggcgactct tggttgtggg gtgcattctg cagccagtct tcaggcaaga 840

aacgcaggcc cagccgggga gatggtgccg actttcttcg gatccctcac gcagtccatc 900

tgtggcgagt tttcagatgc ctggcctctg atgcagaatc ccatgggtgg tgacaacatc 960

tctttttgtg actcttatcc tgaactcact ggagaagaca ttcattctct caatccagaa 1020

cttgaaagct caacgtcttt ggattcaaat agcagtcaag atttggttgg tggggctgtt 1080

ccagtccagt ctcattctga aaactttaca gcagctactg atttatctag atataacaac 1140

acactggtag aatcagcatc aactcaggat gcactaacta tgagaagcca gctagatcag 1200

gagagtggtg ctgtcatcca cccagccact cagacgtccc tccaggaagc ttaa 1254

<210> 299

<211> 1293

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> RELT

<400> 299

atgaagccaa gtctgctgtg ccggcccctg tcctgcttcc ttatgctgct gccctggcct 60

ctcgccaccc tgacatcaac aacccttttgg cagtgcccac ctggggagga gcccgacctg 120

gacccagggc agggcacatt atgcaggccc tgcccccccag gcaccttctc agctgcatgg 180

ggctccagcc catgccagcc ccatgcccgt tgcagccttt ggaggaggct ggaggcccag 240

gtgggcatgg caactcgaga tacactctgt ggagactgct ggcctgggtg gtttgggcct 300

tgggggggttc cccgcgttcc atgtcaacca tgttcctggg cacctctggg tactcatggc 360

tgtgatgagt gggggcggcg ggcccgacgt ggcgtggagg tggcagcagg ggccagcagc 420

ggtggtgaga cacggcagcc tgggaacggc acccgggcag gtggcccaga ggagacagcc 480

gcccagtacg cggtcatcgc catcgtccct gtcttctgcc tcatggggct gttgggcatc 540

ctggtgtgca acctcctcaa gcggaagggc taccactgca cggcgcacaa ggaggtcggg 600

cccggccctg gaggtggagg cagtggaatc aaccctgcct accggactga ggatgccaat 660

gaggacacca ttggggtcct ggtgcgcttg atcacagaga agaaagagaa tgctgcggcc 720

ctggaggagc tgctgaaaga gtaccacagc aaacagctgg tgcagacgag ccacaggcct 780

gtgtccaagc tgccgccagc gcccccgaac gtgccacaca tctgcccgca ccgccaccat 840

ctccacaccg tgcagggcct ggcctcgctc tctggcccct gctgctcccg ctgtagccag 900

aagaagtggc ccgaggtgct gctgtcccct gaggctgtag ccgccactac tcctgttccc 960

agccttctgc ctaacccgac cagggttccc aaggccgggg ccaaggcagg gcgtcagggc 1020

gagatcacca tcttgtctgt gggcaggttc cgcgtggctc gaattcctga gcagcggaca 1080

agttcaatgg tgtctgaggt gaagaccatc acggaggctg ggccctcgtg gggtgatctc 1140

cctgactccc cacagcctgg cctccccccc gagcagcagg ccctgctagg aagtggcgga 1200

agccgtacaa agtggctgaa gcccccagca gagaacaagg ccgaggagaa ccgctatgtg 1260

gtccggctaa gtgagagcaa cctggtcatc tga 1293

<210> 300

<211> 1968

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF21

<400> 300

atggggacct ctccgagcag cagcaccgcc ctcgcctcct gcagccgcat cgcccgccga 60

gccacagcca cgatgatcgc gggctccctt ctcctgcttg gattccttag caccaccaca 120

gctcagccag aacagaaggc ctcgaatctc attggcacat accgccatgt tgaccgtgcc 180

accggccagg tgctaacctg tgacaagtgt ccagcaggaa cctatgtctc tgagcattgt 240

accaacacaa gcctgcgcgt ctgcagcagt tgccctgtgg ggacctttac caggcatgag 300

aatggcatag agaaatgcca tgactgtagt cagccatgcc catggccaat gattgagaaa 360

ttaccttgtg ctgccttgac tgaccgagaa tgcacttgcc cacctggcat gttccagtct 420

aacgctacct gtgcccccca tacggtgtgt cctgtgggtt ggggtgtgcg gaagaaaggg 480

acagagactg aggatgtgcg gtgtaagcag tgtgctcggg gtaccttctc agatgtgcct 540

tctagtgtga tgaaatgcaa agcatacaca gactgtctga gtcagaacct ggtggtgatc 600

aagccgggga ccaaggagac agacaacgtc tgtggcacac tcccgtcctt ctccagctcc 660

acctcacctt cccctggcac agccatcttt ccacgccctg agcacatgga aacccatgaa 720

gtcccttcct ccacttatgt tcccaaaggc atgaactcaa cagaatccaa ctcttctgcc 780

tctgttagac caaaggtact gagtagcatc caggaaggga cagtccctga caacacaagc 840

tcagcaaggg ggaaggaaga cgtgaacaag accctcccaa accttcaggt agtcaaccac 900

cagcaaggcc cccaccacag acacatcctg aagctgctgc cgtccatgga ggccactggg 960

ggcgagaagt ccagcacgcc catcaagggc cccaagaggg gacatcctag acagaaccta 1020

cacaagcatt ttgacatcaa tgagcatttg ccctggatga ttgtgctttt cctgctgctg 1080

gtgcttgtgg tgattgtggt gtgcagtatc cggaaaagct cgaggactct gaaaaagggg 1140

ccccggcagg atcccagtgc cattgtggaa aaggcagggc tgaagaaatc catgactcca 1200

acccagaacc gggagaaatg gatctactac tgcaatggcc atggtatcga tatcctgaag 1260

cttgtagcag cccaagtggg aagccagtgg aaagatatct atcagtttct ttgcaatgcc 1320

agtgagaggg aggttgctgc tttctccaat gggtacacag ccgaccacga gcgggcctac 1380

gcagctctgc agcactggac catccggggc cccgaggcca gcctcgccca gctaattagc 1440

gccctgcgcc agcaccggag aaacgatgtt gtggagaaga ttcgtgggct gatggaagac 1500

accacccagc tggaaactga caaactagct ctcccgatga gccccagccc gcttagcccg 1560

agccccatcc ccagccccaa cgcgaaactt gagaattccg ctctcctgac ggtggagcct 1620

tccccacagg acaagaacaa gggcttcttc gtggatgagt cggagcccct tctccgctgt 1680

gactctacat ccagcggctc ctccgcgctg agcaggaacg gttcctttat taccaaagaa 1740

aagaaggaca cagtgttgcg gcaggtacgc ctggaccccct gtgacttgca gcctatcttt 1800

gatgacatgc tccactttct aaatcctgag gagctgcggg tgattgaaga gattccccag 1860

gctgaggaca aactagaccg gctattcgaa attattggag tcaagagcca ggaagccagc 1920

cagaccctcc tggactctgt ttatagccat cttcctgacc tgctgtag 1968

<210

> 301

<211> 1254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNFRSF25

<400> 301

atggagcagc ggccgcgggg ctgcgcggcg gtggcggcgg cgctcctcct ggtgctgctg 60

ggggcccggg cccagggcgg cactcgtagc cccaggtgtg actgtgccgg tgacttccac 120

aagaagattg gtctgttttg ttgcagaggc tgcccagcgg ggcactacct gaaggcccct 180

tgcacggagc cctgcggcaa ctccacctgc cttgtgtgtc cccaagacac cttcttggcc 240

tgggagaacc accataattc tgaatgtgcc cgctgccagg cctgtgatga gcaggcctcc 300

caggtggcgc tggagaactg ttcagcagtg gccgacaccc gctgtggctg taagccaggc 360

tggtttgtgg agtgccaggt cagccaatgt gtcagcagtt cacccttcta ctgccaacca 420

tgcctagact gcggggccct gcaccgccac acacggctac tctgttcccg cagagatact 480

gactgtggga cctgcctgcc tggcttctat gaacatggcg atggctgcgt gtcctgcccc 540

acgagcaccc tggggagctg tccagagcgc tgtgccgctg tctgtggctg gaggcagatg 600

ttctgggtcc aggtgctcct ggctggcctt gtggtccccc tcctgcttgg ggccaccctg 660

acctacacat accgccactg ctggcctcac aagcccctgg ttactgcaga tgaagctggg 720

atggaggctc tgaccccacc accggccacc catctgtcac ccttggacag cgcccacacc 780

cttctagcac ctcctgacag cagtgagaag atctgcaccg tccagttggt gggtaacagc 840

tggacccctg gctaccccga gacccaggag gcgctctgcc cgcaggtgac atggtcctgg 900

gaccagttgc ccagcagagc tcttggcccc gctgctgcgc ccacactctc gccagagtcc 960

ccagccggct cgccagccat gatgctgcag ccgggcccgc agctctacga cgtgatggac 1020

gcggtcccag cgcggcgctg gaaggagttc gtgcgcacgc tggggctgcg cgaggcagag 1080

atcgaagccg tggaggtgga gatcggccgc ttccgagacc agcagtacga gatgctcaag 1140

cgctggcgcc agcagcagcc cgcgggcctc ggagccgttt acgcggccct ggagcgcatg 1200

gggctggacg gctgcgtgga agacttgcgc agccgcctgc agcgcggccc gtga 1254

<210

> 302

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> EDAR

<400> 302

atggcccatg tgggggactg cacgcagacg ccctggctcc ccgtcctggt ggtgtctctg 60

atgtgctcag cccgagcgga atactcaaac tgcggtgaga acgagtacta caaccagact 120

acggggctgt gccaggagtg ccccccgtgt gggccgggag aggagcccta cctgtcctgt 180

ggctacggca ccaaagacga ggactacggc tgcgtcccct gcccggcgga gaagttttcc 240

aaaggaggct accagatatg caggcgtcac aaagactgtg agggcttctt ccgggccacc 300

gtgctgacac caggggacat ggagaatgac gctgagtgtg gcccttgcct ccctggctac 360

tacatgctgg agaacagacc gaggaacatc tatggcatgg tctgctactc ctgcctcctg 420

gcacccccca acaccaagga atgtgtggga gccacttcag gagcttctgc caacttccct 480

ggcacctcgg gcagcagcac cctgtctccc ttccagcacg cccacaaaga actctcaggc 540

caaggacacc tggccactgc cctgatcatt gcaatgtcca ccatcttcat catggccatc 600

gccatcgtcc tcatcatcat gttctacatc ctgaagacaa agccctctgc cccagcctgt 660

tgcaccagcc acccggggaa gagcgtggag gcccaagtga gcaaggacga ggagaagaaa 720

gaggccccag acaacgtggt gatgttctcc gagaaggatg aatttgagaa gctgacagca 780

actccagcaa agcccaccaa gagcgagaac gatgcctcat ccgagaatga gcagctgctg 840

agccggagcg tcgacagtga tgaggagccc gcccctgaca agcagggctc cccggagctg 900

tgcctgctgt cgctggttca cctggccagg gagaagtctg ccaccagcaa caagtcagcc 960

gggattcaaa gccggaggaa aaagatcctc gatgtgtatg ccaacgtgtg tggagtcgtg 1020

gaaggtctta gccccacgga gctgccattt gattgcctcg agaagactag ccgaatgctc 1080

agctccacgt acaactctga gaaggctgtt gtgaaaacgt ggcgccacct cgccgagagc 1140

ttcggcctga agagggatga gattgggggc atgacagacg gcatgcaact ctttgaccgc 1200

atcagcacgg caggctacag catccctgag ctactcacaa aactggtgca gattgagcgg 1260

ctggatgctg tggagtcctt gtgtgcagac atactggagt gggcgggggt tgtgccacct 1320

gcctcccagc cacatgctgc atcctga 1347

<210> 303

<211> 894

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> EDA2R

<400> 303

atggattgcc aagaaaatga gtactgggac caatggggac ggtgtgtcac ctgccaacgg 60

tgtggtcctg gacaggagct atccaaggat tgtggttatg gagagggtgg agatgcctac 120

tgcacagcct gccctcctcg caggtacaaa agcagctggg gccaccacag atgtcagagt 180

tgcatcacct gtgctgtcat caatcgtgtt cagaaggtca actgcacagc tacctctaat 240

gctgtctgtg gggactgttt gcccaggttc taccgaaaga cacgcattgg aggcctgcag 300

gaccaagagt gcatcccgtg cacgaagcag acccccacct ctgaggttca atgtgccttc 360

cagttgagct tagtggaggc agatacaccc acagtgcccc ctcaggaggc cacacttgtt 420

gcactggtga gcagcctgct agtggtgttt accctggcct tcctggggct cttcttcctc 480

tactgcaagc agttcttcaa cagacattgc cagcgtggag gtttgctgca gtttgaggct 540

gataaaacag caaaggagga atctctcttc cccgtgccac ccagcaagga gaccagtgct 600

gagtcccaag tgagtgagaa catctttcag acccagccac ttaaccctat cctcgaggac 660

gactgcagct cgactagtgg cttccccaca caggagtcct ttaccatggc ctcctgcacc 720

tcagagagcc actcccactg ggtccacagc cccatcgaat gcacagagct ggacctgcaa 780

aagttttcca gctctgcctc ctatactgga gctgagacct tgggggggaaa cacagtcgaa 840

agcactggag acaggctgga gctcaatgtg ccctttgaag ttcccagccc ttaa 894

<210> 304

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STING (R232 Allele)

<220>

<221> allele

<222> (694)...(696)

<223> nnn = CGT, CGC, CGA, CGG, AGA or AGG

<400> 304

atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtccca ggggtcacgg ggcccagaag 60

gcagccttgg ttctgctgag tgcctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca 120

gagcacactc tccggtacct ggtgctccac ctagcctccc tgcagctggg actgctgtta 180

aacggggtct gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggta ccggggcagc 240

tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg 300

ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggtcg gcccgccctt cacttggatg 360

cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc 420

ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa gggaatttca acgtggccca tgggctggca 480

tggtcatatt acatcggata tctgcggctg atcctgccag agctccaggc ccggattcga 540

acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt 600

ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgaccc caacattcgc 660

ttcctggata aactgcccca gcagaccggt gacnnngctg gcatcaagga tcgggtttac 720

agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag 780

tacgccaccc ccttgcagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc 840

cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccgga cacttgagga catcctggca 900

gatgcccctg agtctcagaa caactgccgc ctcattgcct accaggaacc tgcagatgac 960

agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggcaggagga aaaggaagag 1020

gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtcccaagag 1080

cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag cccctccctc tccgcacgga tttctct 1137

<210> 305

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human STING (R232 Allele)

<400> 305

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
165 170 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
210 215 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225 230 235 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
370 375

<210> 306
<211> 379
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human STING (H232 Allele)

<400> 306

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225 230 235 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
370 375

<210> 307
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Human STING (Q293 Allele)
<400> 307
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1 5 10 15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
20 25 30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

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

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Gln Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
370 375

<210> 308
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Human STING (HAQ allele; R71H/G230A/R293Q)
<400> 308
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1 5 10 15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
20 25 30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
50 55 60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu His His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65 70 75 80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
85 90 95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
115 120 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
130 135 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
180 185 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
210 215 220
Leu Pro Gln Gln Thr Ala Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
245 250 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285
Lys Leu Phe Cys Gln Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305 310 315 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350

Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
370 375

<210> 309

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human STING (AQ allele; G230A/R293Q)

<400> 309

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

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

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Ala Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Gln Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340 345 350

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

355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser

370 375

<210> 310

<211> 1025

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MDA5/IFIH1

<400> 310

Met Ser Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser
1 5 10 15

Cys Phe Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu
20 25 30

Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg
35 40 45

Thr Val Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Thr Leu Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val
65 70 75 80

Glu Ala Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn
85 90 95

Pro Glu Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp
100 105 110

Glu Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys
115 120 125

Leu Leu Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu
130 135 140

Thr Ile Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn
145 150 155 160

Glu Ser Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn
165 170 175

Trp Phe Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu
180 185 190

Leu Val Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu
195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Thr Thr Val Gln Pro Asn Leu Glu Lys Glu Val Trp Gly Met
225 230 235 240
Glu Asn Asn Ser Ser Glu Ser Ser Phe Ala Asp Ser Ser Val Val Ser
245 250 255
Glu Ser Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Leu Asp Glu
260 265 270
Ser Leu Gly His Asn Ser Asn Met Gly Ser Asp Ser Gly Thr Met Gly
275 280 285

Ser Asp Ser Asp Glu Glu Asn Val Ala Ala Arg Ala Ser Pro Glu Pro
290 295 300
Glu Leu Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu Val Ala Gln Pro Ala Leu
305 310 315 320
Glu Gly Lys Asn Ile Ile Ile Cys Leu Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr
325 330 335
Arg Val Ala Val Tyr Ile Ala Lys Asp His Leu Asp Lys Lys Lys Lys
340 345 350

Ala Ser Glu Pro Gly Lys Val Ile Val Leu Val Asn Lys Val Leu Leu
355 360 365
Val Glu Gln Leu Phe Arg Lys Glu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Lys Trp
370 375 380
Tyr Arg Val Ile Gly Leu Ser Gly Asp Thr Gln Leu Lys Ile Ser Phe
385 390 395 400
Pro Glu Val Val Lys Ser Cys Asp Ile Ile Ile Ser Thr Ala Gln Ile
405 410 415

Leu Glu Asn Ser Leu Leu Asn Leu Glu Asn Gly Glu Asp Ala Gly Val
420 425 430
Gln Leu Ser Asp Phe Ser Leu Ile Ile Ile Asp Glu Cys His His Thr
435 440 445
Asn Lys Glu Ala Val Tyr Asn Asn Ile Met Arg His Tyr Leu Met Gln
450 455 460

Lys Leu Lys Asn Asn Arg Leu Lys Lys Glu Asn Lys Pro Val Ile Pro
465 470 475 480

Leu Pro Gln Ile Leu Gly Leu Thr Ala Ser Pro Gly Val Gly Gly Ala
485 490 495
Thr Lys Gln Ala Lys Ala Glu Glu His Ile Leu Lys Leu Cys Ala Asn
500 505 510
Leu Asp Ala Phe Thr Ile Lys Thr Val Lys Glu Asn Leu Asp Gln Leu
515 520 525
Lys Asn Gln Ile Gln Glu Pro Cys Lys Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ala
530 535 540

Thr Arg Glu Asp Pro Phe Lys Glu Lys Leu Leu Glu Ile Met Thr Arg
545 550 555 560
Ile Gln Thr Tyr Cys Gln Met Ser Pro Met Ser Asp Phe Gly Thr Gln
565 570 575
Pro Tyr Glu Gln Trp Ala Ile Gln Met Glu Lys Lys Ala Ala Lys Lys
580 585 590
Gly Asn Arg Lys Glu Arg Val Cys Ala Glu His Leu Arg Lys Tyr Asn
595 600 605

Glu Ala Leu Gln Ile Asn Asp Thr Ile Arg Met Ile Asp Ala Tyr Thr
610 615 620
His Leu Glu Thr Phe Tyr Asn Glu Glu Lys Asp Lys Lys Phe Ala Val
625 630 635 640
Ile Glu Asp Asp Ser Asp Glu Gly Gly Asp Asp Glu Tyr Cys Asp Gly
645 650 655
Asp Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr
660 665 670

Asp Arg Phe Leu Met Thr Leu Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys
675 680 685
Arg Leu Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu
690 695 700
Arg Asn Thr Ile Met Glu Gln Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg

705 710 715 720

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

725 730 735

Trp Ile Thr Glu Asn Glu Lys Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His

740 745 750

His Leu Ile Gly Ala Gly His Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln

755 760 765

Asn Glu Gln Lys Glu Val Ile Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn

770 775 780

Leu Leu Ile Ala Thr Thr Val Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu

785 790 795 800

Cys Asn Ile Val Ile Arg Tyr Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met

805 810 815

Val Gln Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu

820 825 830

Val Ala His Ser Gly Ser Gly Val Ile Glu His Glu Thr Val Asn Asp

835 840 845

Phe Arg Glu Lys Met Met Tyr Lys Ala Ile His Cys Val Gln Asn Met

850 855 860

Lys Pro Glu Glu Tyr Ala His Lys Ile Leu Glu Leu Gln Met Gln Ser

865 870 875 880

Ile Met Glu Lys Lys Met Lys Thr Lys Arg Asn Ile Ala Lys His Tyr

885 890 895

Lys Asn Asn Pro Ser Leu Ile Thr Phe Leu Cys Lys Asn Cys Ser Val

900 905 910

Leu Ala Cys Ser Gly Glu Asp Ile His Val Ile Glu Lys Met His His

915 920 925

Val Asn Met Thr Pro Glu Phe Lys Glu Leu Tyr Ile Val Arg Glu Asn

930 935 940

Lys Ala Leu Gln Lys Lys Cys Ala Asp Tyr Gln Ile Asn Gly Glu Ile

945 950 955 960

Ile Cys Lys Cys Gly Gln Ala Trp Gly Thr Met Met Val His Lys Gly
965 970 975
Leu Asp Leu Pro Cys Leu Lys Ile Arg Asn Phe Val Val Val Phe Lys
980 985 990

Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gln Tyr Lys Lys Trp Val Glu Leu Pro Ile
995 1000 1005
Thr Phe Pro Asn Leu Asp Tyr Ser Glu Cys Cys Leu Phe Ser Asp Glu
1010 1015 1020
Asp
1025

<210> 311
<211> 925
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> RIG-I/DDX58
<400> 311

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

115 120 125

Glu Cys Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Leu Gln Ile Cys Ser

130 135 140

Thr Lys Gly Met Met Ala Gly Ala Glu Lys Leu Val Glu Cys Leu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Glu Arg Asn Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Glu Lys Gly Ile

180 185 190

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

195 200 205

Ile Gln Ile Phe Tyr Gln Glu Asp Pro Glu Cys Gln Asn Leu Ser Glu

210 215 220

Asn Ser Cys Pro Pro Ser Glu Val Ser Asp Thr Asn Leu Tyr Ser Pro

225 230 235 240

Phe Lys Pro Arg Asn Tyr Gln Leu Glu Leu Ala Leu Pro Ala Met Lys

245 250 255

Gly Lys Asn Thr Ile Ile Cys Ala Pro Thr Gly Cys Gly Lys Thr Phe

260 265 270

Val Ser Leu Leu Ile Cys Glu His His Leu Lys Lys Phe Pro Gln Gly

275 280 285

Gln Lys Gly Lys Val Val Phe Phe Ala Asn Gln Ile Pro Val Tyr Glu

290 295 300

Gln Gln Lys Ser Val Phe Ser Lys Tyr Phe Glu Arg His Gly Tyr Arg

305 310 315 320

Val Thr Gly Ile Ser Gly Ala Thr Ala Glu Asn Val Pro Val Glu Gln

325 330 335

Ile Val Glu Asn Asn Asp Ile Ile Ile Leu Thr Pro Gln Ile Leu Val

340 345 350

Asn Asn Leu Lys Lys Gly Thr Ile Pro Ser Leu Ser Ile Phe Thr Leu

355 360 365

Met Ile Phe Asp Glu Cys His Asn Thr Ser Lys Gln His Pro Tyr Asn
370 375 380
Met Ile Met Phe Asn Tyr Leu Asp Gln Lys Leu Gly Gly Ser Ser Gly
385 390 395 400
Pro Leu Pro Gln Val Ile Gly Leu Thr Ala Ser Val Gly Val Gly Asp

405 410 415
Ala Lys Asn Thr Asp Glu Ala Leu Asp Tyr Ile Cys Lys Leu Cys Ala
420 425 430
Ser Leu Asp Ala Ser Val Ile Ala Thr Val Lys His Asn Leu Glu Glu
435 440 445
Leu Glu Gln Val Val Tyr Lys Pro Gln Lys Phe Phe Arg Lys Val Glu
450 455 460
Ser Arg Ile Ser Asp Lys Phe Lys Tyr Ile Ile Ala Gln Leu Met Arg

465 470 475 480
Asp Thr Glu Ser Leu Ala Lys Arg Ile Cys Lys Asp Leu Glu Asn Leu
485 490 495
Ser Gln Ile Gln Asn Arg Glu Phe Gly Thr Gln Lys Tyr Glu Gln Trp
500 505 510
Ile Val Thr Val Gln Lys Ala Cys Met Val Phe Gln Met Pro Asp Lys
515 520 525
Asp Glu Glu Ser Arg Ile Cys Lys Ala Leu Phe Leu Tyr Thr Ser His

530 535 540
Leu Arg Lys Tyr Asn Asp Ala Leu Ile Ile Ser Glu His Ala Arg Met
545 550 555 560
Lys Asp Ala Leu Asp Tyr Leu Lys Asp Phe Phe Ser Asn Val Arg Ala
565 570 575
Ala Gly Phe Asp Glu Ile Glu Gln Asp Leu Thr Gln Arg Phe Glu Glu
580 585 590
Lys Leu Gln Glu Leu Glu Ser Val Ser Arg Asp Pro Ser Asn Glu Asn

595 600 605
Pro Lys Leu Glu Asp Leu Cys Phe Ile Leu Gln Glu Glu Tyr His Leu

610 615 620

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

625 630 635 640

Asp Ala Leu Lys Asn Trp Ile Glu Gly Asn Pro Lys Leu Ser Phe Leu

645 650 655

Lys Pro Gly Ile Leu Thr Gly Arg Gly Lys Thr Asn Gln Asn Thr Gly

660 665 670

Met Thr Leu Pro Ala Gln Lys Cys Ile Leu Asp Ala Phe Lys Ala Ser

675 680 685

Gly Asp His Asn Ile Leu Ile Ala Thr Ser Val Ala Asp Glu Gly Ile

690 695 700

Asp Ile Ala Gln Cys Asn Leu Val Ile Leu Tyr Glu Tyr Val Gly Asn

705 710 715 720

Val Ile Lys Met Ile Gln Thr Arg Gly Arg Gly Arg Ala Arg Gly Ser

725 730 735

Lys Cys Phe Leu Leu Thr Ser Asn Ala Gly Val Ile Glu Lys Glu Gln

740 745 750

Ile Asn Met Tyr Lys Glu Lys Met Met Asn Asp Ser Ile Leu Arg Leu

755 760 765

Gln Thr Trp Asp Glu Ala Val Phe Arg Glu Lys Ile Leu His Ile Gln

770 775 780

Thr His Glu Lys Phe Ile Arg Asp Ser Gln Glu Lys Pro Lys Pro Val

785 790 795 800

Pro Asp Lys Glu Asn Lys Lys Leu Leu Cys Arg Lys Cys Lys Ala Leu

805 810 815

Ala Cys Tyr Thr Ala Asp Val Arg Val Ile Glu Glu Cys His Tyr Thr

820 825 830

Val Leu Gly Asp Ala Phe Lys Glu Cys Phe Val Ser Arg Pro His Pro

835 840 845

Lys Pro Lys Gln Phe Ser Ser Phe Glu Lys Arg Ala Lys Ile Phe Cys

850 855 860

Ala Arg Gln Asn Cys Ser His Asp Trp Gly Ile His Val Lys Tyr Lys
865 870 875 880
Thr Phe Glu Ile Pro Val Ile Lys Ile Glu Ser Phe Val Val Glu Asp
885 890 895
Ile Ala Thr Gly Val Gln Thr Leu Tyr Ser Lys Trp Lys Asp Phe His
900 905 910
Phe Glu Lys Ile Pro Phe Asp Pro Ala Glu Met Ser Lys

915 920 925

<210> 312
<211> 427
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> IRF-3, isoform 1
<400> 312
Met Gly Thr Pro Lys Pro Arg Ile Leu Pro Trp Leu Val Ser Gln Leu
1 5 10 15
Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gly Val Ala Trp Val Asn Lys Ser Arg Thr
20 25 30
Arg Phe Arg Ile Pro Trp Lys His Gly Leu Arg Gln Asp Ala Gln Gln
35 40 45

Glu Asp Phe Gly Ile Phe Gln Ala Trp Ala Glu Ala Thr Gly Ala Tyr
50 55 60
Val Pro Gly Arg Asp Lys Pro Asp Leu Pro Thr Trp Lys Arg Asn Phe
65 70 75 80
Arg Ser Ala Leu Asn Arg Lys Glu Gly Leu Arg Leu Ala Glu Asp Arg
85 90 95
Ser Lys Asp Pro His Asp Pro His Lys Ile Tyr Glu Phe Val Asn Ser
100 105 110

Gly Val Gly Asp Phe Ser Gln Pro Asp Thr Ser Pro Asp Thr Asn Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Thr Ser Asp Thr Gln Glu Asp Ile Leu Asp Glu Leu Leu

130 135 140

Gly Asn Met Val Leu Ala Pro Leu Pro Asp Pro Gly Pro Pro Ser Leu
145 150 155 160

Ala Val Ala Pro Glu Pro Cys Pro Gln Pro Leu Arg Ser Pro Ser Leu
165 170 175

Asp Asn Pro Thr Pro Phe Pro Asn Leu Gly Pro Ser Glu Asn Pro Leu
180 185 190

Lys Arg Leu Leu Val Pro Gly Glu Glu Trp Glu Phe Glu Val Thr Ala
195 200 205

Phe Tyr Arg Gly Arg Gln Val Phe Gln Gln Thr Ile Ser Cys Pro Glu
210 215 220

Gly Leu Arg Leu Val Gly Ser Glu Val Gly Asp Arg Thr Leu Pro Gly
225 230 235 240

Trp Pro Val Thr Leu Pro Asp Pro Gly Met Ser Leu Thr Asp Arg Gly
245 250 255

Val Met Ser Tyr Val Arg His Val Leu Ser Cys Leu Gly Gly Gly Leu
260 265 270

Ala Leu Trp Arg Ala Gly Gln Trp Leu Trp Ala Gln Arg Leu Gly His
275 280 285

Cys His Thr Tyr Trp Ala Val Ser Glu Glu Leu Leu Pro Asn Ser Gly
290 295 300

His Gly Pro Asp Gly Glu Val Pro Lys Asp Lys Glu Gly Gly Val Phe
305 310 315 320

Asp Leu Gly Pro Phe Ile Val Asp Leu Ile Thr Phe Thr Glu Gly Ser
325 330 335

Gly Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Leu Trp Phe Cys Val Gly Glu Ser Trp
340 345 350

Pro Gln Asp Gln Pro Trp Thr Lys Arg Leu Val Met Val Lys Val Val
355 360 365

Pro Thr Cys Leu Arg Ala Leu Val Glu Met Ala Arg Val Gly Gly Ala
370 375 380

Ser Ser Leu Glu Asn Thr Val Asp Leu His Ile Ser Asn Ser His Pro
385 390 395 400
Leu Ser Leu Thr Ser Asp Gln Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln Asp Leu Val
405 410 415
Glu Gly Met Asp Phe Gln Gly Pro Gly Glu Ser
420 425

<210> 313
<211> 503

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> IRF-7, isoform A
<400> 313

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

50 55 60
Val Ala Arg Gly Arg Trp Pro Pro Ser Ser Arg Gly Gly Gly Pro Pro
65 70 75 80
Pro Glu Ala Glu Thr Ala Glu Arg Ala Gly Trp Lys Thr Asn Phe Arg
85 90 95
Cys Ala Leu Arg Ser Thr Arg Arg Phe Val Met Leu Arg Asp Asn Ser
100 105 110
Gly Asp Pro Ala Asp Pro His Lys Val Tyr Ala Leu Ser Arg Glu Leu

115 120 125
Cys Trp Arg Glu Gly Pro Gly Thr Asp Gln Thr Glu Ala Glu Ala Pro
130 135 140
Ala Ala Val Pro Pro Pro Gln Gly Gly Pro Pro Gly Pro Phe Leu Ala

145 150 155 160

His Thr His Ala Gly Leu Gln Ala Pro Gly Pro Leu Pro Ala Pro Ala

165 170 175

Gly Asp Lys Gly Asp Leu Leu Leu Gln Ala Val Gln Gln Ser Cys Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Pro Gly Glu Gly Gln Glu Gly Leu Pro Leu Thr Gly Ala Cys

210 215 220

Ala Gly Gly Pro Gly Leu Pro Ala Gly Glu Leu Tyr Gly Trp Ala Val

225 230 235 240

Glu Thr Thr Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Ala Ala Leu Thr Thr Gly

245 250 255

Glu Ala Ala Ala Pro Glu Ser Pro His Gln Ala Glu Pro Tyr Leu Ser

260 265 270

Pro Ser Pro Ser Ala Cys Thr Ala Val Gln Glu Pro Ser Pro Gly Ala

275 280 285

Leu Asp Val Thr Ile Met Tyr Lys Gly Arg Thr Val Leu Gln Lys Val

290 295 300

Val Gly His Pro Ser Cys Thr Phe Leu Tyr Gly Pro Pro Asp Pro Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Pro Asp Gln Lys Gln Leu Arg Tyr Thr Glu Glu Leu Leu Arg His

340 345 350

Val Ala Pro Gly Leu His Leu Glu Leu Arg Gly Pro Gln Leu Trp Ala

355 360 365

Arg Arg Met Gly Lys Cys Lys Val Tyr Trp Glu Val Gly Gly Pro Pro

370 375 380

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

385 390 395 400

Asp Thr Pro Ile Phe Asp Phe Arg Val Phe Phe Gln Glu Leu Val Glu
405 410 415
Phe Arg Ala Arg Gln Arg Arg Gly Ser Pro Arg Tyr Thr Ile Tyr Leu
420 425 430
Gly Phe Gly Gln Asp Leu Ser Ala Gly Arg Pro Lys Glu Lys Ser Leu

435 440 445
Val Leu Val Lys Leu Glu Pro Trp Leu Cys Arg Val His Leu Glu Gly
450 455 460
Thr Gln Arg Glu Gly Val Ser Ser Leu Asp Ser Ser Ser Leu Ser Leu
465 470 475 480
Cys Leu Ser Ser Ala Asn Ser Leu Tyr Asp Asp Ile Glu Cys Phe Leu
485 490 495
Met Glu Leu Glu Gln Pro Ala
500

<210> 314
<211> 1184
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Elongation factor 1 (EF1) alpha promoter
<400> 314
cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60
tgggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360

ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttt 540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660

tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720

tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780

caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840

ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900

ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960

tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg 1020

cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080

tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140

agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 315

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

pagp-1 primer

<400> 315

gcgtgacggt tctgagtgct 20

<210> 316

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pagp-2 primer

<400> 316

cgtctttgct gccatcttcc g 21

<210> 317

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pagp-3 primer

<400> 317

acaataacga cgactccgat aagg 24

<210> 318

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pagp-4 primer

<400> 318

ctgctgaatg tgctgattaa cctg 24

<210> 319

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ansb-1 primer

<400> 319

accttagaag atagccgcaa agc 23

<210> 320

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ansb-2 primer

<400> 320

cagagacatg acacccacga ttatc 25

<210> 321

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ansb-3 primer

<400> 321

gcaaaccgct atccagaacg a 21

<210> 322

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ansb-4 primer

<400> 322

agtttaagta tgccgtggta ctgc 24

<210> 323

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> csgd-1 primer

<400> 323

cacttgcttt aagatttgta atggctag 28

<210> 324

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> csgd-2 primer

<400> 324

ggtgtattcg ctttcccatt tgtc 24

<210> 325

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> csgd-3 primer

<400> 325

tgtgctgtcc aggttaatgc c 21

<210> 326

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> csgd-4 primer

<400> 326

gacgacggtt ttctcgaagt ctc 23

<210> 327

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A peptide

<400> 327

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 328

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A peptide

<400> 328

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 329

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E2A peptide

<400> 329

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 330

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F2A peptide

<400> 330

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 331

<211> 3199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pSL0191

<400> 331

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggccttttt 1860

gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920

ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980

cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040

cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100

acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160

cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220

accatgatta cgccaagctc ggcgcgccat tgggatggaa ccgcgtgacg gttctgagtg 2280

ctaaatcaaa cgccgttaac ccgatactct ctcagattat tctctgttta tagtttgtta 2340

agattttatt caggttaatg ttgttattat cacagtcgaa tttttgaacg gtatgtatgt 2400

tgcgatgatc atcagaaagt attttcttat tattgctctc cttttgatgc catggctggc 2460

tattcgctag cctcaataag cttcttgcct ttctgcaggt tttgatgggg aagggtatgc 2520

ttcagttgtg aattaaaaag tcttaaaaaa caataagtag atagagttag ctaaaaatta 2580

acgcgatatt tatcactttt tcgcaaagtt cgactggaca aaatgcatca caattgttgt 2640

actggtatcc gacacagcat ttgtgtctat ttttcatgta aaggtaattt tgatgtctaa 2700

gattaaaggt aacgttaagt ggtttaatga atccaaagga ttcggtttca ttactccgga 2760

agatggcagc aaagacgtgg ttccatccca atacgcgtca attcactggc cgtcgtttta 2820

caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc 2880

cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg 2940

cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt 3000

atttcacacc gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 3060

cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca 3120

tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg 3180

tcatcaccga aacgcgcga 3199

<210> 332

<211> 3214

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pSL0230

<400> 332

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt gacgcgtatt gggattgacc 420

ttagaagata gccgcaaagc gctggttggc agcctgaagt aatctttcct ttttaaacaa 480

tggcgcagat cgtatctgcg ccttttttatt ctgtttttttc ctgcattttg ttatccatct 540

ctaaaaaata ctctctgtcg gatatatatc gctggttaat cgtatggcgt cacattattc 600

gtctgcaata tagagataat gcgaccagtt gacataactg gagatataac atggctagcc 660

tcaataagct tcttgccttt ctgcagacca aggacccaga ttatgtgaag ttgacgatgc 720

aaaatacggc tttgtcgctt ccggcacgct gaacccgcaa aaagcgcgtg tcttactgca 780

actggcgtta acccagacta aagatccaaa acagatccag acgatgttca atcagtatta 840

aagataatgc cccggtcgga aggccggggc tatctttgga agacctctcg cacaaccaac 900

actattatct tgctaattat catcctggtt atgataatcg tgggtgtcat gtctctggat 960

cccaatggcg cgccgagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 1020

tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt 1080

gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg 1140

ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg 1200

cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 1260

cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat 1320

aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 1380

gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc 1440

tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 1500

agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 1560

ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 1620

taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 1680

gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 1740

gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 1800

ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg 1860

ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 1920

gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 1980

caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 2040

taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 2100

aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa 2160

tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc 2220

tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct 2280

gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 2340

gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 2400

aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt 2460

gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 2520

ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc 2580

tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt 2640

atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 2700

ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 2760

ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 2820

ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 2880

atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 2940

gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 3000

tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 3060

ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 3120

acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc 3180

tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 3214

<210> 333

<211> 3141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pSL0196

<400> 333

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt gacgcgtatt gggatacact 420

tgctttaaga tttgtaatgg ctagattgaa aacagttaaa agtattttcg taaatatttt 480

tctctttctg gataatgggc tatttcaacc cacagcagtg caacatctgt cagtacttct 540

ggtgccttta ttttatgggg gcagctgtca gatgtgcgat taaaaaaagt ggagtttcat 600

catgtttaat gaagtccata gtagctagcc tcaataagct tcttgccttt ctgcagacca 660

aggacccaga ttatgtttca tgggcaaacg ataatctcag gcggtaaggc catgaaacgc 720

tatctgacct ggattgtagc agcagagtta ctgttcgcta ccggaaacct gcatgccaat 780

gaagttgaag tcgaggttcc cggattgtta accgaccaga ccgtctcttc gataggacat 840

gaattctatc gtgcattcag cgacaaatgg gaaagcgaat acaccatccc aatggcgcgc 900
cgagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa 960
ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga 1020
gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt 1080
gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct 1140
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 1200
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 1260
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 1320

ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 1380
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 1440
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 1500
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 1560
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 1620
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 1680
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 1740
ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 1800

ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 1860
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 1920
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 1980
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 2040
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 2100
aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 2160
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc 2220
gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 2280

agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 2340
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 2400
gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 2460
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc 2520
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 2580
ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 2640

ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 2700

gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 2760

cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc 2820

gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 2880

caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 2940

tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 3000

acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 3060

aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 3120

gtatcacgag gccctttcgt c 3141

<210> 334

<211> 1217

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> ansB (L-asparaginase II)

<400> 334

tggcgcagat cgtatctgcg ccttttttatt ctgtttttttc ctgcattttg ttatccatct 60

ctaaaaaata ctctctgtcg gatatatatc gctggttaat cgtatggcgt cacattattc 120

gtctgcaata tagagataat gcgaccagtt gacataactg gagatataac atggagtttt 180

tcaggaaaac ggcattagct gctctggtaa tgggtttcag cggcgcagcg ttcgctttac 240

cgaatatcac catcttagcg accggcggaa cgatcgctgg cggtggtgat tcagcaacaa 300

aatcaaatta tacggcaggt aaagtcggcg tcgaaaatct ggtggatgcc gttcctcaat 360

tgaaggacat tgcggtagtg aaaggcgagc aggtcgttaa cattggctcg caggatatga 420

acgatgaagt ctggctcacg ctggcgaaaa aaatcaatac cgagtgcgac agcaccgacg 480

gtttcgtgat cacccacggt actgatacga tggaagagac cgcttatttc ctcgatctga 540

ccgtgaaatg caataaaccg gtggtactgg tcggcgcgat gcgtccttcc acgtcaatga 600

gcgcagatgg cccgttcaac ctctataatg cggtagtaac agcggctgat aaacagtctg 660

ccaaccgcgg cgtgctggtg gtaatgaatg ataccgtcat ggacggacgc gacgtcacta 720

agaccaatac gactgacgtg gcgacgttta aagcggttaa ctacggcccg ctgggttata 780

tccacaacgg taaaattgac taccagcgta cgccagagcg taaacatacc acctccaccc 840

cgttcgacgt gtcgaagctg accgcgttgc cgaaagtcgg tatcgtttat aactatgcga 900

atgcgtccga tctgccggca aaagcgctgg tagacgcggg ttatgacggg atcgtgagcg 960

caggagtggg taacggcaac ctgtataaaa cggtctttga taccctggcg accgccgcgc 1020

acaacggtac ggtagtggtg cgttcttcac gagtgccgac tggcgcaacc acgcaggatg 1080

cggaagttga cgatgcaaaa tacggctttg tcgcttccgg cacgctgaac ccgcaaaaag 1140

cgcgtgtctt actgcaactg gcgttaaccc agactaaaga tccaaaacag atccagacga 1200

tgttcaatca gtattaa 1217

<210

> 335

<211> 664

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> csgD

<400> 335

gtggagtttc atcatgttta atgaagtcca tagtagtcat ggtcacacac tattgttgat 60

cacaaagcca tctctgcaag ctacggcatt attgcaacat ttaaagcaat cgctggccat 120

aaccggaaaa ctgcataata ttcaacgttc tctggaagat atctcggccg gttgcattgt 180

tttaatggat atgatggaag cggataagaa gcttatccac tattggcagg ataatttaag 240

ccgcaaaaac aataatataa aaacattatt gttaaatacc cctgacgatt atccctaccg 300

tgaaattgaa aactggcctc atattaacgg cgtgttttac gctactgaag accaggaaca 360

cgtggtcagc ggattacagg gtattctgcg tggcgaatgc tatttttcac aaaaattagc 420

cagttacctg attacgcact caggaaatta ccgctacaac agcaccgagt ccgcattact 480

cactcatcgc gaaaaagaga tcctcaataa gttacgtatt ggtgcctcta ataatgaaat 540

cgcgaggtcg ctatttatca gcgagaatac ggttaagaca catctttata atcttttcaa 600

aaagatagct gtcaaaaatc gcacccaggc agtttcatgg gcaaacgata atctcaggcg 660

gtaa 664

<210> 336

<211> 558

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223>

rck (resistance to complement killing)

<400> 336

atgaaaaaaa tcgttctgtc ctcactgctg ctgtccgcag ccgggctggc tgccgtaccg 60

gtggcacagg ctgacaccca ttccgtgtcg gtgggatatg cccagagccg gatagagcat 120

tttaaggata tccgtggggt gaacctgaaa taccgctatg aggctcagac gccgctggga 180

ctgatggcgt cgttcagttg gcagtcaggt aagcgcggag agtccggtgg cattcctggc 240

ggaatgagct ggcgtgatga tgtgaaggcg acgtactggt cgctgatggc gggtccggct 300

gtccgtgtga acgagctggt atctctgtat gcactggccg gtgccggtac cggcagggct 360

gaagtgaaag agcgtatcag catgccggga tacaacgggc ggttcacggg ttcggagcgc 420

agaacggggt ttgcctgggg agccggcgta cagtttaatc cggtggaaaa tgtggtcatc 480

gatctgggct atgagggaag taaagttggc gcagcgaaac tgaacggcgt taacgttggt 540

gtcggttacc ggttctga 558

<210> 337

<211> 4369

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> pagP

<400> 337

gaattccagc acggcggcca gcagcataca gatcaccaga atggtaataa tgtgcaactg 60

cggccccat ttaccgtcaa aaatcagtac gccgataatg ggcgtgaacg gcaaaagggc 120

ataaaacgcc ggggccgtgg tggtaatctc cgccacgtcc agcatctcat gtgaaatgtt 180

ctctttttta tccagatagc gttgccagaa aaagtgcgca atcgccatac cgataatggc 240

ggcgatggaa attggcagcg tagttttgaa cgcgaaatcg attaacggca tctccgccgc 300

ttttgcggct aaaaccacat cgccagacgt tggcgagagg atgatggcgg ccggagaggc 360

gcaaatagcc gccgccgcgc cgcggctaat gccgacgttg accatcaccg ggaagagagt 420

agccatgagc agtacgccaa gccccgtcgc ggaagagacg gccagcgaca tcaggcaggc 480

gacaaaatag gcggcaatca tcaacaggta gggcgagttt atgtactgta aaggtttcga 540

cgccagcttc acgaccatat cattcgcgcc gatatgcgtc atataggcgg caaagccgca 600

cagcatcatg atcatcatgc caagatcgcc gccgcgactc ataagcaaaa ttttgatgta 660

ttcaacaata tctgttgcgg tatagccggt actggtttcg ctggcaggta ataccttatg 720

ccccatcagc gcgctgataa taagcagagc cagaccgccg acaaataaaa cgccagtggc 780

ggaatatccc ttaatgatgt agcgcgctac acccacaata acgacgattc cgataaggac 840

ctctataact gttagcattg tttcccctgt cttatcgaca cccagagtaa aaataagaac 900

cacaaaagtg gtataaaaat gtaccgaata aaggatggcg ccttactgat taaaatcacg 960

gcgcggttat tttttcatgt cattgctaaa gatgaaatat acttatacga attttctgta 1020

gcactataag tattaattta ttgttatttt attgttttat ttgttgtgct ttgttttgtg 1080

ttttttgtga aagcttatta aggagcgcgt gacggttctg agtgctaaat caaacgccgt 1140

taacccgata ctctctcaga ttattctctg tttatagttt gttaagattt tattcaggtt 1200

aatgttgtta ttatcacagt cgaatttttg aacggtatgt atgttgcgat gatcatcaga 1260

aagtattttc ttattattgc tctccttttg atgccatggc tggctattcc ttcagtctct 1320

gcggcggata aaggggggtt taacacgttt accgataacg tcgcagaaac gtggcgacag 1380

cctgagcatt atgatttgta tgtccccgcc attacctggc atgcgcgctt tgcctacgat 1440

aaagagaaaa cggatcgcta taacgagcgg ccgtggggcg ttggttttgg tcagtcccgc 1500

tgggacgaca aaggcaactg gcatggcctc tatatgatgg cctttaaaga ttcatttaac 1560

aaatgggaac ccataggcgg ttatggctgg gaaaaaacct ggcgaccgct ggaagacgat 1620

aattttcgcc ttggactggg ctttaccgca ggcgttaccg cgcgcgacaa ctggaattat 1680

attcccatcc ctgtgctgtt gcctttagcg tcgataggct atggtcccgc tacctttcag 1740

atgacctaca ttccgggttc gtataacaac ggaaacgtct atttcgcctg gatgcgtttc 1800

cagttttgat ggggaagggt atgcttcagt tgtgaattaa aaagtcttaa aaaacaataa 1860

gtagatagag ttagctaaaa attaacgcga tatttatcac tttttcgcaa agttcgactg 1920

gacaaaatgc atcacaattg ttgtactggt atccgacaca gcatttgtgt ctatttttca 1980

tgtaaaggta attttgatgt ctaagattaa aggtaacgtt aagtggttta atgaatccaa 2040

aggattcggt ttcattactc cggaagatgg cagcaaagac gtgtttgtac acttctctgc 2100

aatccagacc aatggtttta aaactctggc tgaaggtcag cgcgtagagt tcgaaatcac 2160

taacggtgcc aaaggccctt ccgctgcaaa cgtaactgct ctgtaagcat acgtccgaca 2220

gcaagatttc aaaacccgcc ctttcggcgg gtttttttttg cgcttaacgc gccgctgcgg 2280

cggaaaatag ccagaatgcc agcgccgtca tggcaaacga acctaacagg ttaatcagca 2340

cattcagcag cgcccagcca aagcgcccct cttgcagcaa gaataccact tcggcagaaa 2400

aagtagaaaa ggtcgtcagg ccgccgcaaa agccggttgt gatgagcact ttccacatcg 2460

gatcgatatg tgtcatgcgg ttaaaccagg cgaaccccat gccgataata aacgcgccaa 2520

gcaaatttgc tgttagcgta ccgatgggaa tcgcctgatg aagcggatta aaacgcatac 2580

tgagcatcca ccgggctacg ctccccgttc caccgccgat aaaaactgct aaaagaagct 2640

gtaacactgc cgaatccttt atttaattgc tatacaagag gagtgtaacg ccgaacacgc 2700

ataattggcg agtcctgaca gaggtgtggg aggggatatg ttcgttgcag ccgggcagtt 2760

tgtggtgagt tctgtatggg aagagaatgc gcaagtttgc gtttcgttaa tggctcaggc 2820

ggcgggccgc ggcgtatcgc ttctggtgtt gcctgagggg atattagcgc gagatgacat 2880

cgaccttgac ctgccgattc gcgccgcgca gccgctggat ggcgcgttta tgacgcggct 2940

tctggaagaa agcgctcata ataatatgac gacgatattc actatccttg tcccgtcaac 3000

gcctggacgg gcggttaata tgctggtggc gctacgggcg ggtcacattg tcgcgcgtta 3060

cgcgaagctg catctctatg atgcgttttc gatgcaagaa tcccaaagta ttgatgccgg 3120

aaccgttatc gcgcctgtgc tggacgtgga gggggttaag gtggggctta tgacctgtta 3180

tgacctgcgc tttccggaca tggcgctagc gctggcttta caggggggctg acgtattggc 3240

gctgccgacg ggctgggttc gcggcccgtt gaaagagcag cagtggtcga cgctgctggc 3300

ggcgagagcg ctggatacca ccagctatat gattgcggcc ggggagtgtg gtaatcgtaa 3360

tattggtcaa agtcgtatta tcgatccgtt gggggtaacg atagccgcgg cagccgatcg 3420

tccggcgctg atcgtcgcgg aaatattcag agaacgaata gaccaggtgc gggagcaact 3480

tcctcttttg cagcaacgac gatttgcgcc accgcaatta ttatgatgtt tttttacgca 3540

aagcttgatt caccttgtta cagattgcta ttgtgtgcgc gcgtcgaaag accgttaata 3600

ttctcaggtt aatccggcgc gttacgcagc ctgtttttag tgaagaaggt atctatgggt 3660

gagattagta ttaccaaact gctggtggtt gccgcactgg ttgttctgct gtttggtacc 3720

aagaagttac gtacgctggg cggagacctg ggcacggcga ttaaaggatt caagaaagca 3780

atgaacgatg aagacgcggg cgttaagaaa gacgtcgacg gtagcgttca ggctgaaaaa 3840

ctctcgcaca aagagtaatt gcgcgatgcg cttgctccgc agagtaaaaa aaccggcgag 3900

ttgccggttt tttttgcctg aaatgtaagc gtctattaca cgatcatttc acttccatgc 3960

ctttggcctg gagatcagca tggtacgaag aacgtacaaa ggggccacag gcggcatggg 4020

taaagcccat cgccagggct tccgctttca tctcgtcaaa ctcttccggg ctgacataac 4080

gctgtaccgg caggtgatgg cggcttggct gtagatactg accaagcgtc agcatggtaa 4140

cgccgtgacg gcgtaagtcg cgcataacct caatgatttc cgcattggtt tcgcctaagc 4200

ccaccatcag acccgatttt gtcggaattt ccgggtgcgc ttctttgaag cgttccagta 4260

atttcagcga ccagttgtaa tcggcgcccg gacgaacctg gcggtaaata cgcggcacgt 4320

tttccaggtt gtggttaaac acatccggcg gcgtcgcgtt aaggatatc 4369

<210> 338

<211> 1500

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> fliC

<400> 338

aaggaaaaga tcatggcaca agtcattaat acaaacagcc tgtcgctgtt gacccagaat 60

aacctgaaca aatcccagtc cgctctgggc accgctatcg agcgtctgtc ttccggtctg 120

cgtatcaaca gcgcgaaaga cgatgcggca ggtcaggcga ttgctaaccg ttttaccgcg 180

aacatcaaag gtctgactca ggcttcccgt aacgctaacg acggtatctc cattgcgcag 240

accactgaag gcgcgctgaa cgaaatcaac aacaacctgc agcgtgtgcg tgaactggcg 300

gttcagtctg ctaacagcac caactcccag tctgacctcg actccatcca ggctgaaatc 360

acccagcgcc tgaacgaaat cgaccgtgta tccggccaga ctcagttcaa cggcgtgaaa 420

gtcctggcgc aggacaacac cctgaccatc caggttggtg ccaacgacgg tgaaactatc 480

gatatcgatc tgaagcagat caactctcag accctgggtc tggatacgct gaatgtgcaa 540

caaaaatata aggtcagcga tacggctgca actgttacag gatatgccga tactacgatt 600

gctttagaca atagtacttt taaagcctcg gctactggtc ttggtggtac tgaccagaaa 660

attgatggcg atttaaaatt tgatgatacg actggaaaat attacgccaa agttaccgtt 720

acgggggggaa ctggtaaaga tggctattat gaagtttccg ttgataagac gaacggtgag 780

gtgactcttg ctggcggtgc gacttccccg cttacaggtg gactacctgc gacagcaact 840

gaggatgtga aaaatgtaca agttgcaaat gctgatttga cagaggctaa agccgcattg 900

acagcagcag gtgttaccgg cacagcatct gttgttaaga tgtcttatac tgataataac 960

ggtaaaacta ttgatggtgg tttagcagtt aaggtaggcg atgattacta ttctgcaact 1020

caaaataaag atggttccat aagtattaat actacgaaat acactgcaga tgacggtaca 1080

tccaaaactg cactaaacaa actgggtggc gcagacggca aaaccgaagt tgtttctatt 1140

ggtggtaaaa cttacgctgc aagtaaagcc gaaggtcaca actttaaagc acagcctgat 1200

ctggcggaag cggctgctac aaccaccgaa aacccgctgc agaaaattga tgctgctttg 1260

gcacaggttg acacgttacg ttctgacctg ggtgcggtac agaaccgttt caactccgct 1320

attaccaacc tgggcaacac cgtaaacaac ctgacttctg cccgtagccg tatcgaagat 1380

tccgactacg cgaccgaagt ttccaacatg tctcgcgcgc agattctgca gcaggccggt 1440

acctccgttc tggcgcaggc gaaccaggtt ccgcaaaacg tcctctcttt actgcgttaa 1500

<210> 339

<211> 1528

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> fljB

<400> 339

aaattttatg gcacaagtaa tcaacactaa cagtctgtcg ctgctgaccc agaataacct 60

gaacaaatcc cagtccgcac tgggcaccgc tatcgagcgt ctgtcttctg gtctgcgtat 120

caacagcgcg aaagacgatg cggcaggtca ggcgattgct aaccgtttca ccgcgaacat 180

caaaggtctg actcaggctt cccgtaacgc taacgacggt atctccattg cgcagaccac 240

tgaaggcgcg ctgaacgaaa tcaacaacaa cctgcagcgt gtgcgtgaac tggcggttca 300

gtctgctaac agcaccaact cccagtctga cctcgactcc atccaggctg aaatcaccca 360

gcgcctgaac gaaatcgacc gtgtatccgg ccagactcag ttcaacggcg tgaaagtcct 420

ggcgcaggac aacaccctga ccatccaggt tggcgccaac gacggtgaaa ctatcgatat 480

cgatctgaag cagatcaact ctcagaccct gggtctggac tcactgaacg tgcagaaagc 540

gtatgatgtg aaagatacag cagtaacaac gaaagcttat gccaataatg gtactacact 600

ggatgtatcg ggtcttgatg atgcagctat taaagcggct acgggtggta cgaatggtac 660

ggcttctgta accggtggtg cggttaaatt tgacgcagat aataacaagt actttgttac 720

tattggtggc tttactggtg ctgatgccgc caaaaatggc gattatgaag ttaacgttgc 780

tactgacggt acagtaaccc ttgcggctgg cgcaactaaa accacaatgc ctgctggtgc 840

gacaactaaa acagaagtac aggagttaaa agatacaccg gcagttgttt cagcagatgc 900

taaaaatgcc ttaattgctg gcggcgttga cgctaccgat gctaatggcg ctgagttggt 960

caaaatgtct tataccgata aaaatggtaa gacaattgaa ggcggttatg cgcttaaagc 1020

tggcgataag tattacgccg cagattacga tgaagcgaca ggagcaatta aagctaaaac 1080

tacaagttat actgctgctg acggcactac caaaacagcg gctaaccaac tgggtggcgt 1140

agacggtaaa accgaagtcg ttactatcga cggtaaaacc tacaatgcca gcaaagccgc 1200

tggtcatgat ttcaaagcac aaccagagct ggcggaagca gccgctaaaa ccaccgaaaa 1260

cccgctgcag aaaattgatg ccgcgctggc gcaggtggat gcgctgcgct ctgatctggg 1320

tgcggtacaa aaccgtttca actctgctat caccaacctg ggcaataccg taaacaatct 1380

gtctgaagcg cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg accgaagttt ccaacatgtc 1440

tcgcgcgcag attctgcagc aggccggtac ttccgttctg gcgcaggcta accaggtccc 1500

gcagaacgtg ctgtctctgt tacgttaa 1528

<210> 340

<211> 537

<212> DNA

<213> Yersinia enterocolitica

<220>

<223> ail (attachment invasion locus)

<400> 340

atgaaaaaga cattactagc tagttctcta atagcctgtt tatcaattgc gtctgttaat 60

gtgtacgctg cgagtgaaag tagtatttct attggttatg cgcaaagcca tgtaaaagaa 120

aatggggata cattggataa tgaccctaaa ggttttaacc tgaagtaccg ttatgaactc 180

gatgataact ggggagtaat aggttcgttt gcttatactc atcagggata tgatttcttc 240

tatggcagta ataagtttgg tcatggtgat gttgattact attcagtaac aatggggcca 300

tctttccgca tcaacgaata tgttagcctt tatggattac tgggggccgc tcatggaaag 360

gttaaggcat ctgtatttga tgaatcaatc agtgcaagta agacgtcaat ggcatacggg 420

gcaggggtgc aattcaaccc acttccaaat tttgtcattg acgcttcata tgaatactcc 480

aaactcgata gcacaaaagt tggcacctgg atgcttggtg cagggtatcg attctaa 537

<210> 341

<211> 1286

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> pgtE (outer membrane serine protease)

<400> 341

tgattataga ttgcttatta ttcacctgag catcaaattc tatttcttaa cttcaatata 60

aggtaaaaat gcgtcaagtt ctctggcgta ataaatgtac tcttgtccga cgatttgaca 120

agatgaaaac ttcatcacct ctccagatta catctgaata tgaggacaag agaaatgaaa 180

aaacatgcta ttgcagtaat gatgatcgcc gtattttctg agtcggttta tgcggagtct 240

gccttattta ttccggacgt ctctcctgat agcgtcacga catccctttc cgtgggtgtg 300

ttaaatggta aatccaggga gctggtttat gataccgaca ccgggcggaa gctgagtcaa 360

ctggattgga aaataaaaaa tgtcgccacg ttgcaggggg atttatcatg ggaaccctat 420

tcgttcatga cgctggacgc ccgcggctgg acgtctttgg cgtcgggatc gggtcatatg 480

gttgaccatg actggatgag cagtgagcag ccaggctgga ccgatcgttc aattcatccg 540

gacaccagcg tcaactatgc taatgaatac gatttgaacg tgaaaggttg gttattgcag 600

ggcgataact acaaggcggg cgtaacagcg ggctatcagg aaacccgttt tagctggacg 660

gcaagaggcg ggtcttatat ttatgataat ggtcgatata ttggtaattt tcctcatggc 720

gtgcgcggca taggttatag ccagcgtttc gaaatgccct atatcgggct ggcgggtgat 780
tatcgtatta atgactttga gtgtaatgta ctgtttaaat acagcgactg ggtaaatgcg 840
catgataatg acgaacacta catgcgcaaa cttaccttcc gtgaaaaaac ggaaaattca 900
cgatattatg gcgcttctat tgacgccgga tattatatta ccagtaatgc aaaaatcttt 960
gctgagtttg cttacagtaa atatgaagaa ggtaagggcg gtacgcaaat catagataaa 1020
accagcggtg atacggcgta ttttggtggc gatgccgcag gtatagctaa taataactat 1080
acggttaccg cggggttgca gtatcgcttc tagaccacat cgggatgtca tcggtcataa 1140
ccggccgatg acgacttttt gctgaacgta tggcatgtcc ggtgatattg catggggca 1200

ataaaagcaa catgaaaggg aaaccgctcg aaaggttatg cagcaagaag agaatgtcct 1260
gggtatcaat ggtgtcccct gcagta 1286

<210> 342
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><223> 4-1BBL
<400> 342

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

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val

225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 343

<211> 4899

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> 4-1BBL

<400> 343

agtctctcgt catggaatac gcctctgacg cttcactgga ccccgaagcc ccgtggcctc 60

ccgcgccccg cgctcgcgcc tgccgcgtac tgccttgggc cctggtcgcg gggctgctgc 120

tgctgctgct gctcgctgcc gcctgcgccg tcttcctcgc ctgcccctgg gccgtgtccg 180

gggctcgcgc ctcgcccggc tccgcggcca gcccgagact ccgcgagggt cccgagcttt 240

cgcccgacga tcccgccggc ctcttggacc tgcggcaggt gagacgtgcc ccgaccctcg 300

gtagctggtc tcgcgggaga cccctaccgc ccctctggga ctcccttctc cctcccgcac 360

ccccagggac acctgttcta cactcccggc cggggagagg agacccaccg gggctcccat 420

tctccatcta gcaccgaggc cgggggggca cacctttcat cccgcacccc tacgacacct 480

catctgtacc ccaggccggg ggcggggagg agaccgccca acagttcttt ttggaccccc 540

caagggtctc cttcttctag tccgggggggc acccctttca tcctgcgccc gctacgagac 600

cctatctgta tcccgggagg gggagaggag acccccacaa gttctttttg gacctccaag 660

ggctctcctt ctccgtcttg cacgggaggg cacccctttc attccgcatc ccgagacccc 720

atcagcaccc caggccagga ggaggagacc cccacagtcc tcaacccctc agggatacgt 780

cttctgcacc ccgggtcgga gaaaggctgg cttccctcca tgtggcagtg ggtgggggca 840

cccctcttca ttccgcattc ccaaggcacc ccatctgcac cctggacggg ggaccctccg 900

cggttctcca accctcgacg gcttcctttc tctatgtagg acttaggaca ttgagggcac 960

ctctttttac cccgcacccc cacaagctct gcatctctgg ggggaacctt ttttccatcc 1020

ccgatccgag gggggcactt cctctttatc tgggaccgcc aaggagaccc ccagttcctt 1080

tgctaactcc caaagagcct tatccccaac atctgaggta cccctctccc tttcaagacc 1140

cccaggggaa taccccccaag ggggctggaa agaagaggga tcgcttttcc ctcctgaatt 1200

cttggagatc tgtccttggg gcaggttgag ccaccagctt cgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 1260

tgtgtgtgtg tgttcgtgtt tgtgtgggtg tttgtgttcg tgtgtgtgtg ttcgtgtggg 1320

ggtgcgtatg tgtgtgtgtt cgtgggtgtg tttgtgttcg tgtgggtgtg tgttcgtgtg 1380

ggtgtttgtg tttgttcgtt cgtgtgggtg tttgtgttca tgtgggtgtg tttggatatt 1440

tgtgttcgtg tgtgtctgtg tgtgttcgtg tgggtgtttg tgtgtgtttg tgtttgcgtt 1500

cgtgtgtgtg ttcgtgtttg ttcgtgtgtc tgtgtgttaa tgtgggtgtt cgtgtgtgtg 1560

ttcgtttgtg tttgtgttcg tgtgtttgtg tgtttgtgtg tgtgtgtgtg cggtctctgt 1620

tctttagttg ggagggaagg gaagcgtagg cttcaggtcg gcacagactc tggggaccct 1680

gacagctgaa gtgagtgggg acagaacctc cattttctag gggaaccccc atccactttc 1740

ctcctttcta cttttaacag ggcatgtttg cgcagctggt ggcccaaaat ggtaagtatc 1800

ctccgccact tccggtccct ggcccccccac catccccacc ccgggatacg aagaaggggg 1860

aacctggaga gtgaggctct gccgcacact ggctttgacc cttgaccgct gctgtctctg 1920

aaagctgcta cttcccctct ttgaacgcca ccgatccctc tttctgactt gctctgactc 1980

tctggatgcc atggcctccc catcagaccc ccatctgggc ccacctggga cccctgccct 2040

ctcagagctg gggcttgaca cccccaaccc ccagcctggt tttgtgtctc tggcctcctt 2100

cttttcgaaa ccctcttccc cgctgctttt cttccctctt tcctgcccct tccccactct 2160

cccagcctct cttccctacc tcttcccctc gcccagagcc tcctccttac tcccattctc 2220

ttccccatcc ccaggccctc ctcctgtccc cttccctccc cctagaccct cctccctgcc 2280

ccttccccaa accctcccca gccccatgct ctcccagttt ccaagacact cctcccagca 2340

ccttccctcc ccgtccagag acttcttccc cgctcgagac ctcttccccc ttcccctccc 2400

agagaccccc ttcccccttc ccctctccat ctagagatca cttcccccct tcccctcccc 2460

ctccagaaac cccttccccc ttccctctcc cctccagaga ccccttcccc ctccaaagac 2520

cccttccccc ttccttcccc ctccagagac ccctttcccc ttccctcccc ttccagagac 2580

cccttccccc tccccctcca aagacccctt cctccttccc ctccctctcc agagacccct 2640

tcccccttcc ctctccctcc agagacccct tcccccttcc ctgccccctc cagagtcccc 2700

ttcccctcca gaggcccctt ccccccttccc cctcccccctc cagagacacc ttctcccttc 2760

tcccccctcca gagacccctt ccccccttccc tcccccctgcc taagactccc ctccctgcca 2820

tcttctctcc ttggtgcttc cttctcccta acccctcccc caccccttcc tgctcccttt 2880

gcctttcttc gaagtcctct cttaccaggt cccctgtcca cccctcttaa agttcccttg 2940

attccctgat ggatccttcc tctagaactt cctcctttcc taacagtctt ccctctccct 3000

cctagctccc tgtccacctc tcctctcccc tttccttcct tctctccctt ctcctccccc 3060

catctccatc ctgtccgaga tctgctgctc cctccaaccc cctcaccgcc ctctccagga 3120

gtccccttac ccctccccga ggcctcttcc agccagactc gcctggcctt ttgcttttca 3180

ccccctcttc ctcttcctgc atgtctttcc ccgcacccgc atcactcctt ccccacccaa 3240

cctcttggag ttttgccctg tcccgactct tgtccttctc cctggattcc cttcctctgt 3300

tctatccccg tctttccctc ccctagctct acccctgctc agagtcccgc ccccaacaac 3360

ctcagttctc ttcaatcagc acccccccaa cgcccccccc acccaggctc cccgctctgc 3420

tcccctgtcc cgctccctgc cccgccattc cccgcccccc ggcccctgac ccgttctttt 3480

ctcccagggc tgcgctgaca tgttcggtgc tcagccacgc tcagctgtgc tgggacatgc 3540

tcagctaagc taagtgcatg ctttcctccc acagttctgc tgatcgatgg gcccctgagc 3600

tggtacagtg acccaggcct ggcaggcgtg tccctgacgg ggggcctgag ctacaaagag 3660

gacacgaagg agctggtggt ggccaaggct ggagtctact atgtcttctt tcaactagag 3720

ctgcggcgcg tggtggccgg cgagggctca ggctccgttt cacttgcgct gcacctgcag 3780

ccactgcgct ctgctgctgg ggccgccgcc ctggctttga ccgtggacct gccacccgcc 3840

tcctccgagg ctcggaactc ggccttcggt ttccagggcc gcttgctgca cctgagtgcc 3900

ggccagcgcc tgggcgtcca tcttcacact gaggccaggg cacgccatgc ctggcagctt 3960

acccagggcg ccacagtctt gggactcttc cgggtgaccc ccgaaatccc agccggactc 4020

ccttcaccga ggtcggaata acgtccagcc tgggtgcagc ccacctggac agagtccgaa 4080

tcctactcca tccttcatgg agacccctgg tgctgggtcc ctgctgcttt ctctacctca 4140

aggggcttgg caggggtccc tgctgctgac ctccccttga ggaccctcct cacccactcc 4200

ttccccaagt tggaccttga tatttattct gagcctgagc tcagataata tattatatat 4260

attatatata tatatatatt tctatttaaa gaggatcctg agtttgtgaa tggacttttt 4320

tagaggagtt gttttggggg gggggggggtc ttcgacattg ccgaggctgg tcttgaactc 4380

ctggacttag acgatcctcc tgcctcagcc tcccaagcaa ctgggattca tcctttctat 4440

taattcattg tacttatttg cttatttgtg tgtattgagc atctgtaatg tgccagcatt 4500

gtgcccaggc tagggggcta tagaaacatc tagaaataga ctgaaagaaa atctgagtta 4560

tggtaatacg tgaggaattt aaagactcat ccccagcctc cacctcctgt gtgatacttg 4620

ggggctagct tttttctttc tttctttttt ttgagatggt cttgttctgt caaccaggct 4680

agaatgcagc ggtgcaatca tgagtcaatg cagcctccag cctcgacctc ccgaggctca 4740

ggtgatcctc ccatctcagc ctctcgagta gctgggacca cagttgtgtg ccaccacact 4800

tggctaactt tttaattttt ttgcggagac ggtattgcta tgttgccaag gttgtttaca 4860

tgccagtaca atttataata aacactcatt tttcctccc 4899

<210> 344

<211> 309

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><223> 4-1BBL

<400> 344

Met Asp Gln His Thr Leu Asp Val Glu Asp Thr Ala Asp Ala Arg His
1 5 10 15

Pro Ala Gly Thr Ser Cys Pro Ser Asp Ala Ala Leu Leu Arg Asp Thr
20 25 30

Gly Leu Leu Ala Asp Ala Ala Leu Leu Ser Asp Thr Val Arg Pro Thr
35 40 45

Asn Ala Ala Leu Pro Thr Asp Ala Ala Tyr Pro Ala Val Asn Val Arg
50 55 60

Asp Arg Glu Ala Ala Trp Pro Pro Ala Leu Asn Phe Cys Ser Arg His
65 70 75 80

Pro Lys Leu Tyr Gly Leu Val Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu Ile Ala
85 90 95

Ala Cys Val Pro Ile Phe Thr Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr
100 105 110

Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln
115 120 125

Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly
130 135 140
Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Cys
145 150 155 160
Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr
165 170 175
Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val
180 185 190

Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro
195 200 205
Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val
210 215 220
Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu Thr
225 230 235 240
Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser
245 250 255

Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly
260 265 270
Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu
275 280 285
Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro
290 295 300
Asp Asn Pro Trp Glu
305
<210> 345
<211> 2472
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<223

> 4-1BBL

<400> 345

gagaaagttc cgggagtcga ggggcggagc gcggagcccg ggaaccccgc ggctgccctc 60

cctcccttcc ctccccggaa aaggcgcctc ggtagcctat aaagcacggg cactggcggg 120

agacgtgcac tgaccgaccg tggtaatgga ccagcacaca cttgatgtgg aggataccgc 180

ggatgccaga catccagcag gtacttcgtg cccctcggat gcggcgctcc tcagagatac 240

cgggctcctc gcggacgctg cgctcctctc agatactgtg cgccccacaa atgccgcgct 300

ccccacggat gctgcctacc ctgcggttaa tgttcgggat cgcgaggccg cgtggccgcc 360

tgcactgaac ttctgttccc gccacccaaa gctctatggc ctagtcgctt tggttttgct 420

gcttctgatc gccgcctgtg ttcctatctt cacccgcacc gagcctcggc cagcgctcac 480

aatcaccacc tcgcccaacc tgggtacccg agagaataat gcagaccagg tcacccctgt 540

ttcccacatt ggctgcccca acactacaca acaggtgagg ctcatctcat ccctagggga 600

ctctttctta ccttctggaa gcatcgctgc accgacaggg agagaacagc acttcctccc 660

caccccgcc ccgccccgcc ccgccccgcc tcgctctgct cctgctactc cgcttgaagc 720

acccctctc catctcgcac tcagaggaaa tccctttgcg tcttgacccc ttgaatgaac 780

ctatgaaacc tgggggagaa ctcccgaggg tgcaccgcag ttcccttcag tcccacttag 840

gccttcaggg ctctccttct ccatccaaag ttggacgccc caatgtgtgc tgggccgtat 900

gagttcctat ctgcttcttt aggatgtaag gtaccatcta cctttatttt tctttcttcc 960

cagggctctc ctgtgttcgc caagctactg gctaaaaacc gtgagtgccc cctgatttat 1020

ttccagcggg tcccgcaggg aggttgaaca aggggacctg ttcaaccttc tagtcatgtc 1080

cctctccctc acttactcag cctttctcac ttgctgtcac agctccaact gtcatccttg 1140

ggaccccatc caggttttca gagaattgag aattctcacc cccagctgac tctgggagat 1200

ctccttttct cttttccttc ctctatccct cccatgtagc ccaggcttcc tccaaattca 1260

ttatgtagct gaggctggcc gccctgctgc caacacctcc aatgggctgg gataaatgaa 1320

tgcctttggg cttcaggcac cctattgagc ccgagcccta gtctctccct gtcaagtctt 1380

agttgtcaaa ttatttgccc tcagagatga ctctcttcct gcactctcca tatcccacct 1440

ctctcccagt tttgttcatc cctctcttac tcctctgatt tctctctctt cttttctcct 1500

ctcccccttc ccctcttgtg gccccctttac tcagctcctt ccaggagtcc atgtgcatct 1560

ccgctcttaa cactctagac cctcgcccct ttgcctcgtt cttattccac aaccactttc 1620

ttaaattgta tcccttctgg gtggcccctc cctccttttc ttctgttttg tctcctctct 1680

ttcctcccca ttcccatggt ttcccccctc ccccacaccc cgcaaccctc agcaactcag 1740

tgttcttttt ctagaagcat cgttgtgcaa tacaactctg aactggcaca gccaagatgg 1800

agctgggagc tcatacctat ctcaaggtct gaggtacgaa gaagacaaaa aggagttggt 1860

ggtagacagt cccgggctct actacgtatt tttggaactg aagctcagtc caacattcac 1920
aaacacaggc cacaaggtgc agggctgggt ctctcttgtt ttgcaagcaa agcctcaggt 1980
agatgacttt gacaacttgg ccctgacagt ggaactgttc ccttgctcca tggagaacaa 2040
gttagtggac cgttcctgga gtcaactgtt gctcctgaag gctggccacc gcctcagtgt 2100
gggtctgagg gcttatctgc atggagccca ggatgcatac agagactggg agctgtctta 2160
tcccaacacc accagctttg gactctttct tgtgaaaccc gacaacccat gggaatgaga 2220
actatccttc ttgtgactcc tagttgctaa gtcctcaagc tgctatgttt tatggggtct 2280
gagcaggggt cccttccatg actttctctt gtctttaact ggacttggta tttattctga 2340

gcatagctca gacaagactt tatataattc actagatagc attagtaaac tgctgggcag 2400
ctgctagata aaaaaaaatt tctaaatcaa agtttatatt tatattaata tataaaaata 2460
aatgtgtttg ta 2472

<210> 346
<211> 589
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional
Regulatory Element (WPRE)
<400> 346

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 60
ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120

atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg 180
tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240
ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt cccctccct 300
attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg 360
ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaagctga cgtcctttcc atggctgctc 420
gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 480
aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt 540
cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgc 589

<210> 347

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory
Element (HPRE)

<400> 347

atgcatgtat tcaatctaag caggctttca ctttctcgcc aacttacaag gcctttctgt 60

gtaaacaata cctgaacctt taccccgttg cccggcaacg gccacctctg tgccaagtgt 120

ttgctgacgc aacccccact ggctggggct tggtcatggg ccatcagcgc atgcgtggaa 180

ccttttcggc tcctctgccg atccatactg cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca 240

gcaggtctgg agcaaacatt atcgggactg ataactctgt tgtcctatcc cgcaaatata 300

catcgtttcc atggctgcta ggctgtgctg ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg 360

tttacgtccc gtcggcgctg aatcctgcgg acgacccttc tcggggtcgc ttgggactct 420

ctcgtcccct tctccgtctg ccgttccgac cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg 480

actccccgtc tgtgccttct catctgccgg accgtgtgca cttcgcttca cctctgcacg 540

tcgcatggag accaccgtga acgcccacca aatattgccc aaggtcttac ataagaggac 600

tcttggactc tcagcaatgt caacgaccga ccttgaggca tacttcaaag actgtttgtt 660

taaagactgg gaggagttgg gggaggagat taggttaaag gtctttgtac taggaggctg 720

taggcataaa ttggtctgcg caccagcacc atg 753

<210> 348

<211> 398

<212> PRT

<213> Danio rerio

<220>

<223> WT Zebrafish STING (zfSTING)

<400> 348

Met Ser Val Met Gly Glu Asp Ala Leu Val Pro Arg Ala Arg Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Val Met Cys Ala Ala Gly Leu Gly Phe Leu Thr Leu Ala Val
20 25 30

Ala Trp Leu Leu Asp Ser Asp Lys Phe Ser Glu Arg Ala Gly Ile Ile

35 40 45

Ala Phe Gly Leu Met Leu Glu Arg Phe Ile Tyr Cys Ile Cys Leu Leu
50 55 60
Ala Glu Glu Leu Leu Phe His Ser Arg Gln Arg Tyr His Gly Arg Met
65 70 75 80
Ser Glu Ile Phe Arg Ala Cys Phe Arg Gly Ser Gly Ile Leu Gly Met
85 90 95
Cys Ala Ile Phe Leu Met Leu Met Leu Gly Gly Val Ser Phe Ser Val
100 105 110

Lys Gln Trp Ser His Phe Asn Leu Met Cys Ala Gly Tyr Met Leu Leu
115 120 125
Asn Ser Leu Gly Val Leu Gly Pro Ala Pro Val Glu Ile Ser Glu Ile
130 135 140
Cys Glu Ala Lys Lys Met Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Phe
145 150 155 160
Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Phe Leu Leu Pro Ala Leu Glu Val Asn Val
165 170 175

Arg Glu Tyr Ser Arg Arg Glu Arg Leu Ser Ser Pro Arg Leu His Ile
180 185 190
Leu Leu Pro Leu Asn Ala Arg Val Pro Ser Lys Pro Glu Glu Glu Asp
195 200 205
Thr Asn Val Val Phe His Glu Asn Leu Pro Asp Leu Lys Leu Asp Arg
210 215 220
Ala Gly Val Arg Lys Arg Ser Tyr Thr Asn Ser Val Tyr Lys Ile Thr
225 230 235 240

His Asn Asn Glu Thr Phe Ser Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu
245 250 255
Leu Thr Leu Tyr Gln Met Ser Gln Glu Ser Ser Ala Gly Phe Gly Glu
260 265 270
Arg Glu Arg Lys Gln Gln Val Leu Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Gln
275 280 285

Ile Leu Asp Asn Ser Leu Glu Cys Arg Asn Arg Tyr Arg Leu Ile Leu
290 295 300

Leu Asn Asp Glu His Thr Gly Asp Pro His Tyr Leu Ser Arg Glu Leu
305 310 315 320
Phe Gln Asn Leu Lys Gln Gln Asp Gly Glu Ile Phe Met Asp Pro Thr
325 330 335
Asn Glu Val His Pro Val Pro Glu Glu Gly Pro Val Gly Asn Cys Asn
340 345 350
Gly Ala Leu Gln Ala Thr Phe His Glu Glu Pro Met Ser Asp Glu Pro
355 360 365

Thr Leu Met Phe Ser Arg Pro Gln Ser Leu Arg Ser Glu Pro Val Glu
370 375 380
Thr Thr Asp Tyr Phe Asn Pro Ser Ser Ala Met Lys Gln Asn
385 390 395
<210> 349
<211> 381
<212> PRT
<213> Sarcophilus harrisii
<220>
<223> WT Tasmanian devil STING (tazSTING)
<400> 349
Met Pro Arg Ser His Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Trp
1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Cys Val Leu Leu Ser Leu Cys Met Ala Ala
20 25 30
Val Tyr Ile Leu Gly Glu Ser Ala Ala Phe Thr Leu Gln Trp Leu Leu
35 40 45
Phe Tyr Phe Thr Thr Val Gln Val Gly Leu Leu Leu Lys Gly Ala Tyr
50 55 60
Cys Leu Ala Glu Glu Leu Tyr His Ile Gln Ser Arg His Gln Gly Ser
65 70 75 80

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

Ser Glu Val Cys Glu Lys Arg His Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln
165 170 175
Thr Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe Asn Lys Asp Val Leu Arg Ser
180 185 190
Pro Glu Gly His Arg Leu His Ile Leu Ile Pro Leu Asp Cys Ser Val
195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Gln Ala Asp Pro Asn Ile Gln Phe Leu Gln Glu
210 215 220
Leu Pro Gln His Lys Leu Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ile Tyr
225 230 235 240
Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Ile Ser Glu Asp Gly Gln Pro Ala Glu Val
245 250 255
Cys Val Leu Glu Phe Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270

Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ala Pro Glu
290 295 300
Ala Arg Asp Cys Cys Arg Leu Val Val Tyr Gln Glu Pro Glu Asp Lys
305 310 315 320
Ala Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Lys Glu Ile Leu Arg His Leu Arg

325 330 335

Gln Glu Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr
340 345 350
Val Thr Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser
355 360 365
Gly Met Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
370 375 380

<210> 350

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tasmanian devil STING (tazSTING) C206Y

<400> 350

Met Pro Arg Ser His Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Trp

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

65 70 75 80
Tyr Trp Gln Ala Ile Gln Ala Cys Ile His Tyr Pro Phe Gln Arg Ile
85 90 95
Ser Leu Leu Leu Leu Ser Gly Tyr Phe Tyr Val Thr Leu Ser Asn Lys
100 105 110
Pro Asn Pro Ser Leu Thr Trp Thr Phe Ala Leu Leu Gly Leu Ser His
115 120 125
Ala Leu Ser Phe Ile Leu Gly Leu Gln Asn Leu Thr Ser Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Glu Val Cys Glu Lys Arg His Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln

165 170 175

Thr Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe Asn Lys Asp Val Leu Arg Ser

180 185 190

Pro Glu Gly His Arg Leu His Ile Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Ser Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Gln Ala Asp Pro Asn Ile Gln Phe Leu Gln Glu

210 215 220

Leu Pro Gln His Lys Leu Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ile Tyr

225 230 235 240

Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Ile Ser Glu Asp Gly Gln Pro Ala Glu Val

245 250 255

Cys Val Leu Glu Phe Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ala Arg Asp Cys Cys Arg Leu Val Val Tyr Gln Glu Pro Glu Asp Lys

305 310 315 320

Ala Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Lys Glu Ile Leu Arg His Leu Arg

325 330 335

Gln Glu Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr

340 345 350

Val Thr Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser

355 360 365

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

370 375 380

<210> 351

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tasmanian devil STING (tazSTING) R284G

<400> 351

Met Pro Arg Ser His Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Trp
1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Cys Val Leu Leu Ser Leu Cys Met Ala Ala
20 25 30

Val Tyr Ile Leu Gly Glu Ser Ala Ala Phe Thr Leu Gln Trp Leu Leu
35 40 45

Phe Tyr Phe Thr Thr Val Gln Val Gly Leu Leu Leu Lys Gly Ala Tyr

50 55 60

Cys Leu Ala Glu Glu Leu Tyr His Ile Gln Ser Arg His Gln Gly Ser
65 70 75 80

Tyr Trp Gln Ala Ile Gln Ala Cys Ile His Tyr Pro Phe Gln Arg Ile
85 90 95

Ser Leu Leu Leu Leu Ser Gly Tyr Phe Tyr Val Thr Leu Ser Asn Lys
100 105 110

Pro Asn Pro Ser Leu Thr Trp Thr Phe Ala Leu Leu Gly Leu Ser His

115 120 125

Ala Leu Ser Phe Ile Leu Gly Leu Gln Asn Leu Thr Ser Ala Glu Ile
130 135 140

Ser Glu Val Cys Glu Lys Arg His Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln
165 170 175

Thr Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe Asn Lys Asp Val Leu Arg Ser

180 185 190

Pro Glu Gly His Arg Leu His Ile Leu Ile Pro Leu Asp Cys Ser Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Gln Ala Asp Pro Asn Ile Gln Phe Leu Gln Glu

210 215 220

Leu Pro Gln His Lys Leu Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ile Tyr

225 230 235 240

Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Ile Ser Glu Asp Gly Gln Pro Ala Glu Val

245 250 255

Cys Val Leu Glu Phe Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Gly Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ala Arg Asp Cys Cys Arg Leu Val Val Tyr Gln Glu Pro Glu Asp Lys

305 310 315 320

Ala Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Lys Glu Ile Leu Arg His Leu Arg

325 330 335

Gln Glu Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr

340 345 350

Val Thr Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser

355 360 365

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

370 375 380

<210> 352

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> WT human STING-tasmanian devil CTT

<400> 352

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

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

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr

340 345 350

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

355 360 365

Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe

370 375

<210> 353

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human STING C206Y-tasmanian devil CTT

<400> 353

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
85 90 95

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

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

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225 230 235 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
245 250 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305 310 315 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr

340 345 350

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

355 360 365

Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe

370 375

<210> 354

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human STING R284G-tasmanian devil CTT

<400> 354

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

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

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Gly Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr

340 345 350

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

355 360 365

Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe

370 375

<210> 355

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> WT human STING delTRAF6 binding motif
(Asp-Phe-Ser at C-terminal removed)

<400> 355

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

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

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340 345 350

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

355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr

370 375

<210> 356

<211> 377

<212> PRT

<213> Felis catus

<220>

<223> WT cat STING (catSTING)

<400> 356

Met Pro Arg Thr Gly Leu His Pro Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Met

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Cys Leu Ala Ala

20 25 30

Leu Trp Arg Leu Gly Glu Ser Pro Asp His Thr Leu Arg Trp Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Phe Thr Gly Val Cys

50 55 60

His Leu Thr Glu Glu Leu Cys His Leu His Ser Arg Tyr Gln Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Ala Met Lys Ala Cys Leu Gly Ser Pro Val Arg Ser Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Ser Thr

100 105 110

Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln Ala

115 120 125

Leu Asn Ile Leu Leu Asp Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val Ser

130 135 140

Ala Val Cys Glu Lys Lys Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Val Leu Thr Cys Asn Gln Leu His Asn Asn Ile Leu Arg Gly Thr

180 185 190

Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro

195 200 205

Asp Asp Met Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Tyr Glu Leu

210 215 220

Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr

225 230 235 240

Asn Ser Val Tyr Ala Leu Leu Glu Asn Gly Gln Gln Ala Gly Ile Cys

245 250 255

Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln

260 265 270

Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys

275 280 285

Leu Phe Cys Arg Ile Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Thr Pro Glu Cys

290 295 300

Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Glu Glu Gly Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn Pro

340 345 350

Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln

355 360 365

Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe

370 375

<210> 357

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cat STING C205Y

<400> 357

Met Pro Arg Thr Gly Leu His Pro Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Met

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Cys Leu Ala Ala

20 25 30

Leu Trp Arg Leu Gly Glu Ser Pro Asp His Thr Leu Arg Trp Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Phe Thr Gly Val Cys

50 55 60

His Leu Thr Glu Glu Leu Cys His Leu His Ser Arg Tyr Gln Gly Ser
65 70 75 80
Tyr Trp Arg Ala Met Lys Ala Cys Leu Gly Ser Pro Val Arg Ser Gly
85 90 95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Ser Thr
100 105 110
Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln Ala
115 120 125

Leu Asn Ile Leu Leu Asp Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val Ser
130 135 140
Ala Val Cys Glu Lys Lys Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Pro Ala
165 170 175
Arg Val Leu Thr Cys Asn Gln Leu His Asn Asn Ile Leu Arg Gly Thr
180 185 190

Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Val Pro
195 200 205
Asp Asp Met Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Tyr Glu Leu
210 215 220
Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr
225 230 235 240
Asn Ser Val Tyr Ala Leu Leu Glu Asn Gly Gln Gln Ala Gly Ile Cys
245 250 255

Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln
260 265 270
Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys
275 280 285
Leu Phe Cys Arg Ile Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Thr Pro Glu Cys
290 295 300

Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Glu Glu Gly Ser
305 310 315 320

Asn Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu Arg Gln Glu Glu
325 330 335
Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn Pro
340 345 350
Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln
355 360 365
Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
370 375

<210> 358
<211> 377
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220>
<223> cat STING R283G
<400> 358
Met Pro Arg Thr Gly Leu His Pro Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Met
1 5 10 15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Cys Leu Ala Ala
20 25 30
Leu Trp Arg Leu Gly Glu Ser Pro Asp His Thr Leu Arg Trp Leu Val
35 40 45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Phe Thr Gly Val Cys

50 55 60
His Leu Thr Glu Glu Leu Cys His Leu His Ser Arg Tyr Gln Gly Ser
65 70 75 80
Tyr Trp Arg Ala Met Lys Ala Cys Leu Gly Ser Pro Val Arg Ser Gly
85 90 95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Ser Thr
100 105 110

Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln Ala

115 120 125

Leu Asn Ile Leu Leu Asp Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val Ser

130 135 140

Ala Val Cys Glu Lys Lys Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Val Leu Thr Cys Asn Gln Leu His Asn Asn Ile Leu Arg Gly Thr

180 185 190

Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro

195 200 205

Asp Asp Met Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Tyr Glu Leu

210 215 220

Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr

225 230 235 240

Asn Ser Val Tyr Ala Leu Leu Glu Asn Gly Gln Gln Ala Gly Ile Cys

245 250 255

Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln

260 265 270

Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Gly Leu Glu Gln Ala Lys

275 280 285

Leu Phe Cys Arg Ile Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Thr Pro Glu Cys

290 295 300

Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Glu Glu Gly Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn Pro

340 345 350

Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln

355 360 365

Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe

370 375

<210> 359

<211> 377

<212> PRT

<213> Callithrix jacchus

<220>

<223> WT Marmoset STING

<400> 359

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro His Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Val Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Trp Leu Arg Glu Ala Pro Glu Asp Ile Leu Arg Phe Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Arg Leu Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Val His Thr Arg Tyr Gln Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Ile Arg Leu Gly

85 90 95

Ala Gln Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Cys Phe Leu Pro Asn Gly

100 105 110

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

115 120 125

Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile Ser Ala

130 135 140

Val Cys Glu Lys Arg Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser

145 150 155 160

Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Phe Gln Ala Arg

165 170 175

Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Asn Asn Asn Val Leu Arg Gly Pro Ala

180 185 190

Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp

195 200 205

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

210 215 220

Gln Glu Thr Ile Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr Asn

225 230 235 240

Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Ala Cys Val

245 250 255

Leu Glu Tyr Ala Ser Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln Tyr

260 265 270

Gly Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys Leu

275 280 285

Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu Ser Gln

290 295 300

Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Glu Glu Pro Ala Asp Gly Ser Ser

305 310 315 320

Phe Leu Leu Ser Gln Glu Val Leu Gln His Leu Arg Gln Glu Glu Glu

325 330 335

Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Glu Val Pro Ser Thr

340 345 350

Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Lys

355 360 365

Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Leu Phe

370 375

<210> 360

<211> 378

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> WT Cattle/Bovine STING

<400> 360

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15

Arg Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Ala
20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Asp Tyr Thr Leu Lys Trp Leu Val
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Gln Gln Met Gly Leu Leu Ile Lys Gly Ile Cys
50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val His Ser Arg Tyr His Gly Ser
65 70 75 80

Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Leu Cys Ser Ser Met Arg Cys Gly
85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Cys Ser Leu Pro Asn Met
100 105 110

Ala Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val
130 135 140

Ser Ala Ile Cys Glu Lys Arg Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Pro
165 170 175

Ala Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe His Asn Asn Thr Leu Gln Gly
180 185 190

Ala Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205

Pro Asp Asp Leu Asn Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu His Glu
210 215 220

Leu Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr
225 230 235 240

Thr Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Val

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asn Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Ala Glu Gly

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Gln His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

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

340 345 350

Ser Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Glu

355 360 365

Lys Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Val Phe

370 375

<210> 361

<211> 375

<212> PRT

<213> Struthio camelus australis

<220>

<223> WT Ostrich STING

<400> 361

Met Ala His Glu Ser Gly Thr Pro Ser Asn Pro Ala Thr Pro Leu Ile

1 5 10 15

Pro Lys Ala Arg Glu Gly Arg Ala Gln His Ala Ala Tyr Val Leu Leu

20 25 30

Ala Leu Cys Ala Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Glu Pro Val Val His

35 40 45

Ile Ala Arg Ser Phe Thr Ser His Phe Val Ala Leu Gln Ile Gly Ala
50 55 60

Leu Leu Lys Gly Ile Cys Tyr Leu Val Glu Glu Ile Phe His Leu Glu
65 70 75 80

Thr Arg His Arg Gly Ser Phe Arg Arg Ala Leu Ser Ala Cys Leu His
85 90 95

Leu Arg Trp His Val Thr Leu Leu Leu Val Cys Gly Ser Ala Tyr Val
100 105 110

Ala Leu Leu Asp Gly Asp Glu Gln Pro Leu Gly Leu His Leu Gly Leu
115 120 125

Ala Cys Leu Cys Gln Leu Leu Ile Leu Ala Leu Gly Leu His Lys Pro
130 135 140

Ser Ala Val Glu Ile Ser Glu Met Ser Glu Arg Ser Lys Gln Asn Val
145 150 155 160

Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Lys Ile Val
165 170 175

Leu Pro Arg Leu Lys Glu Ser Met Glu Asn Ile Gly Arg Thr Asn Pro
180 185 190

Asn Met Leu Ala His Lys Glu Thr Trp Lys Leu His Ile Leu Val Pro
195 200 205

Leu Ser Cys Asn Ile Cys Asp Asp Leu Glu Lys Ala Asp Ser Asn Ile
210 215 220

Gln Tyr Ala Met Asp Leu Pro Glu Thr Thr Leu Thr Arg Ala Gly Thr
225 230 235 240

Lys Lys Arg Val Tyr Arg Asn Thr Leu Tyr Lys Ile Lys Asp Glu Asp
245 250 255

Lys Phe Arg Phe Cys Val Val Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Ser Leu
260 265 270

Tyr Ala Met Ser Gln Asp Glu Cys Ala Ala Phe Ser Arg Glu Asp Arg
275 280 285

Ile Glu Gln Ala Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Glu Glu Ile Leu Gln

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Cys Ala Gly Thr Tyr Arg Leu Ile Val Tyr Glu Glu
305 310 315 320
Ser Gly Glu Ala Glu Thr His Phe Leu Ser Arg Glu Ile Leu Arg His
325 330 335
Leu Gln Gln Gln Arg Gln Glu Glu Tyr Thr Val Cys Asp Gly Thr Leu
340 345 350
Cys Ser Thr Asp Leu Ser Leu Gln Ile Ser Glu Ser Asp Leu Pro Gln
355 360 365

Pro Leu Arg Ser Asp Cys Leu
370 375

<210> 362
<211> 382
<212> PRT
<213> Nipponia nippon
<220>
<223> WT Crested ibis STING
<400> 362
Met Ser Gln Glu Pro Gln Trp Leu Ser His Pro Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15
Pro Lys Ala Arg Gly Gly Arg Ala Gln His Ala Val Tyr Leu Leu Leu
20 25 30
Ala Leu Cys Ala Ala Val Leu Tyr Leu Ala Gly Glu Pro Leu Val Pro
35 40 45

Ser Ala Arg Ser Leu Ile Ser His Phe Met Ala Leu Gln Ile Gly Val
50 55 60
Leu Leu Lys Gly Thr Cys Tyr Leu Ala Glu Glu Ile Phe His Leu Gln
65 70 75 80
Ser Arg His His Gly Ser Phe Trp Arg Ala Leu Ser Ala Cys Phe Pro
85 90 95
Leu Arg Trp His Gly Leu Met Leu Leu Val Cys Gly Ser Ala Tyr Val

100 105 110

Ala Leu Leu Glu Asp Gly Gln Pro Leu Gly Leu His Leu Gly Leu Ala
115 120 125
Ser Leu Cys Gln Leu Leu Ile Leu Ala Leu Gly Leu His Lys Pro Ser
130 135 140
Ala Val Glu Met Ser Glu Met Ser Glu Arg Ser Lys Gln Asn Val Ala
145 150 155 160
His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Lys Ile Val Leu
165 170 175

Pro Arg Val Lys Lys Ser Met Glu Glu Phe Ser Arg Ala Asn Pro Asn
180 185 190
Val Leu Ala Arg Arg Glu Thr Trp Lys Leu His Ile Leu Val Pro Leu
195 200 205
Ser Cys Asp Val Tyr Asp Asp Leu Glu Lys Ala Asp Ser Asn Ile Gln
210 215 220
Tyr Leu Met Asp Leu Pro Glu Thr Thr Leu Thr Arg Ala Gly Thr Lys
225 230 235 240

Lys Arg Val Tyr Lys His Ser Leu Tyr Thr Ile Arg Asp Glu Gly Asn
245 250 255
Lys Leu Trp His Cys Ala Val Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Ser Leu
260 265 270
Tyr Ala Met Ser Gln Asp Glu Tyr Ala Ala Phe Ser Arg Glu Asp Arg
275 280 285
Leu Glu Gln Ala Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Glu Glu Ile Leu Lys
290 295 300

Gly Ser Lys Glu Cys Ala Gly Thr Tyr Arg Leu Ile Val Tyr Glu Glu
305 310 315 320
Ser Gly Glu Ala Glu Thr His Ser Leu Ser Arg Asp Ile Leu Trp His
325 330 335
Leu Arg Gln Gln Cys His Glu Glu Tyr Thr Val Tyr Glu Gly Asn Gln
340 345 350

Pro His Asn Pro Ser Thr Thr Leu His Ser Thr Glu Leu Asn Leu Gln
355 360 365

Ile Ser Glu Ser Asp Leu Pro Gln Pro Leu Arg Ser Asp Cys
370 375 380

<210> 363

<211> 380

<212> PRT

<213> Latimeria chalumnae

<220>

<223> WT Coelacanth STING
(UniProtKB entry H3A3G4)

<400> 363

Phe Gly Leu Gln Asn Met Ser Ala Ile Ile Pro Gln Pro Arg Gly Asn
1 5 10 15

Arg Ala Asn Gln Met Ala Tyr Phe Ile Ile Thr Val Ile Leu Met Leu
20 25 30

Leu Trp Ile Phe Arg Asn Ile Met Asp Asn Val Leu Glu Val Ile Ala
35 40 45

Leu His Ile Leu Leu Leu Gln Gly Ala Ala Ile Met Lys Gly Ile Cys
50 55 60

Asn Phe Ala Glu Glu Val Asn His Val Gln Pro Arg Tyr Gly Gly Ser
65 70 75 80

Tyr Trp Lys Ala Leu Glu Ala Cys Leu Asn Leu Ser Lys Tyr Asp Val
85 90 95

Met Lys Ile Val Phe Ala Gly Val Leu Trp Trp His Phe Ser Ser Ser
100 105 110

Leu Phe Val Val Trp Phe Leu His Leu Leu Val Ser Cys Leu Cys His
115 120 125

Leu Leu Asn Asn Val Leu Gly Val Leu Lys Pro Ser Pro Val Glu Val
130 135 140

Ser Glu Ile Tyr Glu Arg Asn Arg Ile Gly Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

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

Leu Ser Glu Leu Gln Ile Asn Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ser Tyr
225 230 235 240
Lys His Ser Leu Tyr Gln Val Leu Asp Glu Asp Lys Arg Pro His Tyr
245 250 255
Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Lys Ser Leu Leu Glu Met Ser
260 265 270
Lys Glu Ala Ser Ala Glu Phe Thr Lys Glu Asp Arg Leu Glu Gln Thr
275 280 285

Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asp Asn Ser Gln Glu
290 295 300
Cys Arg Gly Arg Phe Arg Leu Val Ile Tyr Asp Gly Arg Glu Asp Ser
305 310 315 320
Gly Lys Ser His Phe Leu Ser Lys Glu Leu Leu Arg His Leu Asn Gln
325 330 335
Gln Gln Lys Glu Glu Tyr Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser
340 345 350

Ser Ser Thr Ser Cys Leu Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp
355 360 365
Thr Asp Ala Pro His Thr Leu Lys Arg Gln Val Cys
370 375 380
<210> 364
<211> 405

<212> PRT

<213> Latimeria chalumnae

<220>

<223> WT Coelacanth STING

(Isoform X1; NCBI Accession No. XP_005989369.1)

<400> 364

Met Cys Phe Ile Gln Val Leu Asp Ile Thr Ile Ile Thr Gln Met Leu
1 5 10 15

Gln Gly Glu Tyr Phe Gly Leu Gln Asn Met Ser Ala Ile Ile Pro Gln
20 25 30

Pro Arg Gly Asn Arg Ala Asn Gln Met Ala Tyr Phe Ile Ile Thr Val
35 40 45

Ile Leu Met Leu Leu Trp Ile Phe Arg Asn Ile Met Asp Asn Val Leu
50 55 60

Glu Val Ile Ala Leu His Ile Leu Leu Leu Gln Gly Ala Ala Ile Met
65 70 75 80

Lys Gly Ile Cys Asn Phe Ala Glu Glu Val Asn His Val Gln Pro Arg
85 90 95

Tyr Gly Gly Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Glu Ala Cys Leu Asn Leu Ser
100 105 110

Lys Tyr Asp Val Met Lys Ile Val Phe Ala Gly Val Leu Trp Trp His
115 120 125

Phe Ser Ser Ser Leu Phe Val Val Trp Phe Leu His Leu Leu Val Ser
130 135 140

Cys Leu Cys His Leu Leu Asn Asn Val Leu Gly Val Leu Lys Pro Ser
145 150 155 160

Pro Val Glu Val Ser Glu Ile Tyr Glu Arg Asn Arg Ile Gly Val Ala
165 170 175

His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Leu Val Leu
180 185 190

Pro Glu Leu Glu Asp Arg Ile Lys Ser Tyr Asn Val Ser His Gly Asn

195 200 205

Leu Leu Lys His Lys Glu Thr Trp Arg Leu His Ile Leu Leu Pro Leu
210 215 220
Ser Cys Ser Ile Phe Asp Asn Leu Ala Asp Val Asp Ser Asn Ile Glu
225 230 235 240
Phe Leu Asp Asn Leu Ser Glu Leu Gln Ile Asn Arg Ala Gly Ile Lys
245 250 255
Gly Arg Ser Tyr Lys His Ser Leu Tyr Gln Val Leu Asp Glu Asp Lys
260 265 270

Arg Pro His Tyr Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Lys Ser Leu
275 280 285
Leu Glu Met Ser Lys Glu Ala Ser Ala Glu Phe Thr Lys Glu Asp Arg
290 295 300
Leu Glu Gln Thr Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asp
305 310 315 320
Asn Ser Gln Glu Cys Arg Gly Arg Phe Arg Leu Val Ile Tyr Asp Asp
325 330 335

Cys Gln Asp Val Leu Asp Gly Glu Asp Ser Gly Lys Ser His Phe Leu
340 345 350
Ser Lys Glu Leu Leu Arg His Leu Asn Gln Gln Gln Lys Glu Glu Tyr
355 360 365
Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser Ser Ser Thr Ser Cys Leu
370 375 380
Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp Thr Asp Ala Pro His Thr
385 390 395 400

Leu Lys Ser Gly Phe
405

<210> 365
<211> 378
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>

<223> WT Boar STING

<400> 365

Met Pro Tyr Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15

Arg Ala Gln Val Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Ala Cys Leu Val Ala
20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Leu Pro Glu Tyr Thr Leu Arg Trp Leu Val
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Gln Gln Ile Gly Leu Leu Val Lys Gly Leu Cys
50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val His Ser Arg Tyr Gln Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Trp Arg Ala Ala Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Ile Arg Cys Gly
85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Phe Ser Ile Arg Asp Lys
100 105 110

Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Gln His Leu Ala Pro Ala Glu Val
130 135 140

Ser Ala Ile Cys Glu Lys Arg Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Arg
165 170 175

Ala Arg Ile Gln Ala Tyr Asn Gln Arg His Lys Asn Val Leu Gly Gly
180 185 190

Ile Gly Asn His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205

Pro Asp Asp Leu Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu His Glu
210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Pro Ala Gly Val
245 250 255
Cys Val Leu Gly Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270
Gln Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300

Ala Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Thr Glu Gly
305 310 315 320
Gly Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335
Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Ala Glu Thr Ser Val Val Pro Thr
340 345 350
Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu
355 360 365

Gln Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Ile Phe
370 375

<210> 366
<211> 380
<212> PRT
<213> Rousettus aegyptiacus
<220>
<223> WT Bat STING
<400> 366

Met Ser His Ser Ser Leu His Pro Ser Val Pro Arg Pro Arg Gly Arg
1 5 10 15
Arg Ala Arg Asn Ile Ala Ala Phe Val Leu Leu Ile Val Cys Leu Ala
20 25 30
Ala Leu Trp Leu Ser Gly Lys Pro Ser Glu Tyr Thr Leu Arg Cys Leu

35 40 45

Val Leu His Leu Ala Ser Gln Gln Leu Gly Leu Leu Ser Asn Arg Val

50 55 60

Cys Tyr Leu Ala Glu Glu Leu Ser His Ile His Ser Arg Tyr Gln Gly

65 70 75 80

Asn Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Leu Ser Cys Pro Ile Arg Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ile Asp Asp Leu Pro Leu Thr Trp Met Leu Ala His Leu Gly Leu Ser

115 120 125

Glu Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Arg Gly Leu Thr Pro Ala Glu

130 135 140

Val Ser Thr Val Cys Glu Gln Arg His Phe Asn Val Ala His Gly Leu

145 150 155 160

Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu

165 170 175

Arg Ala Arg Ile His Thr Tyr Asn Gln Leu His Gly Asn Thr Leu Gln

180 185 190

Gly Val Gly Ser His Arg Leu Tyr Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly

195 200 205

Val Leu Asp Asp Leu Ser Ala Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Arg

210 215 220

Glu Leu Pro Arg Gln Ser Ser Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asn Arg Val

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met

260 265 270

Ser Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Gln Glu Asp Arg Leu Glu Gln

275 280 285

Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Ala Asp Ile Leu Ala Asp Asp Pro

290 295 300

Glu Ser Gln Lys Ser Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Thr Glu
305 310 315 320
Glu Ser Asp Phe Ser Leu Ser Gln Ala Ile Leu Lys His Leu Arg Gln
325 330 335
Glu Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Thr Val Gly Thr Tyr Glu Ala
340 345 350
Pro Gly Ser Ser Thr Leu His Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly

355 360 365

Met Asp Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Ile Phe
370 375 380

<210> 367
<211> 387
<212> PRT
<213> Trichechus manatus latirostris
<220>
<223> WT Manatee STING
<400> 367
Met Val Glu Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Arg His
1 5 10 15
Arg Gly His Gly Ile Gln Lys Ala Ala Phe Val Leu Leu Val Ala Cys
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Lys Leu Pro Gln Gln Ser Ala Asp Cys Ala Gly Ile Lys Gly
225 230 235 240
Arg Val Tyr Thr Asn Ser Val Tyr Gln Leu Leu Glu His Gly Gln Pro
245 250 255
Ala Gly Ile Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe
260 265 270
Ala Met Ser Gln Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu
275 280 285

Glu Gln Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp
290 295 300
Ala Pro Glu Tyr Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Ser
305 310 315 320
Ala Glu Gly Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu
325 330 335
Arg Gln Glu Glu Arg Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser

340 345 350

Val Val Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ser Thr Ser Ser Leu Ser Gln Glu
355 360 365

Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr
370 375 380

Asp Val Phe
385

<210> 368
<211> 378
<212> PRT
<213> Callorhinchus milii
<220>
<223> WT Ghost shark STING
<400> 368

Met Ser Asp Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Lys Val Ala Thr Tyr Val
1 5 10 15

Gly Leu Ile Leu Met Ser Gly Leu Ala Cys Leu Tyr Phe Met Leu Thr
20 25 30

Pro Asp Tyr His Ile Lys Phe Ile Val Gln Gln Val Ala Gln Gln Leu
35 40 45

Ile Val Ser Phe Phe Ala Leu Cys Leu Leu Arg Leu Cys Glu Phe Val
50 55 60

Glu Glu Leu Gly His Lys Gln Thr Arg Tyr Gln Asn Ser Trp Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Asn Ala Ser Leu Asp Trp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Leu Leu
85 90 95

Ile Ser Leu Leu Phe Asn Trp Val Leu Pro Tyr Glu Lys His Met Ser
100 105 110

Tyr Ala Val Pro Thr Val Gly Gln Thr Ile Ser Leu Thr Cys Phe Cys
115 120 125

Val Leu Phe Leu Lys Val Phe Gln Leu Asp Val Leu Ser Pro Ala Gln

130 135 140

Ile Ser Glu Ile Ser Glu Thr Asn Lys Cys Asn Val Ala His Gly Leu
145 150 155 160
Ala Trp Ser Tyr Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Val Leu Pro Lys Leu
165 170 175
Glu Glu Lys Ile Asn Gln Tyr His Arg Glu Tyr Gly Asn Val Leu Gln
180 185 190
Gln Lys Gly Lys Lys Leu Tyr Ile Leu Ile Pro Phe Ser Cys Lys Val
195 200 205

Leu Asp Lys Leu Glu Lys Val Asp Thr Asn Ile Val Phe Tyr Gln Asn
210 215 220
Leu Pro Glu Leu Leu Val Asp Arg Ala Gly Ile Lys Ser Arg Ser Tyr
225 230 235 240
Lys His Ser Ile Tyr Leu Ile Tyr Asp Gln Lys Lys Gln Gln Pro His
245 250 255
His Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Arg Ser Leu Phe Glu Met
260 265 270

Thr Asn Asp Ser Ala Ala Ala Phe Ser Lys Glu Gln Arg Leu Asp Gln
275 280 285
Ala Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Ser Ile Leu Asn Asn Val Pro
290 295 300
Glu Val Thr Gly Ser Tyr Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Asp Asp Leu Glu
305 310 315 320
Gly Ala Glu Leu Gly Pro His Phe Val Ser Glu Glu Ile Leu Lys His
325 330 335

Met Arg Gln Glu Leu Thr Glu Tyr Pro Val Ala Glu Pro Ser Asn Ala
340 345 350
Asn Glu Thr Asp Cys Met Ser Ser Glu Pro His Leu Met Ile Ser Asp
355 360 365
Asp Pro Lys Pro Leu Arg Ser Tyr Cys Pro
370 375

<210> 369

<211> 378

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> WT Mouse STING

<400> 369

Met Pro Tyr Ser Asn Leu His Pro Ala Ile Pro Arg Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Arg Ser Lys Tyr Val Ala Leu Ile Phe Leu Val Ala Ser Leu Met Ile

20 25 30

Leu Trp Val Ala Lys Asp Pro Pro Asn His Thr Leu Lys Tyr Leu Ala

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser His Glu Leu Gly Leu Leu Leu Lys Asn Leu Cys

50 55 60

Cys Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val Gln Ser Arg Tyr Gln Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Lys Ala Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Ile His Cys Met

85 90 95

Ala Met Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Phe Tyr Phe Leu Gln Asn Thr Ala

100 105 110

Asp Ile Tyr Leu Ser Trp Met Phe Gly Leu Leu Val Leu Tyr Lys Ser

115 120 125

Leu Ser Met Leu Leu Gly Leu Gln Ser Leu Thr Pro Ala Glu Val Ser

130 135 140

Ala Val Cys Glu Glu Lys Lys Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Ile Arg Met Phe Asn Gln Leu His Asn Asn Met Leu Ser Gly Ala

180 185 190

Gly Ser Arg Arg Leu Tyr Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro

195 200 205

Asp Asn Leu Ser Val Val Asp Pro Asn Ile Arg Phe Arg Asp Met Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Ser Val Tyr Glu Ile Leu Glu Asn Gly Gln Pro Ala Gly Val Cys

245 250 255

Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln

260 265 270

Asp Ala Lys Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys

275 280 285

Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Glu Ile Leu Glu Asp Val Pro Glu Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Met Asp

355 360 365

Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Leu Ile

370 375

<210> 370

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human STING C-terminal tail (CTT)

<400> 370

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser

35 40

<210> 371

<211> 43

<212> PRT

<213> Sarcophilus harrisii

<220>

<223> Tasmanian devil STING C-terminal tail (CTT)

<400> 371

Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe

35 40

<210> 372

<211> 43

<212> PRT

<213> Callithrix jacchus

<220>

<223> Marmoset STING C-terminal tail (CTT)

<400> 372

Glu Glu Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Glu Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Leu Phe

35 40

<210> 373

<211> 42

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> Cattle/Bovine STING C-terminal tail (CTT)

<400> 373

Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Thr Glu Thr Ser Val Met Pro Gly
 1   5   10   15
Ser Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Glu

            20   25   30
Lys Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Val Phe
        35   40

<210> 374

<211> 42

<212> PRT

<213> Felis catus

<220>

<223> Cat STING C-terminal tail (CTT)

<400> 374

Glu Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn
 1   5   10   15
Pro Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu
            20   25   30

Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
        35   40

<210> 375

<211> 35

<212> PRT

<213> Struthio camelus australis

<220>

<223> Ostrich STING C-terminal tail (CTT)

<400> 375

Arg Gln Glu Glu Tyr Thr Val Cys Asp Gly Thr Leu Cys Ser Thr Asp

1 5 10 15

Leu Ser Leu Gln Ile Ser Glu Ser Asp Leu Pro Gln Pro Leu Arg Ser

20 25 30

Asp Cys Leu

35

<210> 376

<211> 42

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<223> Boar STING C-terminal tail (CTT)

<400> 376

Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Ala Glu Thr Ser Val Val Pro Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Ile Phe

35 40

<210> 377

<211> 43

<212> PRT

<213> Rousettus aegyptiacus

<220>

<223> Bat STING C-terminal tail (CTT)

<400> 377

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Thr Val Gly Thr Tyr Glu Ala Pro

1 5 10 15

Gly Ser Ser Thr Leu His Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

20 25 30

Asp Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Ile Phe

35 40

<210> 378

<211> 48

<212> PRT

<213> Trichechus manatus latirostris

<220>

<223> Manatee STING C-terminal tail (CTT)

<400> 378

Glu Arg Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Val Val Pro
1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser Pro Ser Thr Ser Ser Leu Ser Gln Glu Pro Lys Leu
20 25 30

Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
35 40 45

<210> 379

<211> 43

<212> PRT

<213> Nipponia nippon

<220>

<223> Crested ibis STING C-terminal tail (CTT)

<400> 379

Cys His Glu Glu Tyr Thr Val Tyr Glu Gly Asn Gln Pro His Asn Pro
1 5 10 15

Ser Thr Thr Leu His Ser Thr Glu Leu Asn Leu Gln Ile Ser Glu Ser
20 25 30

Asp Leu Pro Gln Pro Leu Arg Ser Asp Cys Phe
35 40

<210> 380

<211> 43

<212> PRT

<213> Latimeria chalumnae

<220>

<223> Coelacanth STING (SEQ ID NO:345) C-terminal tail
(CTT)

<400> 380

Gln Lys Glu Glu Tyr Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser Ser

1 5 10 15

Ser Thr Ser Cys Leu Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp Thr

20 25 30

Asp Ala Pro His Thr Leu Lys Arg Gln Val Cys

35 40

<210> 381

<211> 42

<212> PRT

<213> Latimeria chalumnae

<220>

<223> Coelacanth STING (SEQ ID NO:346) C-terminal tail

(CTT)

<400> 381

Gln Lys Glu Glu Tyr Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser Ser

1 5 10 15

Ser Thr Ser Cys Leu Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp Thr

20 25 30

Asp Ala Pro His Thr Leu Lys Ser Gly Phe

35 40

<210> 382

<211> 71

<212> PRT

<213> Danio rerio

<220>

<223> Zebrafish STING C-terminal tail (CTT)

<400> 382

Asp Gly Glu Ile Phe Met Asp Pro Thr Asn Glu Val His Pro Val Pro

1 5 10 15

Glu Glu Gly Pro Val Gly Asn Cys Asn Gly Ala Leu Gln Ala Thr Phe

20 25 30

His Glu Glu Pro Met Ser Asp Glu Pro Thr Leu Met Phe Ser Arg Pro

35 40 45

Gln Ser Leu Arg Ser Glu Pro Val Glu Thr Thr Asp Tyr Phe Asn Pro
50 55 60
Ser Ser Ala Met Lys Gln Asn
65 70

<210> 383
<211> 38
<212> PRT
<213> Callorhinchus milii
<220>
<223> Ghost shark STING C-terminal tail (CTT)
<400> 383
Leu Thr Glu Tyr Pro Val Ala Glu Pro Ser Asn Ala Asn Glu Thr Asp
1 5 10 15
Cys Met Ser Ser Glu Pro His Leu Met Ile Ser Asp Asp Pro Lys Pro
20 25 30
Leu Arg Ser Tyr Cys Pro
35
<210> 384
<211> 43
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<223>
Mouse STING C-terminal tail (CTT)
<400> 384
Glu Lys Glu Glu Val Thr Met Asn Ala Pro Met Thr Ser Val Ala Pro
1 5 10 15
Pro Pro Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Met
20 25 30
Asp Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Leu Ile
35 40
<210> 385
<211> 78
<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> LppA (strain LT2/ ATCC 700720)

<400>

385

Met Asn Arg Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Cys Ser Ser Asn Ala Lys Ile Asp Gln Leu Ser Ser
20 25 30

Asp Val Gln Thr Leu Asn Ala Lys Val Asp Gln Leu Ser Asn Asp Val
35 40 45

Asn Ala Met Arg Ser Asp Val Gln Ala Ala Lys Asp Asp Ala Ala Arg
50 55 60

Ala Asn Gln Arg Leu Asp Asn Gln Ala Thr Lys Tyr Arg Lys
65 70 75

<210> 386

<211> 79

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> LppB (strain LT2/ ATCC 700720)

<400> 386

Met Asn Arg Thr Asn Gln Leu Ile Leu Gly Ala Val Val Leu Gly Ser
1 5 10 15

Thr Leu Leu Ala Gly Cys Ser Ser Asn Ala Lys Ile Asp Gln Leu Ser
20 25 30

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

35 40 45

Val Asn Ala Met Arg Ser Asp Val Gln Ala Ala Lys Asp Asp Ala Ala
50 55 60

Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asp Asn Lys Val Phe Arg Ile Cys Lys
65 70 75

<210> 387

<211> 237

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> lppA

<400> 387

ttacttacgg tatttagtag cctggttgtc cagacgctgg ttagcgcgag ctgcgtcgtc 60

tttagcagcc tgaacgtcgg aacgcattgc gttcacgtcg ttgctcagct ggtcaacttt 120

agcgttcaga gtctgaacgt cagaagacag ctgatcgatt ttagcgttgc tggagcaacc 180

agccagcaga gtagaaccca ggattaccgc gcccagtacc agtttagtac gattcat 237

<210> 388

<211> 240

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<223> lppB

<400> 388

ttatttacag atgcggaata ctttgttgtc cagacgttgg ttcgcgcgag cagcatcgtc 60

tttagcagcc tgaacgtcgg aacgcattgc atttacgtca ttactcagtt gctcaacttt 120

agcgctcagc gtctgtacat cggaagacaa ctgatcgatt ttagcgttgc ttgaacaacc 180

tgccagtaac gtggaaccca gaactactgc acctaagatc agctggttag tacggttcat 240

<210> 389

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shine-Dalgarno

<400> 389

aggagg 6

<210> 390

<211> 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shine-Dalgarno

<400> 390

agga 4

<210> 391

<211> 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shine-Dalgarno

<400> 391

gagg 4

<210> 392

<211> 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shine-Dalgarno

<400> 392

ggag 4

<210> 393

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bacterial promoter

<400> 393

attatgtctt gacatgtagt gagtgggctg gtataatgca gcaag 45

<210> 394

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bacterial promoter

<400> 394

ttatgcttga cgctgcgtaa ggtttttgtt ataatacacc aag 43

<210> 395

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bacterial promoter

<400> 395

attatgtctt gacatgtagt gagtgggctg gtaaatgcag caag 44

<210> 396

<211> 631

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Salmonella rpsm promoter

<400> 396

gatcccggag ttcatgcgtg atgcaatgaa agtgccgttc tacttcggtg ggacctcact 60

gcttatcgtt gttgtcgtga ttatggactt tatggctcaa gtgcaaactc tgatgatgtc 120

cagtcagtat gagtctgcat tgaagaaggc gaacctgaaa ggctacggcc gttaattggt 180

cgcctgagaa gttacggaga gtaaaaatga aagttcgtgc ttccgtcaag aaattatgcc 240

gtaactgcaa aatcgttaag cgtgatggtg tcatccgtgt gatttgcagt gccgagccga 300

agcataaaca gcgccaaggc tgatttttc gcatattttt cttgcaaagt tgggttgagc 360

tggctagatt agccagccaa tcttttgtat gtctgtacgt ttccatttga gtatcctgaa 420

aacgggcttt tcagcatggt acgtacatat taaatagtag gagtgcatag tggcccgtat 480

agcaggcatt aacattcctg atcagaaaca cgccgtgatc gcgttaactt cgatctacgg 540

tgtcggcaag acccgttcta aagccatcct ggctgcagcg ggtatcgctg aaaatgttaa 600

gatcctctag atttaagaag gagatataca t 631

<210> 397

<211> 7

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kozak

<400> 397

accaugg 7

<210> 398

<211> 6

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> motif

<400> 398

aauaaa 6

<210> 399

<211> 8330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA construct

<220>

<221> enhancer

<222> (1704)...(2007)

<223> CMV enhancer

<220>

<221> promoter

<222> (2008)...(2211)

<223> human cytomegalovirus (CMV) immediate early
promoter

<220>

<221> misc_feature

<222> (2256)...(2261)

<223> Kozak sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (2262)...(2845)

<223> mu4-1BBL ATG83-310 CO

<220>

<221> misc_feature

<222> (2955)...(3008)

<223> 2A peptide from Thosea asigna virus capsid protein

<220>

<221> misc_feature

<222> (3009)...(4010)

<223> mouse IL-12p40

<220>

<221> sig_peptide

<222> (3009)...(3027)

<223> IL-12p40 signal sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (4011)...(4055)

<223> Linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (4056)...(4634)

<223> mouse IL-12p35 del1-22

<220>

<221> misc_feature

<222> (4644)...(4700)

<223> 2A peptide from porcine teschovirus-1 polyprotein

<220>

<221> gene

<222> (4701)...(5705)

<223> human STING

<220>

<221> polyA_signal

<222> (6389)...(6613)

<223> bovine growth hormone polyadenylation signal

<400> 399

gaacaatggc gtgaagacct ttgtgggcgg taactgtacc gttagcctga tgttgatgtc 60

gctgggcggt ctctttgccc ataatctcgt tgactgggta tccgtcgcga cctatcaggc 120

cgcctccggc ggcggcgcgc gccatatgcg cgagctgtta acccagatgg gtcagttgta 180

tggccatgtc gccgatgaac tggcgacgcc gtcttccgca attcttgata ttgaacgcaa 240

agttacggca ttgacccgca gcggcgagct gccggttgat aactttggcg taccgctggc 300

gggaagcctg atcccctgga tcgacaaaca gctcgataac ggccagagcc gcgaagagtg 360

gaaaggccag gcggaaacca acaagattct caatactgcc tctgtgattc cggttgatgg 420

tttgtgtgtg cgcgtcggcg cgctgcgctg tcacagccag gcgttcacca tcaagctgaa 480

aaaagaggta tccattccga cggtggaaga actgctggcg gcacataatc cgtgggcgaa 540

agtggtgccg aacgatcgtg atatcactat gcgcgaatta accccggcgg cggtgaccgg 600

cacgttgact acgccggttg gtcgtctgcg taagctgaac atggggccag agttcttgtc 660

ggcgtttacc gtaggcgacc agttgttatg gggcgccgcc gagccgctgc gtcgaatgct 720

gcgccagttg gcgtagttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 780

cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg 840

cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg 900

gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 960

aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1020

cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1080

tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1140

acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1200

ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 1260

ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1320

tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1380

tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 1440

ctggccttttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1500

gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1560

cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggta gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1620

gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc 1680

agtgagcgca acgcaagtcg acccgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga 1740

ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 1800

atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca 1860

gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg 1920

cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc 1980

tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt 2040

ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt 2100

ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg 2160

acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc tggtttagtg 2220

aaccgtctta agcgctagcg attacgccaa gctcggccac catgctctac ggcctggtgg 2280

ccttggtgct cctcctgctg attgccgcct gtgtgccgat cttcacccgg actgaaccca 2340

gaccggccct tactatcacc acttccccta acctcggcac ccgcgaaaac aacgccgacc 2400

aggtcacccc ggtgtcgcac atcggctgcc ccaacacgac acagcaggga tcacccgtgt 2460

ttgccaagct gctggcaaag aaccaggcct ctctctgcaa caccaccctg aactggcaca 2520

gccaggatgg agctggctca tcgtacctga gccagggcct tcgctacgaa gaggacaaga 2580

aggaactggt ggtggactcc ccgggactgt actacgtgtt cctcgaactc aagctgtcgc 2640

ctaccttcac caacactggg cacaaagtgc agggatgggt gtccctggtg ctgcaagcca 2700

agccccaagt cgacgacttc gacaacttgg cgctgaccgt ggagctgttc ccgtgctcca 2760

tggaaaacaa gcttgtggac cgcagctgga gccagctgct tctgctgaaa gccggtcacc 2820

ggctgtccgt gggactgagg gcctacctcc acggagcgca agacgcctac agggactggg 2880

agctctccta tccgaatacc acctcgttcg ggctgttcct ggtcaagcca gacaatcctt 2940

gggagggatc aggcgaggga agaggctcgc ttctgacttg cggcgatgtc gaggaaaacc 3000

cgggcccttg tcctcagaag ctaaccatct cctggtttgc catcgttttg ctggtgtctc 3060

cactcatggc catgtgggag ctggagaaag acgtttatgt tgtagaggtg gactggactc 3120

ccgatgcccc tggagaaaca gtgaacctca cctgtgacac gcctgaagaa gatgacatca 3180

cctggacctc agaccagaga catggagtca taggctctgg aaagaccctg accatcactg 3240

tcaaagagtt tctagatgct ggccagtaca cctgccacaa aggaggcgag actctgagcc 3300

actcacatct gctgctccac aagaaggaaa atggaatttg gtccactgaa attttaaaaa 3360

atttcaaaaa caagactttc ctgaagtgtg aagcaccaaa ttactccgga cggttcacgt 3420

gctcatggct ggtgcaaaga aacatggact tgaagttcaa catcaagagc agtagcagtt 3480

cccctgactc tcgggcagtg acatgtggaa tggcgtctct gtctgcagag aaggtcacac 3540

tggaccaaag ggactatgag aagtattcag tgtcctgcca ggaggatgtc acctgcccaa 3600

ctgccgagga gaccctgccc attgaactgg cgttggaagc acggcagcag aataaatatg 3660

agaactacag caccagcttc ttcatcaggg acatcatcaa accagacccg cccaagaact 3720

tgcagatgaa gcctttgaag aactcacagg tggaggtcag ctgggagtac cctgactcct 3780

ggagcactcc ccattcctac ttctccctca agttctttgt tcgaatccag cgcaagaaag 3840

aaaagatgaa ggagacagag gaggggtgta accagaaagg tgcgttcctc gtagagaaga 3900

catctaccga agtccaatgc aaaggcggga atgtctgcgt gcaagctcag gatcgctatt 3960

acaattcctc atgcagcaag tgggcatgtg ttccctgcag ggtccgatcc ggtggcggtg 4020

gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatctagggt cattccagtc tctggacctg 4080

ccaggtgtct tagccagtcc cgaaacctgc tgaagaccac agatgacatg gtgaagacgg 4140

ccagagaaaa actgaaacat tattcctgca ctgctgaaga catcgatcat gaagacatca 4200

cacgggacca aaccagcaca ttgaagacct gtttaccact ggaactacac aagaacgaga 4260

gttgcctggc tactagagag acttcttcca caacaagagg gagctgcctg cccccacaga 4320

agacgtcttt gatgatgacc ctgtgccttg gtagcatcta tgaggacttg aagatgtacc 4380

agacagagtt ccaggccatc aacgcagcac ttcagaatca caaccatcag cagatcattc 4440

tagacaaggg catgctggtg gccatcgatg agctgatgca gtctctgaat cataatggcg 4500

agactctgcg ccagaaacct cctgtgggag aagcagaccc ttacagagtg aaaatgaagc 4560

tctgcatcct gcttcacgcc ttcagcaccc gcgtcgtgac catcaacagg gtgatgggct 4620

atctgagctc cgccggaagc ggagctacta atttctcact gctgaaacag gccggcgatg 4680

ttgaagagaa tccgggacct ccccactcca gcctgcatcc atccatcccg tgtcccaggg 4740

gtcacggggc ccagaaggca gccttggttc tgctgagtgc ctgcctggtg acccctttggg 4800

ggctaggaga gccaccagag cacactctcc ggtacctggt cctccaccta gcctccctgc 4860

agctgggact gctgttaaac ggggtctgca gcctggctga ggagctgcgc cacatccact 4920

ccaggtaccg gggcagctac tggaggactg tgcgggcctg cctgggctgc cccctccgcc 4980

gtggggccct gttgctgctg tccatctatt tctactactc cctcccaaat gcggtcggcc 5040

cgcccttcac ttggatgctt gccctcctgg gcctctcgca ggcactgaac atcctcctgg 5100

gcctcaaggg cctggcccca gctgagatct ctgcagtgtg tgaaaaaggg aatttcaacg 5160

tggcccatgg gctggcatgg tcatattaca tcggatatct gcggctgatc ctgccagagc 5220

tccaggcccg gattcgaact tacaatcagc attacaacaa cctgctacgg ggtgcagtga 5280

gccagcggct gtatattctc ctcccattgg actgtggggt gcctgataac ctgagtatgg 5340

ctgaccccaa cattcgcttc ctggataaac tgccccagca gaccggtgac cgtgctggca 5400

tcaaggatcg ggtttacagc aacagcatct atgagcttct ggagaacggg cagcgggcgg 5460

gcacctgtgt cctggagtac gccacccccc tgcagacttt gtttgccatg tcacaataca 5520

gtcaagctgg ctttagccgg gaggatggcc ttgagcaggc caaactcttc tgccggacac 5580

ttgaggacat cctggcagat gcccctgagt ctcagaacaa ctgccgcctc attgcctacc 5640

aggaacctgc agatgacagc agcttctcgc tgtcccagga ggttctccgg cacctgcggc 5700

aggagaggca agaggaattt gccatcggcc ccaaaagagc gatgacagtg actacttcct 5760

ccactctcag ccaggagccc cagttgctca ttagcgggat ggagcaaccg ctttctctgc 5820

gcacagacgg gttctgaacc ggtatgttgc tcggcaacgg cctggtctgt gccaagtgtt 5880

tgctgacgca acccccactg gctggggctt ggccataggc catcagcgca tgcgtggaac 5940

ctttgtggct cctctgccga tccatactgc ggaactccta gccgcttgtt ttgctcgcag 6000

ccggtctggg gcaaagctca tcggaactga caattctgtc gtcctctcgc ggaaatatac 6060

atcgtttcca tggctgctag gttgtactgc caactgcatc cttcgcggga cgtcctttgt 6120

ttacgtcccg tcggcgctga atcccgcgga cgacccctct cggggccgct tgggactctc 6180

tcgtcccctt ctccgtctgc cgttccagcc gaccacgggg cgcacctctc tttacgcggt 6240

ctccccgtct gtgccttctc atctgccggt ccgtgtgcac ttcgcttcac ctctgcacgt 6300

tgcatggaga ccaccgtgaa cgcccatcag atcctgccca aggtcttaca taagaggact 6360

cttggactcc cagcaatgtc ggcgcgccct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 6420

tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa 6480

taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg 6540

gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg 6600

gtgggctcta tggggatccg ctccggctcg agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 6660

ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 6720

ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 6780

gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 6840

agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgaagcttta gaaaaactca tcgagcatca 6900

aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt 6960

tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc 7020

ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa 7080

taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa 7140

gtttatgcat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat 7200

cactcgcatc aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc 7260

gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg 7320

ccagcgcatc aacaatattt tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg 7380

tttttccggg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct 7440

tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa 7500

catcattggc aacgctacct ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc 7560

catacaagcg atagattgtc gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc 7620

catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat 7680

ggctcataac acccttgta ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg 7740

atatattttt atcttgtgca atgtaacatc agagattttg agacacgggc cagagctgca 7800

agcttctgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt 7860

aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt atggtgaagg atgcgccaca ggatactggc 7920

gcgcatacac agcacatctc tttgcaggaa aaaaacgcta tgaaaaatgt tggttttatc 7980

ggctggcgcg gaatggtcgg ctctgttctc atgcaacgca tggtagagga gcgcgatttc 8040

gacgctattc gccctgtttt cttttctacc tcccagtttg gacaggcggc gcccaccttc 8100

ggcgacacct ccaccggcac gctacaggac gcttttgatc tggatgcgct aaaagcgctc 8160

gatatcatcg tgacctgcca gggcggcgat tataccaacg aaatttatcc aaagctgcgc 8220

gaaagcggat ggcagggtta ctggattgat gcggcttcta cgctgcgcat gaaagatgat 8280

gccattatta ttctcgaccc ggtcaaccag gacgtgatta ccgacggcct 8330

<210> 400

<211> 1566

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Interleukin 15 receptor subunit alpha (IL15RA),
transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No.:
NM_002189.4)

<400> 400

ctgggcagcg ctcgcccggg gagtccagcg gtgtcctgtg gagctgccgc catggccccg 60

cggcgggcgc gcggctgccg gaccctcggt ctcccggcgc tgctactgct gctgctgctc 120

cggccgccgg cgacgcgggg catcacgtgc cctcccccca tgtccgtgga acacgcagac 180

atctgggtca agagctacag cttgtactcc agggagcggt acatttgtaa ctctggtttc 240

aagcgtaaag ccggcacgtc cagcctgacg gagtgcgtgt tgaacaaggc cacgaatgtc 300

gcccactgga caacccccag tctcaaatgc attagagacc ctgccctggt tcaccaaagg 360

ccagcgccac cctccacagt aacgacggca ggggtgaccc cacagccaga gagcctctcc 420

ccttctggaa aagagcccgc agcttcatct cccagctcaa acaacacagc ggccacaaca 480

gcagctattg tcccgggctc ccagctgatg ccttcaaaat caccttccac aggaaccaca 540

gagataagca gtcatgagtc ctcccacggc acccccctct agacaacagc caagaactgg 600

gaactcacag catccgcctc ccaccagccg ccaggtgtgt atccacaggg ccacagcgac 660

accactgtgg ctatctccac gtccactgtc ctgctgtgtg ggctgagcgc tgtgtctctc 720

ctggcatgct acctcaagtc aaggcaaact cccccgctgg ccagcgttga aatggaagcc 780

atggaggctc tgccggtgac ttgggggacc agcagcagag atgaagactt ggaaaactgc 840

tctcaccacc tatgaaactc ggggaaacca gcccagctaa gtccggagtg aaggagcctc 900

tctgctttag ctaaagacga ctgagaagag gtgcaaggaa gcgggctcca ggagcaagct 960

caccaggcct ctcagaagtc ccagcaggat ctcacggact gccgggtcgg cgcctcctgc 1020

gcgagggagc aggttctccg cattcccatg ggcaccacct gcctgcctgt cgtgccttgg 1080

acccagggcc cagcttccca ggagagacca aaggcttctg agcaggattt ttatttcatt 1140

acagtgtgag ctgcctggaa tacatgtggt aatgaaataa aaaccctgcc ccgaatcttc 1200

cgtccctcat cctaactttc agttcacaga gaaaagtgac atacccaaag ctctctgtca 1260

attacaaggc ttctcctggc gtgggagacg tctacaggga agacaccagc gtttgggctt 1320

ctaaccaccc tgtctccagc tgctctgcac acatggacag ggacctggga aaggtgggag 1380

agatgctgag cccagcgaat cctctccatt gaaggattca ggaagaagaa aactcaactc 1440

agtgccattt tacgaatata tgcgtttata tttatacttc cttgtctatt atatctatac 1500

attatatatt atttgtattt tgacattgta ccttgtataa acaaaataaa acatctattt 1560

tcaata 1566

<210> 401

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature Human IL-15 Receptor Subunit Alpha
(IL-15RA; UniProtKB Accession No.: Q13261)

<400> 401

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr

20 25 30

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser

35 40 45

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys

50 55 60

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

65 70 75 80

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala

130 135 140

Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr

145 150 155 160

Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser

165 170 175

Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln

180 185 190

Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile

195 200 205

Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg

245 250 255

Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu

260 265

<210> 402

<211> 2015

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-15 (IL-15 single chain (sc)), transcript

variant 3, mRNA (GenBank Accession No.:

NM_000585.5)

<400> 402

cttttcgcca ggggttggga ctccgggtgg caggcgcccg ggggaatccc agctgactcg 60

ctcactgcct tcgaagtccg gcgccccccg ggagggaact gggtggccgc accctcccgg 120

ctgcggtggc tgtcgccccc caccctgcag ccaggactcg atggagaatc cattccaata 180

tatggccatg tggctctttg gagcaatgtt ccatcatgtt ccatgctgct gacgtcacat 240

ggagcacaga aatcaatgtt agcagatagc cagcccatac aagatcgtat tgtattgtag 300

gaggcattgt ggatggatgg ctgctggaaa ccccttgcca tagccagctc ttcttcaata 360

cttaaggatt taccgtggct ttgagtaatg agaatttcga aaccacattt gagaagtatt 420

tccatccagt gctacttgtg tttacttcta aacagtcatt ttctaactga agctggcatt 480

catgtcttca ttttgggctg tttcagtgca gggcttccta aaacagaagc caactgggtg 540

aatgtaataa gtgatttgaa aaaaattgaa gatcttattc aatctatgca tattgatgct 600

actttatata cggaaagtga tgttcacccc agttgcaaag taacagcaat gaagtgcttt 660

ctcttggagt tacaagttat ttcacttgag tccggagatg caagtattca tgatacagta 720

gaaaatctga tcatcctagc aaacaacagt ttgtcttcta atgggaatgt aacagaatct 780

ggatgcaaag aatgtgagga actggaggaa aaaaatatta aagaattttt gcagagtttt 840

gtacatattg tccaaatgtt catcaacact tcttgattgc aattgattct ttttaaagtg 900

tttctgttat taacaaacat cactctgctg cttagacata acaaaacact cggcatttca 960

aatgtgctgt caaaacaagt ttttctgtca agaagatgat cagaccttgg atcagatgaa 1020

ctcttagaaa tgaaggcaga aaaatgtcat tgagtaatat agtgactatg aacttctctc 1080

agacttactt tactcatttt tttaatttat tattgaaatt gtacatattt gtggaataat 1140

gtaaaatgtt gaataaaaat atgtacaagt gttgtttttt aagttgcact gatattttac 1200

ctcttattgc aaaatagcat ttgtttaagg gtgatagtca aattatgtat tggtggggct 1260

gggtaccaat gctgcaggtc aacagctatg ctggtaggct cctgccagtg tggaaccact 1320

gactactggc tctcattgac ttccttacta agcatagcaa acagaggaag aatttgttat 1380

cagtaagaaa aagaagaact atatgtgaat cctcttcttt atactgtaat ttagttattg 1440

atgtataaag caactgttat gaaataaaga aattgcaata actggcatat aatgtccatc 1500

agtaaatctt ggtggtggtg gcaataataa acttctactg ataggtagaa tggtgtgcaa 1560

gcttgtccaa tcacggattg caggccacat gcggcccagg acaactttga atgtggccca 1620

acacaaattc ataaactttc atacatctcg tttttagctc atcagctatc attagcggta 1680

gtgtatttaa agtgtggccc aagacaattc ttcttattcc aatgtggccc agggaaatca 1740

aaagattgga tgcccctggt atagaaaact aatagtgaca gtgttcatat ttcatgcttt 1800

cccaaataca ggtattttat tttcacattc tttttgccat gtttatataa taataaagaa 1860

aaaccctgtt gatttgttgg agccattgtt atctgacaga aaataattgt ttatattttt 1920

tgcactacac tgtctaaaat tagcaagctc tcttctaatg gaactgtaag aaagatgaaa 1980

tatttttgtt ttattataaa tttatttcac cttaa 2015

<210> 403

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> mature Human IL-15 (IL-15sc) (UniProtKB Accession
No.: P40933)

<400> 403

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20 25 30

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

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile

130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

145 150 155 160

Thr Ser

<210> 404

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human IL-15Ralpha-IL-15sc fusion protein

<220>

<223> Portion of human IL-15Ralpha

<220>

<223> (GGGGS)4 linker

<220>

<223> Portion of human IL-15sc

<400> 404

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr

20 25 30

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser

35 40 45

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys

50 55 60

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

65 70 75 80

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp

85 90 95

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

100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

130 135 140

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val

145 150 155 160

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu

165 170 175

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

180 185 190

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn

195 200 205

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn

210 215 220

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile

225 230 235 240

Asn Thr Ser

<210> 405

<211> 263

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)...(263)

<223> Murine IL-15Ralpha (Interleukin-15 receptor subunit alpha; UniProtKB Accession No.: Q60819)

<400> 405

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

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Val Thr Pro

20 25 30

Gly Thr Thr Cys Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg

35 40 45

Val Lys Asn Tyr Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Lys Asn Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys

85 90 95

Ile Arg Asp Pro Ser Leu Ala His Tyr Ser Pro Val Pro Thr Val Val

100 105 110

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

115 120 125

Glu Pro Glu Ala Phe Ser Pro Lys Ser Asp Thr Ala Met Thr Thr Glu

130 135 140

Thr Ala Ile Met Pro Gly Ser Arg Leu Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Ala Ala Thr Met Thr Leu Glu Pro Thr Ala Ser Thr Ser Leu Arg

180 185 190

Ile Thr Glu Ile Ser Pro His Ser Ser Lys Met Thr Lys Val Ala Ile

195 200 205

Ser Thr Ser Val Leu Leu Val Gly Ala Gly Val Val Met Ala Phe Leu

210 215 220

Ala Trp Tyr Ile Lys Ser Arg Gln Pro Ser Gln Pro Cys Arg Val Glu

225 230 235 240

Val Glu Thr Met Glu Thr Val Pro Met Thr Val Arg Ala Ser Ser Lys
245 250 255
Glu Asp Glu Asp Thr Gly Ala
260

<210> 406
<211> 162
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<223> Murine IL-15 (single chain (sc); UniProtKB
Accession No.: P48346)
<400> 406
Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
1 5 10 15
Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30
Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
50 55 60
Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
65 70 75 80
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95
Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
100 105 110

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

Thr Ser

<210> 407

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Murine (mu) IL-15Ralpha-IL-15sc fusion protein

<220>

<223> Portion of murine IL-15Ralpha

<220>

<223> (GGGGS)4 linker

<220>

<223> Portion of murine IL-15 (muIL-15sc)

<400> 407

Met Ala Ser Pro Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Val Gln Ala Ile Pro Val
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Val Thr Pro
20 25 30

Gly Thr Thr Cys Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg
35 40 45

Val Lys Asn Tyr Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser
50 55 60

Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Thr Leu Ile Glu Cys Val Ile
65 70 75 80

Asn Lys Asn Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
85 90 95

Ile Arg Asp Pro Ser Leu Ala His Tyr Ser Pro Val Pro Thr Val Val
100 105 110

Thr Pro Lys Val Thr Ser Gln Pro Glu Ser Pro Ser Pro Ser Ala Lys
115 120 125

Glu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp
145 150 155 160

Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr
165 170 175

Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
180 185 190

Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn
195 200 205

Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser
210 215 220

Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
225 230 235 240

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile
245 250 255

Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
260 265

<210> 408

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> New spacer

<400> 408

acgtcttctc tttttaaagg acctcgtgaa ataaaagtgc 40

<210> 409

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Longer spacer

<400> 409

tccgagccaa gtaaggaggt ccctctctct ctctcccccc acgtcttctc tttttaaagg 60

acctcgtgaa ataaaagtgc 80

<210> 410

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DLL3HL x CD3HL TCRA

<400> 410

atggaaactg atactctgct gctctgggtg ctgctgcttt gggtgcccgg ttccaccggg 60

gatcaggtgc agctggtaca gagcggcgca gaagtgaaga agcccggagc cagcgttaaa 120

gtgtcctgca aggcctctgg ctacaccttc accaactatg gcatgaactg ggtccggcag 180

gctcctgggc aagggctgga gtggatgggc tggatcaata cttatacagg tgaaccaacc 240

tatgcggatg attttaaagg aagagtgacc atgactacag acacatctac ttccacagca 300

tacatggagt tgcgcagcct ccgatctgat gacactgctg tgtactactg tgccaggatt 360

ggagacagtt caccgagtga ctactggggg caaggtacgc ttgttaccgt ctcctcaggt 420

ggcggtggct cgggcggtgg tgggtcgggt ggcggcggat ctgaaattgt gatgacccag 480

agccctgcaa ctttgtctgt ttctccaggg gagagggcca cactttcctg taaagcttcc 540

cagtctgtca gcaatgatgt ggtgtggtac cagcagaagc caggacaagc accccggcta 600

ctcatctatt atgcgagcaa cagatatact ggaattcctg cccgcttcag tggctcaggt 660

tcagggacag agttcaccct gactatatcg tccctgcaga gtgaagactt tgctgtatac 720

tactgccagc aagactacac gagcccctgg acatttggcc agggcaccaa gctggagatc 780

aaaggcgggg gcggctctga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtgcagcct 840

ggaaagtccc tgaaactctc ctgtgaggcc tctggattca ccttcagcgg ctatggcatg 900

cactgggtcc gccaggctcc agggaggggg ctggagtcgg tcgcatacat tactagtagt 960

agtattaata tcaaatatgc tgacgctgtg aaaggccggt tcaccgtctc cagagacaat 1020

gccaagaact tactgtttct acaaatgaac attctcaagt ctgaggacac agccatgtac 1080

tactgtgcaa gattcgactg ggacaaaaat tactggggcc aaggaaccat ggtcaccgtc 1140

tcctcaggcg gaggtggttc cggtgggggt ggtagcggag gtggtgggtc agacatccag 1200

atgacccagt ctccatcatc actgcctgcc tccctgggag acagagtcac tatcaattgt 1260

caggccagtc aggacattag caattattta aactggtacc agcagaaacc agggaaagct 1320

cctaagctcc tgatctatta tacaaataaa ttggcagatg gagtcccatc aaggttcagt 1380

ggcagtggtt ctgggagaga ttcttctttc actatcagca gcctggaatc cgaagatatt 1440

ggatcttatt actgtcaaca gtattataac tatccgtgga cgttcggacc tggcaccaag 1500

ctggaaatca aatga 1515

<210> 411

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DLL3HL x CD3HL TCRA

<400> 411

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

65 70 75 80

Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser

85 90 95

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Val Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg

195 200 205

Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys

275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val

325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu

340 345 350

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp

355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile
465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly
485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
500

<210> 412

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG tag

<400> 412

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 413

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DLL3HL x CD3HL-FLAG TCRA

<400> 413

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser
85 90 95
Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr
100 105 110

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

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Val Trp Tyr Gln Gln
180 185 190
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg
195 200 205
Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
210 215 220
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
260 265 270
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys
275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg
290 295 300

Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser
305 310 315 320
Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val
325 330 335
Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu
340 345 350
Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp
355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
370 375 380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
385 390 395 400
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
405 410 415
Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
435 440 445
Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
450 455 460
Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile
465 470 475 480
Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly
485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
500 505 510

<210> 414

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DLL3LH x CD3HL TCRA

<400> 414

atggaaactg atactctgct gctctgggtg ctgctgcttt gggtgcccgg ttccaccggg 60

gatgaaattg tgatgaccca gagccctgca actttgtctg tttctccagg ggagagggcc 120

acactttcct gtaaagcttc ccagtctgtc agcaatgatg tggtgtggta ccagcagaag 180

ccaggacaag cacccCggct actcatctat tatgcgagca acagatatac tggaattcct 240

gcccgcttca gtggctcagg ttcagggaca gagttcaccc tgactatatc gtccctgcag 300

agtgaagact ttgctgtata ctactgccag caagactaca cgagcccctg gacatttggc 360

cagggcacca agctggagat caaaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420

ggcggatctc aggtgcagct ggtacagagc ggcgcagaag tgaagaagcc cggagccagc 480

gttaaagtgt cctgcaaggc ctctggctac accttcacca actatggcat gaactgggtc 540

cggcaggctc ctgggcaagg gctggagtgg atgggctgga tcaatactta tacaggtgaa 600

ccaacctatg cggatgattt taaaggaaga gtgaccatga ctacagacac atctacttcc 660

acagcataca tggagttgcg cagcctccga tctgatgaca ctgctgtgta ctactgtgcc 720

aggattggag acagttcacc gagtgactac tgggggcaag gtacgcttgt taccgtctcc 780

tcaggcgggg gcggctctga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtgcagcct 840

ggaaagtccc tgaaactctc ctgtgaggcc tctggattca ccttcagcgg ctatggcatg 900

cactgggtcc gccaggctcc agggaggggg ctggagtcgg tcgcatacat tactagtagt 960

agtattaata tcaaatatgc tgacgctgtg aaaggccggt tcaccgtctc cagagacaat 1020

gccaagaact tactgtttct acaaatgaac attctcaagt ctgaggacac agccatgtac 1080

tactgtgcaa gattcgactg ggacaaaaat tactggggcc aaggaaccat ggtcaccgtc 1140

tcctcaggcg gaggtggttc cggtgggggt ggtagcggag gtggtgggtc agacatccag 1200

atgacccagt ctccatcatc actgcctgcc tccctgggag acagagtcac tatcaattgt 1260

caggccagtc aggacattag caattattta aactggtacc agcagaaacc agggaaagct 1320

cctaagctcc tgatctatta tacaaataaa ttggcagatg gagtcccatc aaggttcagt 1380

ggcagtggtt ctgggagaga ttcttctttc actatcagca gcctggaatc cgaagatatt 1440

ggatcttatt actgtcaaca gtattataac tatccgtgga cgttcggacc tggcaccaag 1500

ctggaaatca aatga 1515

<210> 415

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> DLL3LH x CD3HL TCRA

<400> 415

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
20 25 30

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

Ser Val Ser Asn Asp Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp
100 105 110

Tyr Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
145 150 155 160

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
165 170 175

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
180 185 190

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
195 200 205

Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
210 215 220
Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240
Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
260 265 270
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys
275 280 285
Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg
290 295 300
Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser
305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val
325 330 335
Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu
340 345 350
Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp
355 360 365
Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
385 390 395 400
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
405 410 415
Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
420 425 430
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile

465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly

485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

500

<210> 416

<211> 1539

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DLL3LH x CD3HL-FLAG TCRA

<400> 416

atggaaactg atactctgct gctctgggtg ctgctgcttt gggtgcccgg ttccaccggg 60

gatgaaattg tgatgaccca gagccctgca actttgtctg tttctccagg ggagagggcc 120

acactttcct gtaaagcttc ccagtctgtc agcaatgatg tggtgtggta ccagcagaag 180

ccaggacaag caccccggct actcatctat tatgcgagca acagatatac tggaattcct 240

gcccgcttca gtggctcagg ttcagggaca gagttcaccc tgactatatc gtccctgcag 300

agtgaagact ttgctgtata ctactgccag caagactaca cgagcccctg gacatttggc 360

cagggcacca agctggagat caaaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420

ggcggatctc aggtgcagct ggtacagagc ggcgcagaag tgaagaagcc cggagccagc 480

gttaaagtgt cctgcaaggc ctctggctac accttcacca actatggcat gaactgggtc 540

cggcaggctc ctgggcaagg gctggagtgg atgggctgga tcaatactta tacaggtgaa 600

ccaacctatg cggatgattt taaaggaaga gtgaccatga ctacagacac atctacttcc 660

acagcataca tggagttgcg cagcctccga tctgatgaca ctgctgtgta ctactgtgcc 720

aggattggag acagttcacc gagtgactac tgggggcaag gtacgcttgt taccgtctcc 780

tcaggcgggg gcggctctga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtgcagcct 840

ggaaagtccc tgaaactctc ctgtgaggcc tctggattca ccttcagcgg ctatggcatg 900

cactgggtcc gccaggctcc agggaggggg ctggagtcgg tcgcatacat tactagtagt 960

agtattaata tcaaatatgc tgacgctgtg aaaggccggt tcaccgtctc cagagacaat 1020

gccaagaact tactgtttct acaaatgaac attctcaagt ctgaggacac agccatgtac 1080

tactgtgcaa gattcgactg ggacaaaaat tactggggcc aaggaaccat ggtcaccgtc 1140

tcctcaggcg gaggtggttc cggtgggggt ggtagcggag gtggtgggtc agacatccag 1200

atgacccagt ctccatcatc actgcctgcc tccctgggag acagagtcac tatcaattgt 1260

caggccagtc aggacattag caattattta aactggtacc agcagaaacc agggaaagct 1320

cctaagctcc tgatctatta tacaaataaa ttggcagatg gagtcccatc aaggttcagt 1380

ggcagtggtt ctgggagaga ttcttctttc actatcagca gcctggaatc cgaagatatt 1440

ggatcttatt actgtcaaca gtattataac tatccgtgga cgttcggacc tggcaccaag 1500

ctggaaatca aagattataa agacgatgat gacaagtga 1539

<210> 417

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DLL3LH x CD3HL-FLAG TCRA

<400> 417

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

Ser Val Ser Asn Asp Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp
100 105 110

Tyr Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

130 135 140

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser

145 150 155 160

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly

165 170 175

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

180 185 190

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

195 200 205

Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys

275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val

325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu

340 345 350

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp

355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp

420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr

435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile

465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly

485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

500 505 510

<210> 418

<211> 531

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MT103 (CD19LH x CD3HL TCRA)

<400> 418

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Ile Gln Leu Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu

50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

65 70 75 80

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser

85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val

100 105 110

Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser

145 150 155 160

Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

165 170 175

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln

180 185 190

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp

195 200 205

Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

210 215 220

Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln

275 280 285

Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys

290 295 300

Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys

305 310 315 320

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser

325 330 335

Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu

340 345 350

Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

385 390 395 400

Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

405 410 415

Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala

420 425 430

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val

435 440 445

Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg

450 455 460

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe

465 470 475 480

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met

485 490 495

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

500 505 510

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His

515 520 525

His His His

530

<210> 419

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> purm-1 primer

<400> 419

ccagatgtgg cttgtttata cttcgc 26

<210> 420

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> purm-2 primer

<400> 420

ccttattgct gaatactgcc ctgag 25

<210> 421

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> purm-3 primer

<400> 421

cgtgtcgcaa ttcttaatgc catag 25

<210> 422

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> purm-4 primer

<400> 422

caaacatcgg actcagaata cgc 23

<210> 423

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> purm-5 primer

<400> 423

caggcgataa aggctaacaa ccg 23

<210> 424

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> purm-6 primer

<400> 424

ttgacctgga tcaaccaaaa gcg 23

<210> 425

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> acrd-1 primer

<400> 425

cctgcgaccg atactgatga c 21

<210> 426

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> acrd-3 primer

<400> 426

gctactcgct acctggatgc 20

<210> 427

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-human CTLA-4 scFv-Fc

<400> 427

atggagacac ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggc 60

gagatcgtgc tgacccagtc tcctggcacc ctgagcctga gccccggcga gagagccaca 120

ctgagctgca gagcttctca gagcgtcgga tcttcttatc tggcctggta tcagcaaaag 180

cccggacaag ctcctcggct gctgatctac ggcgccttca gccgggctac aggcatccct 240

gatagattca gcggcagcgg ctctggcact gatttcaccc tgaccattag cagactggaa 300

cctgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagtacggga gcagcccttg gacctttgga 360

caaggcacca aggtggaaat caagcgtgga ggaggcggct caggcggcgg aggaagcggc 420

ggcggcggct ccggcggcgg aggcagccag gttcagctgg ttgaaagcgg aggcggcgtg 480

gtccagcctg gtagaagcct gcggctgtct tgcgccgcca gcggctttac atttagcagc 540

tacaccatgc actgggtgcg gcaggcccct ggcaagggcc tggaatgggt caccttcatc 600

agctacgacg gcaacaacaa gtactacgcc gacagcgtga aaggcagatt caccatcagc 660

agagataatt ctaaaaacac cctgtacctg caaatgaaca gcctcagagc cgaggatacc 720

gctatctact actgtgccag aacaggctgg ctgggccccc tcgactactg gggccagggc 780

acactggtga ccgtgtctag cgagcctaag tcttccgata agacacacac ctgccctccg 840

tgccccgccc ctgaactgct cggcggacct agcgtgttcc tgttccctcc aaagcctaag 900

gacaccctga tgatctctcg aacacctgag gtgacctgcg tggtggtgga cgtgtcccac 960

gaggaccccg aggtgaagtt caactggtac gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag 1020

acaaaaccta gagaggagca gtacaacagc acctacagag tggtgtccgt gctgaccgtg 1080

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg 1140

cctgccccta tcgagaagac catcagcaag gctaaaggcc agcccagaga gccccaggtg 1200

tacacactgc ctccaagcag ggacgagctg accaagaacc aggtcagcct gacatgtctg 1260

gtgaagggct tctaccttc tgacatcgcc gtggaatggg agagcaacgg ccagcccgag 1320

aacaactaca agacgacccc tcctgtgctg gacagcgacg gatccttctt cctgtacagc 1380

aagctgacag ttgataagtc ccggtggcag cagggcaatg tgtttagctg tagcgtgatg 1440

cacgaggccc tgcataatca ctacacccag aaaagcctta gcctgtcccc aggcaaatga 1500

<210> 428

<211> 499

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-human CTLA-4 scFv-Fc

<400> 428

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
145 150 155 160

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
165 170 175

Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
180 185 190

Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr
195 200 205

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
210 215 220

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

225 230 235 240

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser

260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495
Pro Gly Lys

<210> 429
<211> 267
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> anti-human CTLA-4 scFv
<400> 429
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

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

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

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

165 170 175

Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

180 185 190

Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr

195 200 205

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

210 215 220

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

225 230 235 240

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

260 265

<210> 430

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-Mouse CTLA-4 scFv

<400> 430

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140
Gly Gly Ser Glu Ala Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys
145 150 155 160
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
165 170 175
Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
180 185 190
Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn

195 200 205
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
210 215 220
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
225 230 235 240
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
245 250 255
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 431
<211> 497
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Anti-Mouse CTLA-4 scFv-Fc
<400> 431
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Thr Leu Ser Leu Pro

```
            20                  25                  30
Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
    50                  55                  60
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65                  70                  75                  80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                85                  90                  95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
            100                 105                 110

Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140
Gly Gly Ser Glu Ala Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys
145                 150                 155                 160
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
                165                 170                 175

Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
        195                 200                 205
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
    210                 215                 220
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
225                 230                 235                 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
                245                 250                 255
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
            260                 265                 270
```

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
275 280 285
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
290 295 300

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
305 310 315 320
Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
325 330 335
Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
340 345 350
Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
355 360 365

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
370 375 380
Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
385 390 395 400
Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
405 410 415
Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
420 425 430

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
435 440 445
Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
450 455 460
Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
465 470 475 480
Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
485 490 495

Lys

<210> 432

<211> 618

<212> DNA

<213> Rickettsia prowazekii

<220>

<223> Phospholipase D gene (pld)

<400> 432

atgaagagca aaaataataa atttatagca gtatctatct cctttatttt gggaatcgct 60

ttaggtattt atgtagagag tacttattat tttactaata taataaatag caaatcattt 120

tctttatcta atgcacaaat aaactattat agtatttcag aactttcaag aagtaatgtg 180

agtacatgtt ttactccacc tgccggttgt actaaattta tagtgcagca gatagagaaa 240

gctgaagaat ctatttatat gcaggcatat ggtatgagcg attcattaat tactactgca 300

cttattaatg cacagatgcg aggagtaaaa gtgagaatat tactcgatcg tagtaattta 360

aagcagaaat tttctaaatt atatgaatta caacaagcaa aaattgatgt tggcatagat 420

acggtacctg gcattgccca taataaagtt ataattattg ataaaaagaa agtaataact 480

ggttcgttta atttcacggt ttctgctgat aaacgtaatg ctgaaaatgt aattcttata 540

gaagatcgga aattagcaga gtcttattta caaaattggt tcagtcggaa aacaacgagt 600

aatgcagtac atttttag 618

<210> 433

<211> 205

<212> PRT

<213> Rickettsia prowazekii

<220>

<223> Phospholipase D (Pld) protein

<400> 433

Met Lys Ser Lys Asn Asn Lys Phe Ile Ala Val Ser Ile Ser Phe Ile

1 5 10 15

Leu Gly Ile Ala Leu Gly Ile Tyr Val Glu Ser Thr Tyr Tyr Phe Thr

20 25 30

Asn Ile Ile Asn Ser Lys Ser Phe Ser Leu Ser Asn Ala Gln Ile Asn

35 40 45

Tyr Tyr Ser Ile Ser Glu Leu Ser Arg Ser Asn Val Ser Thr Cys Phe

50 55 60

Thr Pro Pro Ala Gly Cys Thr Lys Phe Ile Val Gln Gln Ile Glu Lys

65 70 75 80

Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Met Gln Ala Tyr Gly Met Ser Asp Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ile Leu Leu Asp Arg Ser Asn Leu Lys Gln Lys Phe Ser Lys Leu Tyr

115 120 125

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

130 135 140

Ile Ala His Asn Lys Val Ile Ile Ile Asp Lys Lys Lys Val Ile Thr

145 150 155 160

Gly Ser Phe Asn Phe Thr Val Ser Ala Asp Lys Arg Asn Ala Glu Asn

165 170 175

Val Ile Leu Ile Glu Asp Arg Lys Leu Ala Glu Ser Tyr Leu Gln Asn

180 185 190

Trp Phe Ser Arg Lys Thr Thr Ser Asn Ala Val His Phe

195 200 205

<210> 434

<211> 547

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VCIP IRES

<400> 434

agaaaacaaa cccaggcgat cacagcagca gccgccgcgg cagcagcacc aacagcagga 60

ggagcaggag gagccggagg aggaggagga ggaggaggca aagttagagt tggggctggc 120

gctccggagt tgctgggctc agcgcagctc ccattcatta aggaaccagc tgcggaggaa 180

ggtggccgag cgcccgcgct gcccactcgc tcgctcgcgc actcagacgc gcgccacaac 240

agcgcgcccc aagctgcgca gctctgcaaa agtttctgct cgggatctgg ctctcttccc 300

cttggacttt agaacgattt agggttgaca gaggaaagca gaggcgcgca ggaggagcag 360

aaaacaccac cttctgcagt tggaggcagg cagccccggc tgcactctag ccgccgcgcc 420

cggagccggg gccgacccgc cactatccgc agcagcctcg gccaggaggc gacccgggcg 480

cctgggtgtg tggctgctgt tgcgggacgt cttcgcgggg cgggaggctc gcgccgcagc 540

cagcgcc 547

<210> 435

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sialidase-2 (Human Neu2)

<400> 435

Met Ala Ser Leu Pro Val Leu Gln Lys Glu Ser Val Phe Gln Ser Gly

1 5 10 15

Ala His Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Leu Leu Tyr Leu Pro Gly Gln Gln

20 25 30

Ser Leu Leu Ala Phe Ala Glu Gln Arg Ala Ser Lys Lys Asp Glu His

35 40 45

Ala Glu Leu Ile Val Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Asp Ala Pro Thr His

50 55 60

Gln Val Gln Trp Gln Ala Gln Glu Val Val Ala Gln Ala Arg Leu Asp

65 70 75 80

Gly His Arg Ser Met Asn Pro Cys Pro Leu Tyr Asp Ala Gln Thr Gly

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gln Leu Gln Thr Arg Ala Asn Val Thr Arg Leu Cys Gln Val Thr

115 120 125

Ser Thr Asp His Gly Arg Thr Trp Ser Ser Pro Arg Asp Leu Thr Asp

130 135 140

Ala Ala Ile Gly Pro Ala Tyr Arg Glu Trp Ser Thr Phe Ala Val Gly

145 150 155 160

Pro Gly His Cys Leu Gln Leu His Asp Arg Ala Arg Ser Leu Val Val

165 170 175

Pro Ala Tyr Ala Tyr Arg Lys Leu His Pro Ile Gln Arg Pro Ile Pro

180 185 190

Ser Ala Phe Cys Phe Leu Ser His Asp His Gly Arg Thr Trp Ala Arg

195 200 205

Gly His Phe Val Ala Gln Asp Thr Leu Glu Cys Gln Val Ala Glu Val

210 215 220

Glu Thr Gly Glu Gln Arg Val Val Thr Leu Asn Ala Arg Ser His Leu

225 230 235 240

Arg Ala Arg Val Gln Ala Gln Ser Thr Asn Asp Gly Leu Asp Phe Gln

245 250 255

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

260 265 270

Gln Gly Ser Val Ile Ser Phe Pro Ser Pro Arg Ser Gly Pro Gly Ser

275 280 285

Pro Ala Gln Trp Leu Leu Tyr Thr His Pro Thr His Ser Trp Gln Arg

290 295 300

Ala Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Asn Pro Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ala

305 310 315 320

Trp Ser Glu Pro Val Leu Leu Ala Lys Gly Ser Cys Ala Tyr Ser Asp

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Leu Lys Gln Ala Phe Pro Ala Glu Tyr Leu Pro Gln

370 375 380

<210> 436

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human FLT-3 Ligand

<400> 436

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

Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln
65 70 75 80
Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly
85 90 95
Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala
100 105 110
Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser
115 120 125

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp
130 135 140
Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro
145 150 155 160
Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala
165 170 175
Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
180 185 190

Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln
195 200 205
Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val
210 215 220
Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu His

225 230 235

<210> 437

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human soluble TGF-beta Receptor II-Fc Fusion (hu
sTGFbRII-Fc)

<220

>

<221> misc_feature

<222> (1)...(159)

<223> Human soluble TGF-beta Receptor II

<220>

<221> misc_feature

<222> (160)...(391)

<223> human IgG1 Fc

<400> 437

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

35 40 45

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln
50 55 60

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
85 90 95

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile

100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys

115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn

130 135 140

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Glu

145 150 155 160

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

165 170 175

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

180 185 190

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

195 200 205

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

210 215 220

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

225 230 235 240

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

245 250 255

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

260 265 270

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

275 280 285

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

290 295 300

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

305 310 315 320

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

325 330 335

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

340 345 350

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

355 360 365

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
370 375 380

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 438

<211> 1273

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> SARS-CoV-2 Spike (S) Glycoprotein

<400> 438

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val
1 5 10 15

Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe
20 25 30

Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu
35 40 45

His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp
50 55 60

Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp
65 70 75 80

Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu
85 90 95

Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser
100 105 110

Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile
115 120 125

Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr
130 135 140

Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr
145 150 155 160

Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu

165 170 175

Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe

180 185 190

Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr

195 200 205

Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu

210 215 220

Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro

260 265 270

Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala

275 280 285

Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys

290 295 300

Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val

305 310 315 320

Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys

325 330 335

Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala

340 345 350

Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu

355 360 365

Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro

370 375 380

Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
420 425 430

Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
435 440 445

Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
450 455 460

Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
465 470 475 480

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
485 490 495

Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
500 505 510

Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
515 520 525

Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
530 535 540

Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
545 550 555 560

Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
565 570 575

Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
580 585 590

Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
595 600 605

Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
610 615 620

His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
625 630 635 640

Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val
645 650 655

Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala

660 665 670

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

675 680 685

Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser

690 695 700

Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile

705 710 715 720

Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val

725 730 735

Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu

740 745 750

Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr

755 760 765

Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln

770 775 780

Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp

835 840 845

Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu

850 855 860

Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly

865 870 875 880

Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile

885 890 895

Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr

900 905 910

Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn
915 920 925

Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala
930 935 940

Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn
945 950 955 960

Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val
965 970 975

Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln
980 985 990

Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val
995 1000 1005

Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu
1010 1015 1020

Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val
1025 1030 1035 1040

Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala
1045 1050 1055

Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu
1060 1065 1070

Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Asp Gly Lys Ala His
1075 1080 1085

Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val
1090 1095 1100

Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr
1105 1110 1115 1120

Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr
1125 1130 1135

Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu
1140 1145 1150

Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp

1155 1160 1165

Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp
1170 1175 1180

Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu
1185 1190 1195 1200

Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile
1205 1210 1215

Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile
1220 1225 1230

Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
1235 1240 1245

Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val
1250 1255 1260

Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
1265 1270

<210> 439

<211> 3822

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> SARS-CoV-2 glycoprotein

<400> 439

atgtttgttt ttcttgtttt attgccacta gtctctagtc agtgtgttaa tcttacaacc 60

agaactcaat tacccccctgc atacactaat tctttcacac gtggtgttta ttaccctgac 120

aaagttttca gatcctcagt tttacattca actcaggact tgttcttacc tttcttttcc 180

aatgttactt ggttccatgc tatacatgtc tctgggacca atggtactaa gaggtttgat 240

aaccctgtcc taccatttaa tgatggtgtt tattttgctt ccactgagaa gtctaacata 300

ataagaggct ggatttttgg tactacttta gattcgaaga cccagtccct acttattgtt 360

aataacgcta ctaatgttgt tattaaagtc tgtgaatttc aattttgtaa tgatccattt 420

ttgggtgttt attaccacaa aaacaacaaa agttggatgg aaagtgagtt cagagtttat 480

tctagtgcga ataattgcac ttttgaatat gtctctcagc cttttcttat ggaccttgaa 540

ggaaaacagg gtaatttcaa aaatcttagg gaatttgtgt ttaagaatat tgatggttat 600

tttaaaatat attctaagca cacgcctatt aatttagtgc gtgatctccc tcagggtttt 660

tcggctttag aaccattggt agatttgcca ataggtatta acatcactag gtttcaaact 720

ttacttgctt tacatagaag ttatttgact cctggtgatt cttcttcagg ttggacagct 780

ggtgctgcag cttattatgt gggttatctt caacctagga cttttctatt aaaatataat 840

gaaaatggaa ccattacaga tgctgtagac tgtgcacttg accctctctc agaaacaaag 900

tgtacgttga aatccttcac tgtagaaaaa ggaatctatc aaacttctaa ctttagagtc 960

caaccaacag aatctattgt tagatttcct aatattacaa acttgtgccc ttttggtgaa 1020

gtttttaacg ccaccagatt tgcatctgtt tatgcttgga acaggaagag aatcagcaac 1080

tgtgttgctg attattctgt cctatataat tccgcatcat tttccacttt taagtgttat 1140

ggagtgtctc ctactaaatt aaatgatctc tgctttacta atgtctatgc agattcattt 1200

gtaattagag gtgatgaagt cagacaaatc gctccagggc aaactggaaa gattgctgat 1260

tataattata aattaccaga tgattttaca ggctgcgtta tagcttggaa ttctaacaat 1320

cttgattcta aggttggtgg taattataat tacctgtata gattgtttag gaagtctaat 1380

ctcaaacctt ttgagagaga tatttcaact gaaatctatc aggccggtag cacaccttgt 1440

aatggtgttg aaggttttaa ttgttacttt cctttacaat catatggttt ccaacccact 1500

aatggtgttg gttaccaacc atacagagta gtagtacttt cttttgaact tctacatgca 1560

ccagcaactg tttgtggacc taaaaagtct actaatttgg ttaaaaacaa atgtgtcaat 1620

ttcaacttca atggtttaac aggcacaggt gttcttactg agtctaacaa aaagtttctg 1680

cctttccaac aatttggcag agacattgct gacactactg atgctgtccg tgatccacag 1740

acacttgaga ttcttgacat tacaccatgt tcttttggtg gtgtcagtgt tataacacca 1800

ggaacaaata cttctaacca ggttgctgtt ctttatcagg atgttaactg cacagaagtc 1860

cctgttgcta ttcatgcaga tcaacttact cctacttggc gtgtttattc tacaggttct 1920

aatgtttttc aaacacgtgc aggctgttta ataggggctg aacatgtcaa caactcatat 1980

gagtgtgaca tacccattgg tgcaggtata tgcgctagtt atcagactca gactaattct 2040

cctcggcggg cacgtagtgt agctagtcaa tccatcattg cctacactat gtcacttggt 2100

gcagaaaatt cagttgctta ctctaataac tctattgcca tacccacaaa ttttactatt 2160

agtgttacca cagaaattct accagtgtct atgaccaaga catcagtaga ttgtacaatg 2220

tacatttgtg gtgattcaac tgaatgcagc aatcttttgt tgcaatatgg cagtttttgt 2280

acacaattaa accgtgcttt aactggaata gctgttgaac aagacaaaaa cacccaagaa 2340

gtttttgcac aagtcaaaca aatttacaaa acaccaccaa ttaaagattt tggtggtttt 2400

aatttttcac aaatattacc agatccatca aaaccaagca agaggtcatt tattgaagat 2460

ctacttttca acaaagtgac acttgcagat gctggcttca tcaaacaata tggtgattgc 2520
cttggtgata ttgctgctag agacctcatt tgtgcacaaa agtttaacgg ccttactgtt 2580
ttgccacctt tgctcacaga tgaaatgatt gctcaataca cttctgcact gttagcgggt 2640
acaatcactt ctggttggac ctttggtgca ggtgctgcat tacaaatacc atttgctatg 2700
caaatggctt ataggtttaa tggtattgga gttacacaga atgttctcta tgagaaccaa 2760
aaattgattg ccaaccaatt taatagtgct attggcaaaa ttcaagactc actttcttcc 2820
acagcaagtg cacttggaaa acttcaagat gtggtcaacc aaaatgcaca agctttaaac 2880
acgcttgtta aacaacttag ctccaatttt ggtgcaattt caagtgtttt aaatgatatc 2940

ctttcacgtc ttgacaaagt tgaggctgaa gtgcaaattg ataggttgat cacaggcaga 3000
cttcaaagtt tgcagacata tgtgactcaa caattaatta gagctgcaga aatcagagct 3060
tctgctaatc ttgctgctac taaaatgtca gagtgtgtac ttggacaatc aaaaagagtt 3120
gatttttgtg gaaagggcta tcatcttatg tccttccctc agtcagcacc tcatggtgta 3180
gtcttcttgc atgtgactta tgtccctgca caagaaaaga acttcacaac tgctcctgcc 3240
atttgtcatg atggaaaagc acactttcct cgtgaaggtg tctttgtttc aaatggcaca 3300
cactggtttg taacacaaag gaatttttat gaaccacaaa tcattactac agacaacaca 3360
tttgtgtctg gtaactgtga tgttgtaata ggaattgtca acaacacagt ttatgatcct 3420

ttgcaacctg aattagactc attcaaggag gagttagata aatattttaa gaatcataca 3480
tcaccagatg ttgatttagg tgacatctct ggcattaatg cttcagttgt aaacattcaa 3540
aaagaaattg accgcctcaa tgaggttgcc aagaatttaa atgaatctct catcgatctc 3600
caagaacttg gaaagtatga gcagtatata aaatggccat ggtacatttg gctaggtttt 3660
atagctggct tgattgccat agtaatggtg acaattatgc tttgctgtat gaccagttgc 3720
tgtagttgtc tcaagggctg ttgttcttgt ggatcctgct gcaaatttga tgaagacgac 3780
tctgagccag tgctcaaagg agtcaaatta cattacacat aa 3822

<210
> 440
<211> 223
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Receptor Binding Domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike
Protein

<400> 440

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15

Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln
85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr
100 105 110

Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly
115 120 125

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys
130 135 140

Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr
145 150 155 160

Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser
165 170 175

Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
180 185 190

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
195 200 205

Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe
210 215 220

<210> 441

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Portion of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor

Binding Domain (RBD)

<400> 441

Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val
1 5 10 15

Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His
20 25 30

Ala Pro Ala Thr Val Cys
35

<210> 442

<211> 991

<212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<220>

<223> Gingipain R1 (Arginine-gingipain A or RgpA; UniProt Accession No.: P28784)

<400> 442

Met Lys Asn Leu Asn Lys Phe Val Ser Ile Ala Leu Cys Ser Ser Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Met Ala Phe Ala Gln Gln Thr Glu Leu Gly Arg Asn Pro
20 25 30

Asn Val Arg Leu Leu Glu Ser Thr Gln Gln Ser Val Thr Lys Val Gln
35 40 45

Phe Arg Met Asp Asn Leu Lys Phe Thr Glu Val Gln Thr Pro Lys Gly
50 55 60

Met Ala Gln Val Pro Thr Tyr Thr Glu Gly Val Asn Leu Ser Glu Lys
65 70 75 80

Gly Met Pro Thr Leu Pro Ile Leu Ser Arg Ser Leu Ala Val Ser Asp
85 90 95

Thr Arg Glu Met Lys Val Glu Val Val Ser Ser Lys Phe Ile Glu Lys
100 105 110

Lys Asn Val Leu Ile Ala Pro Ser Lys Gly Met Ile Met Arg Asn Glu
115 120 125

Asp Pro Lys Lys Ile Pro Tyr Val Tyr Gly Lys Ser Tyr Ser Gln Asn
130 135 140
Lys Phe Phe Pro Gly Glu Ile Ala Thr Leu Asp Asp Pro Phe Ile Leu
145 150 155 160
Arg Asp Val Arg Gly Gln Val Val Asn Phe Ala Pro Leu Gln Tyr Asn
165 170 175
Pro Val Thr Lys Thr Leu Arg Ile Tyr Thr Glu Ile Thr Val Ala Val
180 185 190

Ser Glu Thr Ser Glu Gln Gly Lys Asn Ile Leu Asn Lys Lys Gly Thr
195 200 205
Phe Ala Gly Phe Glu Asp Thr Tyr Lys Arg Met Phe Met Asn Tyr Glu
210 215 220
Pro Gly Arg Tyr Thr Pro Val Glu Glu Lys Gln Asn Gly Arg Met Ile
225 230 235 240
Val Ile Val Ala Lys Lys Tyr Glu Gly Asp Ile Lys Asp Phe Val Asp
245 250 255

Trp Lys Asn Gln Arg Gly Leu Arg Thr Glu Val Lys Val Ala Glu Asp
260 265 270
Ile Ala Ser Pro Val Thr Ala Asn Ala Ile Gln Gln Phe Val Lys Gln
275 280 285
Glu Tyr Glu Lys Glu Gly Asn Asp Leu Thr Tyr Val Leu Leu Val Gly
290 295 300
Asp His Lys Asp Ile Pro Ala Lys Ile Thr Pro Gly Ile Lys Ser Asp
305 310 315 320

Gln Val Tyr Gly Gln Ile Val Gly Asn Asp His Tyr Asn Glu Val Phe
325 330 335
Ile Gly Arg Phe Ser Cys Glu Ser Lys Glu Asp Leu Lys Thr Gln Ile
340 345 350
Asp Arg Thr Ile His Tyr Glu Arg Asn Ile Thr Thr Glu Asp Lys Trp

355 360 365

Leu Gly Gln Ala Leu Cys Ile Ala Ser Ala Glu Gly Gly Pro Ser Ala

370 375 380

Asp Asn Gly Glu Ser Asp Ile Gln His Glu Asn Val Ile Ala Asn Leu

385 390 395 400

Leu Thr Gln Tyr Gly Tyr Thr Lys Ile Ile Lys Cys Tyr Asp Pro Gly

405 410 415

Val Thr Pro Lys Asn Ile Ile Asp Ala Phe Asn Gly Gly Ile Ser Leu

420 425 430

Val Asn Tyr Thr Gly His Gly Ser Glu Thr Ala Trp Gly Thr Ser His

435 440 445

Phe Gly Thr Thr His Val Lys Gln Leu Thr Asn Ser Asn Gln Leu Pro

450 455 460

Phe Ile Phe Asp Val Ala Cys Val Asn Gly Asp Phe Leu Phe Ser Met

465 470 475 480

Pro Cys Phe Ala Glu Ala Leu Met Arg Ala Gln Lys Asp Gly Lys Pro

485 490 495

Thr Gly Thr Val Ala Ile Ile Ala Ser Thr Ile Asn Gln Ser Trp Ala

500 505 510

Ser Pro Met Arg Gly Gln Asp Glu Met Asn Glu Ile Leu Cys Glu Lys

515 520 525

His Pro Asn Asn Ile Lys Arg Thr Phe Gly Gly Val Thr Met Asn Gly

530 535 540

Met Phe Ala Met Val Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Met Leu

545 550 555 560

Asp Thr Trp Thr Val Phe Gly Asp Pro Ser Leu Leu Val Arg Thr Leu

565 570 575

Val Pro Thr Lys Met Gln Val Thr Ala Pro Ala Gln Ile Asn Leu Thr

580 585 590

Asp Ala Ser Val Asn Val Ser Cys Asp Tyr Asn Gly Ala Ile Ala Thr

595 600 605

Ile Ser Ala Asn Gly Lys Met Phe Gly Ser Ala Val Val Glu Asn Gly
610 615 620
Thr Ala Thr Ile Asn Leu Thr Gly Leu Thr Asn Glu Ser Thr Leu Thr
625 630 635 640

Leu Thr Val Val Gly Tyr Asn Lys Glu Thr Val Ile Lys Thr Ile Asn
645 650 655
Thr Asn Gly Glu Pro Asn Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala
660 665 670
Thr Thr Gln Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Ser Thr
675 680 685
Lys Thr Asn Ala Thr Thr Asn Thr Ala Arg Ser Val Asp Gly Ile Arg
690 695 700

Glu Leu Val Leu Leu Ser Val Ser Asp Ala Pro Glu Leu Leu Arg Ser
705 710 715 720
Gly Gln Ala Glu Ile Val Leu Glu Ala His Asp Val Trp Asn Asp Gly
725 730 735
Ser Gly Tyr Gln Ile Leu Leu Asp Ala Asp His Asp Gln Tyr Gly Gln
740 745 750
Val Ile Pro Ser Asp Thr His Thr Leu Trp Pro Asn Cys Ser Val Pro
755 760 765

Ala Asn Leu Phe Ala Pro Phe Glu Tyr Thr Val Pro Glu Asn Ala Asp
770 775 780
Pro Ser Cys Ser Pro Thr Asn Met Ile Met Asp Gly Thr Ala Ser Val
785 790 795 800
Asn Ile Pro Ala Gly Thr Tyr Asp Phe Ala Ile Ala Ala Pro Gln Ala
805 810 815
Asn Ala Lys Ile Trp Ile Ala Gly Gln Gly Pro Thr Lys Glu Asp Asp
820 825 830

Tyr Val Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr His Phe Leu Met Lys Lys Met
835 840 845
Gly Ser Gly Asp Gly Thr Glu Leu Thr Ile Ser Glu Gly Gly Gly Ser

850 855 860

Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly

865 870 875 880

Leu Thr Glu Thr Thr Tyr Arg Asp Ala Gly Met Ser Ala Gln Ser His

885 890 895

Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Val Ser Pro Lys Val

900 905 910

Cys Val Asp Tyr Ile Pro Asp Gly Val Ala Asp Val Thr Ala Gln Lys

915 920 925

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

930 935 940

Gly Glu Ala Met Ile Tyr Asp Met Asn Gly Arg Arg Leu Ala Ala Gly

945 950 955 960

Arg Asn Thr Val Val Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Met

965 970 975

Val Val Val Asp Gly Lys Ser Tyr Val Glu Lys Leu Ala Val Lys

980 985 990

<210> 443

<211> 736

<212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<220>

<223> Gingipain R2 (Arginine-gingipain B or RgpB; UniProt Accession No.: P95493)

<400> 443

Met Lys Lys Asn Phe Ser Arg Ile Val Ser Ile Val Ala Phe Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gln Val Arg Leu Leu Ser Ala Glu Gln Ser Met Ser Lys Val Gln

35 40 45

Phe Arg Met Asp Asn Leu Gln Phe Thr Gly Val Gln Thr Ser Lys Gly

50 55 60

Val Ala Gln Val Pro Thr Phe Thr Glu Gly Val Asn Ile Ser Glu Lys
65 70 75 80

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

Lys Phe Phe Pro Gly Glu Ile Ala Thr Leu Ser Asp Pro Phe Ile Leu
145 150 155 160
Arg Asp Val Arg Gly Gln Val Val Asn Phe Ala Pro Leu Gln Tyr Asn
165 170 175
Pro Val Thr Lys Thr Leu Arg Ile Tyr Thr Glu Ile Val Val Ala Val
180 185 190
Ser Glu Thr Ala Glu Ala Gly Gln Asn Thr Ile Ser Leu Val Lys Asn
195 200 205

Ser Thr Phe Thr Gly Phe Glu Asp Ile Tyr Lys Ser Val Phe Met Asn
210 215 220
Tyr Glu Ala Thr Arg Tyr Thr Pro Val Glu Glu Lys Glu Asn Gly Arg
225 230 235 240
Met Ile Val Ile Val Pro Lys Lys Tyr Glu Glu Asp Ile Glu Asp Phe
245 250 255
Val Asp Trp Lys Asn Gln Arg Gly Leu Arg Thr Glu Val Lys Val Ala
260 265 270

Glu Asp Ile Ala Ser Pro Val Thr Ala Asn Ala Ile Gln Gln Phe Val
275 280 285
Lys Gln Glu Tyr Glu Lys Glu Gly Asn Asp Leu Thr Tyr Val Leu Leu
290 295 300
Val Gly Asp His Lys Asp Ile Pro Ala Lys Ile Thr Pro Gly Ile Lys

305 310 315 320

Ser Asp Gln Val Tyr Gly Gln Ile Val Gly Asn Asp His Tyr Asn Glu

325 330 335

Val Phe Ile Gly Arg Phe Ser Cys Glu Ser Lys Glu Asp Leu Lys Thr

340 345 350

Gln Ile Asp Arg Thr Ile His Tyr Glu Arg Asn Ile Thr Thr Glu Asp

355 360 365

Lys Trp Leu Gly Gln Ala Leu Cys Ile Ala Ser Ala Glu Gly Gly Pro

370 375 380

Ser Ala Asp Asn Gly Glu Ser Asp Ile Gln His Glu Asn Ile Ile Ala

385 390 395 400

Asn Leu Leu Thr Gln Tyr Gly Tyr Thr Lys Ile Ile Lys Cys Tyr Asp

405 410 415

Pro Gly Val Thr Pro Lys Asn Ile Ile Asp Ala Phe Asn Gly Gly Ile

420 425 430

Ser Leu Ala Asn Tyr Thr Gly His Gly Ser Glu Thr Ala Trp Gly Thr

435 440 445

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

450 455 460

Leu Pro Phe Ile Phe Asp Val Ala Cys Val Asn Gly Asp Phe Leu Tyr

465 470 475 480

Asn Val Pro Cys Phe Ala Glu Ala Leu Met Arg Ala Gln Lys Asp Gly

485 490 495

Lys Pro Thr Gly Thr Val Ala Ile Ile Ala Ser Thr Ile Asn Gln Ser

500 505 510

Trp Ala Ser Pro Met Arg Gly Gln Asp Glu Met Asn Glu Ile Leu Cys

515 520 525

Glu Lys His Pro Asn Asn Ile Lys Arg Thr Phe Gly Gly Val Thr Met

530 535 540

Asn Gly Met Phe Ala Met Val Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys

545 550 555 560

Met Leu Asp Thr Trp Thr Val Phe Gly Asp Pro Ser Leu Leu Val Arg
565 570 575

Thr Leu Val Pro Thr Lys Met Gln Val Thr Ala Pro Ala Asn Ile Ser
580 585 590

Ala Ser Ala Gln Thr Phe Glu Val Ala Cys Asp Tyr Asn Gly Ala Ile
595 600 605

Ala Thr Leu Ser Asp Asp Gly Asp Met Val Gly Thr Ala Ile Val Lys
610 615 620

Asp Gly Lys Ala Ile Ile Lys Leu Asn Glu Ser Ile Ala Asp Glu Thr
625 630 635 640

Asn Leu Thr Leu Thr Val Val Gly Tyr Asn Lys Val Thr Val Ile Lys
645 650 655

Asp Val Lys Val Glu Gly Thr Ser Ile Ala Asp Val Ala Asn Asp Lys
660 665 670

Pro Tyr Thr Val Ala Val Ser Gly Lys Thr Ile Thr Val Glu Ser Pro
675 680 685

Ala Ala Gly Leu Thr Ile Phe Asp Met Asn Gly Arg Arg Val Ala Thr
690 695 700

Ala Lys Asn Arg Met Val Phe Glu Ala Gln Asn Gly Val Tyr Ala Val
705 710 715 720

Arg Ile Ala Thr Glu Gly Lys Thr Tyr Thr Glu Lys Val Ile Val Lys
725 730 735

<210> 444

<211> 1723

<212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<220>

<223> Lysine-gingipain (Kgp) from Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 (UniProt Accession No. B2RLK2

<400> 444

Met Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Leu Gly Val Gly

1 5 10 15

Leu Tyr Ala Gln Ser Ala Lys Ile Lys Leu Asp Ala Pro Thr Thr Arg

20 25 30

Thr Thr Cys Thr Asn Asn Ser Phe Lys Gln Phe Asp Ala Ser Phe Ser

35 40 45

Phe Asn Glu Val Glu Leu Thr Lys Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Phe

50 55 60

Ala Ser Val Ser Ile Pro Gly Ala Phe Pro Thr Gly Glu Val Gly Ser

65 70 75 80

Pro Glu Val Pro Ala Val Arg Lys Leu Ile Ala Val Pro Val Gly Ala

85 90 95

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

100 105 110

Asn Gln Tyr Gly Ser Glu Lys Leu Met Pro His Gln Pro Ser Met Ser

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Ala Arg Lys Gly Phe Val Gly Gln Glu Leu Thr Gln Val Glu Met

145 150 155 160

Leu Gly Thr Met Arg Gly Val Arg Ile Ala Ala Leu Thr Ile Asn Pro

165 170 175

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

180 185 190

Glu Ile Glu Val Ser Phe Gln Gly Ala Asp Glu Val Ala Thr Gln Arg

195 200 205

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

210 215 220

Leu Phe Asn Arg Asp Val Tyr Thr Asp His Gly Asp Leu Tyr Asn Thr

225 230 235 240

Pro Val Arg Met Leu Val Val Ala Gly Ala Lys Phe Lys Glu Ala Leu

245 250 255

Lys Pro Trp Leu Thr Trp Lys Ala Gln Lys Gly Phe Tyr Leu Asp Val
260 265 270
His Tyr Thr Asp Glu Ala Glu Val Gly Thr Thr Asn Ala Ser Ile Lys

275 280 285
Ala Phe Ile His Lys Lys Tyr Asn Asp Gly Leu Ala Ala Ser Ala Ala
290 295 300
Pro Val Phe Leu Ala Leu Val Gly Asp Thr Asp Val Ile Ser Gly Glu
305 310 315 320
Lys Gly Lys Lys Thr Lys Lys Val Thr Asp Leu Tyr Tyr Ser Ala Val
325 330 335
Asp Gly Asp Tyr Phe Pro Glu Met Tyr Thr Phe Arg Met Ser Ala Ser

340 345 350
Ser Pro Glu Glu Leu Thr Asn Ile Ile Asp Lys Val Leu Met Tyr Glu
355 360 365
Lys Ala Thr Met Pro Asp Lys Ser Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ile
370 375 380
Ala Gly Ala Asp Ser Tyr Trp Asn Pro Lys Ile Gly Gln Gln Thr Ile
385 390 395 400
Lys Tyr Ala Val Gln Tyr Tyr Tyr Asn Gln Asp His Gly Tyr Thr Asp

405 410 415
Val Tyr Ser Tyr Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Gly Cys Tyr Ser His Leu
420 425 430
Asn Thr Gly Val Gly Phe Ala Asn Tyr Thr Ala His Gly Ser Glu Thr
435 440 445
Ser Trp Ala Asp Pro Ser Leu Thr Ala Thr Gln Val Lys Ala Leu Thr
450 455 460
Asn Lys Asp Lys Tyr Phe Leu Ala Ile Gly Asn Cys Cys Val Thr Ala

465 470 475 480
Gln Phe Asp Tyr Pro Gln Pro Cys Phe Gly Glu Val Met Thr Arg Val
485 490 495
Lys Glu Lys Gly Ala Tyr Ala Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Asn Ser Tyr

500 505 510

Trp Gly Glu Asp Tyr Tyr Trp Ser Val Gly Ala Asn Ala Val Phe Gly

515 520 525

Val Gln Pro Thr Phe Glu Gly Thr Ser Met Gly Ser Tyr Asp Ala Thr

530 535 540

Phe Leu Glu Asp Ser Tyr Asn Thr Val Asn Ser Ile Met Trp Ala Gly

545 550 555 560

Asn Leu Ala Ala Thr His Ala Gly Asn Ile Gly Asn Ile Thr His Ile

565 570 575

Gly Ala His Tyr Tyr Trp Glu Ala Tyr His Val Leu Gly Asp Gly Ser

580 585 590

Val Met Pro Tyr Arg Ala Met Pro Lys Thr Asn Thr Tyr Thr Leu Pro

595 600 605

Ala Ser Leu Pro Gln Asn Gln Ala Ser Tyr Ser Ile Gln Ala Ser Ala

610 615 620

Gly Ser Tyr Val Ala Ile Ser Lys Asp Gly Val Leu Tyr Gly Thr Gly

625 630 635 640

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

645 650 655

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Val Val Ile Thr Arg Ser Asn Tyr Leu

660 665 670

Pro Val Ile Lys Gln Ile Gln Ala Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro

675 680 685

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

690 695 700

Trp Asp Ala Pro Ser Ala Lys Lys Ala Glu Ala Ser Arg Glu Val Lys

705 710 715 720

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

725 730 735

Arg Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Gly

740 745 750

Asp Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe

755 760 765

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

770 775 780

Ser Asn Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Tyr Leu Ile Pro Ala Asn Ala

785 790 795 800

Asp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu

805 810 815

Val Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Cys Ile Thr Asn Pro Glu

820 825 830

Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro

835 840 845

Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe

850 855 860

Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu

865 870 875 880

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

885 890 895

Lys Ile Gln Glu Gly Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val

900 905 910

Ala Ala Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly

915 920 925

Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu

930 935 940

Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val

945 950 955 960

Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn

965 970 975

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

980 985 990

Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp

995 1000 1005

Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly Cys

1010 1015 1020

Val Tyr Ser Glu Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Gly Val Leu Thr Pro

1025 1030 1035 1040

Asp Asn Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Leu Asp Leu Pro Asn Gly Gly Lys

1045 1050 1055

Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu His

1060 1065 1070

Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe Thr

1075 1080 1085

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

1090 1095 1100

Glu Ala Ile Arg Gly Arg Ile Gln Gly Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val

1105 1110 1115 1120

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

1125 1130 1135

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

1140 1145 1150

Gly Lys Arg Ala Asp Phe Thr Glu Thr Phe Glu Ser Ser Thr His Gly

1155 1160 1165

Glu Ala Pro Ala Glu Trp Thr Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Gln

1170 1175 1180

Asp Trp Leu Cys Leu Ser Ser Gly Gln Leu Asp Trp Leu Thr Ala His

1185 1190 1195 1200

Gly Gly Thr Asn Val Val Ala Ser Phe Ser Trp Asn Gly Met Ala Leu

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

Val Lys Tyr Tyr Tyr Ala Val Asn Asp Gly Phe Pro Gly Asp His Tyr

1235 1240 1245

Ala Val Met Ile Ser Lys Thr Gly Thr Asn Ala Gly Asp Phe Thr Val
1250 1255 1260
Val Phe Glu Glu Thr Pro Asn Gly Ile Asn Lys Gly Gly Ala Arg Phe
1265 1270 1275 1280
Gly Leu Ser Thr Glu Ala Asn Gly Ala Lys Pro Gln Ser Val Trp Ile
1285 1290 1295
Glu Arg Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe Arg

1300 1305 1310
His Tyr Asn Cys Ser Asp Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Ile Gln
1315 1320 1325
Phe Thr Met Gly Gly Ser Pro Thr Pro Thr Asp Tyr Thr Tyr Thr Val
1330 1335 1340
Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Glu Thr Thr Phe
1345 1350 1355 1360
Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val

1365 1370 1375
Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Val Asn Val Thr Ile
1380 1385 1390
Asn Pro Thr Gln Phe Asn Pro Val Lys Asn Leu Lys Ala Gln Pro Asp
1395 1400 1405
Gly Gly Asp Val Val Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Gly Lys Arg Gly
1410 1415 1420
Glu Leu Leu Asn Glu Asp Phe Glu Gly Asp Ala Ile Pro Thr Gly Trp

1425 1430 1435 1440
Thr Ala Leu Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn Trp Asp Ile Thr Leu
1445 1450 1455
Asn Glu Phe Thr Arg Gly Glu Arg His Val Leu Ser Pro Leu Arg Ala
1460 1465 1470
Ser Asn Val Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Leu Leu Gln Gly Gln Glu Tyr
1475 1480 1485
Leu Pro Leu Thr Pro Asn Asn Phe Leu Ile Thr Pro Lys Val Glu Gly

1490 1495 1500

Ala Lys Lys Ile Thr Tyr Lys Val Gly Ser Pro Gly Leu Pro Gln Trp

1505 1510 1515 1520

Ser His Asp His Tyr Ala Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala

1525 1530 1535

Ala Asp Phe Glu Val Ile Phe Glu Glu Thr Met Thr Tyr Thr Gln Gly

1540 1545 1550

Gly Ala Asn Leu Thr Arg Glu Lys Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr

1555 1560 1565

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

1570 1575 1580

Asp Asp Val Val Ile Thr Gly Glu Gly Glu Gly Pro Ser Tyr Thr Tyr

1585 1590 1595 1600

Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Gln Glu Gly Leu Thr Glu Thr

1605 1610 1615

Thr Tyr Arg Asp Ala Gly Met Ser Ala Gln Ser His Glu Tyr Cys Val

1620 1625 1630

Glu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Val Asp Tyr

1635 1640 1645

Ile Pro Asp Gly Val Ala Asp Val Thr Ala Gln Lys Pro Tyr Thr Leu

1650 1655 1660

Thr Val Val Gly Lys Thr Ile Thr Val Thr Cys Gln Gly Glu Ala Met

1665 1670 1675 1680

Ile Tyr Asp Met Asn Gly Arg Arg Leu Ala Ala Gly Arg Asn Thr Val

1685 1690 1695

Val Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Met Val Val Val Asp

1700 1705 1710

Gly Lys Ser Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ile Lys

1715 1720

<210> 445

<211> 1732

<212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<220>

<223> Lysine-gingipain W83 (UniProt Accession No.:
Q51817)

<400> 445

Met Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Leu Gly Val Gly

1 5 10 15

Leu Tyr Ala Gln Ser Ala Lys Ile Lys Leu Asp Ala Pro Thr Thr Arg

20 25 30

Thr Thr Cys Thr Asn Asn Ser Phe Lys Gln Phe Asp Ala Ser Phe Ser

35 40 45

Phe Asn Glu Val Glu Leu Thr Lys Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Phe

50 55 60

Ala Ser Val Ser Ile Pro Gly Ala Phe Pro Thr Gly Glu Val Gly Ser

65 70 75 80

Pro Glu Val Pro Ala Val Arg Lys Leu Ile Ala Val Pro Val Gly Ala

85 90 95

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

100 105 110

Asn Gln Tyr Gly Ser Glu Lys Leu Met Pro His Gln Pro Ser Met Ser

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Ala Arg Lys Gly Phe Val Gly Gln Glu Leu Thr Gln Val Glu Met

145 150 155 160

Leu Gly Thr Met Arg Gly Val Arg Ile Ala Ala Leu Thr Ile Asn Pro

165 170 175

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

180 185 190

Glu Ile Glu Val Ser Phe Gln Gly Ala Asp Glu Val Ala Thr Gln Arg

195 200 205

Leu Tyr Asp Ala Ser Phe Ser Pro Tyr Phe Glu Thr Ala Tyr Lys Gln
210 215 220
Leu Phe Asn Arg Asp Val Tyr Thr Asp His Gly Asp Leu Tyr Asn Thr
225 230 235 240
Pro Val Arg Met Leu Val Val Ala Gly Ala Lys Phe Lys Glu Ala Leu
245 250 255
Lys Pro Trp Leu Thr Trp Lys Ala Gln Lys Gly Phe Tyr Leu Asp Val

260 265 270
His Tyr Thr Asp Glu Ala Glu Val Gly Thr Thr Asn Ala Ser Ile Lys
275 280 285
Ala Phe Ile His Lys Lys Tyr Asn Asp Gly Leu Ala Ala Ser Ala Ala
290 295 300
Pro Val Phe Leu Ala Leu Val Gly Asp Thr Asp Val Ile Ser Gly Glu
305 310 315 320
Lys Gly Lys Lys Thr Lys Lys Val Thr Asp Leu Tyr Tyr Ser Ala Val

325 330 335
Asp Gly Asp Tyr Phe Pro Glu Met Tyr Thr Phe Arg Met Ser Ala Ser
340 345 350
Ser Pro Glu Glu Leu Thr Asn Ile Ile Asp Lys Val Leu Met Tyr Glu
355 360 365
Lys Ala Thr Met Pro Asp Lys Ser Tyr Leu Glu Lys Val Leu Leu Ile
370 375 380
Ala Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Asn Ser Gln Val Gly Gln Pro Thr Ile

385 390 395 400
Lys Tyr Gly Met Gln Tyr Tyr Tyr Asn Gln Glu His Gly Tyr Thr Asp
405 410 415
Val Tyr Asn Tyr Leu Lys Ala Pro Tyr Thr Gly Cys Tyr Ser His Leu
420 425 430
Asn Thr Gly Val Ser Phe Ala Asn Tyr Thr Ala His Gly Ser Glu Thr
435 440 445
Ala Trp Ala Asp Pro Leu Leu Thr Thr Ser Gln Leu Lys Ala Leu Thr

450 455 460

Asn Lys Asp Lys Tyr Phe Leu Ala Ile Gly Asn Cys Cys Ile Thr Ala

465 470 475 480

Gln Phe Asp Tyr Val Gln Pro Cys Phe Gly Glu Val Ile Thr Arg Val

485 490 495

Lys Glu Lys Gly Ala Tyr Ala Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Asn Ser Tyr

500 505 510

Trp Gly Glu Asp Tyr Tyr Trp Ser Val Gly Ala Asn Ala Val Phe Gly

515 520 525

Val Gln Pro Thr Phe Glu Gly Thr Ser Met Gly Ser Tyr Asp Ala Thr

530 535 540

Phe Leu Glu Asp Ser Tyr Asn Thr Val Asn Ser Ile Met Trp Ala Gly

545 550 555 560

Asn Leu Ala Ala Thr His Ala Gly Asn Ile Gly Asn Ile Thr His Ile

565 570 575

Gly Ala His Tyr Tyr Trp Glu Ala Tyr His Val Leu Gly Asp Gly Ser

580 585 590

Val Met Pro Tyr Arg Ala Met Pro Lys Thr Asn Thr Tyr Thr Leu Pro

595 600 605

Ala Ser Leu Pro Gln Asn Gln Ala Ser Tyr Ser Ile Gln Ala Ser Ala

610 615 620

Gly Ser Tyr Val Ala Ile Ser Lys Asp Gly Val Leu Tyr Gly Thr Gly

625 630 635 640

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

645 650 655

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Val Val Ile Thr Arg Ser Asn Tyr Leu

660 665 670

Pro Val Ile Lys Gln Ile Gln Val Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Arg Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Gly

740 745 750

Asp Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe

755 760 765

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

770 775 780

Ser Asn Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Tyr Leu Val Pro Ala Asn Ala

785 790 795 800

Asp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu

805 810 815

Val Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Cys Ile Thr Asn Pro Glu

820 825 830

Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro

835 840 845

Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe

850 855 860

Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu

865 870 875 880

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

885 890 895

Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val

900 905 910

Ala Ala Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly

915 920 925

Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu

930 935 940

Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ser Val Gly Gln Lys Val

945 950 955 960

Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn

965 970 975

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

980 985 990

Ile Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly

995 1000 1005

Trp Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly

1010 1015 1020

Cys Val Tyr Ser Glu Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Gly Val Leu Thr

1025 1030 1035 1040

Pro Asp Asn Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Leu Asp Leu Pro Asn Gly Gly

1045 1050 1055

Lys Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu

1060 1065 1070

His Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe

1075 1080 1085

Thr Asn Ala Leu Leu Glu Glu Thr Ile Thr Ala Lys Gly Val Arg Ser

1090 1095 1100

Pro Lys Ala Ile Arg Gly Arg Ile Gln Gly Thr Trp Arg Gln Lys Thr

1105 1110 1115 1120

Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe Arg His Phe Gln

1125 1130 1135

Ser Thr Asp Met Phe Tyr Ile Asp Leu Asp Glu Val Glu Ile Lys Ala

1140 1145 1150

Asn Gly Lys Arg Ala Asp Phe Thr Glu Thr Phe Glu Ser Ser Thr His

1155 1160 1165

Gly Glu Ala Pro Ala Glu Trp Thr Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly

1170 1175 1180

Gln Gly Trp Leu Cys Leu Ser Ser Gly Gln Leu Asp Trp Leu Thr Ala

1185 1190 1195 1200

His Gly Gly Ser Asn Val Val Ser Ser Phe Ser Trp Asn Gly Met Ala
1205 1210 1215
Leu Asn Pro Asp Asn Tyr Leu Ile Ser Lys Asp Val Thr Gly Ala Thr

1220 1225 1230
Lys Val Lys Tyr Tyr Tyr Ala Val Asn Asp Gly Phe Pro Gly Asp His
1235 1240 1245
Tyr Ala Val Met Ile Ser Lys Thr Gly Thr Asn Ala Gly Asp Phe Thr
1250 1255 1260
Val Val Phe Glu Glu Thr Pro Asn Gly Ile Asn Lys Gly Gly Ala Arg
1265 1270 1275 1280
Phe Gly Leu Ser Thr Glu Ala Asn Gly Ala Lys Pro Gln Ser Val Trp

1285 1290 1295
Ile Glu Arg Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe
1300 1305 1310
Arg His Tyr Asn Cys Ser Asp Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Ile
1315 1320 1325
Gln Phe Thr Met Gly Gly Ser Pro Thr Pro Thr Asp Tyr Thr Tyr Thr
1330 1335 1340
Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Glu Thr Thr

1345 1350 1355 1360
Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu
1365 1370 1375
Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro Lys Lys Cys Val Asp Val Thr
1380 1385 1390
Val Asn Ser Thr Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln
1395 1400 1405
Ala Pro Asn Ser Met Asp Ala Ile Leu Lys Trp Asn Ala Pro Ala Ser

1410 1415 1420
Lys Arg Ala Glu Val Leu Asn Glu Asp Phe Glu Asn Gly Ile Pro Ala
1425 1430 1435 1440
Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn Trp Thr Thr

1445 1450 1455

Thr Pro Pro Pro Gly Gly Ser Ser Phe Ala Gly His Asn Ser Ala Ile

1460 1465 1470

Cys Val Ser Ser Ala Ser His Ile Asn Phe Glu Gly Pro Gln Asn Pro

1475 1480 1485

Asp Asn Tyr Leu Val Thr Pro Glu Leu Ser Leu Pro Gly Gly Gly Thr

1490 1495 1500

Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu His

1505 1510 1515 1520

Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe Ala

1525 1530 1535

Asn Ala Leu Leu Glu Glu Val Leu Thr Ala Lys Thr Val Val Thr Ala

1540 1545 1550

Pro Glu Ala Ile Arg Gly Thr Arg Ala Gln Gly Thr Trp Tyr Gln Lys

1555 1560 1565

Thr Val Gln Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe Arg His Phe

1570 1575 1580

Gly Cys Thr Asp Phe Phe Trp Ile Asn Leu Asp Asp Val Val Ile Thr

1585 1590 1595 1600

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Tyr Arg Asn Asn Thr

1605 1610 1615

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

1620 1625 1630

Ala Thr Gly Phe Tyr Thr Tyr Gly Val Lys Val Val Tyr Pro Asn Gly

1635 1640 1645

Glu Ser Ala Ile Glu Thr Ala Thr Leu Asn Ile Thr Ser Leu Ala Asp

1650 1655 1660

Val Thr Ala Gln Lys Pro Tyr Thr Leu Thr Val Val Gly Lys Thr Ile

1665 1670 1675 1680

Thr Val Thr Cys Gln Gly Glu Ala Met Ile Tyr Asp Met Asn Gly Arg

1685 1690 1695

Arg Leu Ala Ala Gly Arg Asn Thr Val Val Tyr Thr Ala Gln Gly Gly
1700 1705 1710

His Tyr Ala Val Met Val Val Val Asp Gly Lys Ser Tyr Val Glu Lys
1715 1720 1725

Leu Ala Val Lys
1730

<210> 446

<211> 1723

<212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<220>

<223> Lysine-gingipain 381 (UniProt Accession No.: P72194)

<400> 446

Met Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Leu Gly Val Gly
1 5 10 15

Leu Tyr Ala Gln Ser Ala Lys Ile Lys Leu Asp Ala Pro Thr Thr Arg
20 25 30

Thr Thr Cys Thr Asn Asn Ser Phe Lys Gln Phe Asp Ala Ser Phe Ser
35 40 45

Phe Asn Glu Val Glu Leu Thr Lys Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Phe
50 55 60

Ala Ser Val Ser Ile Pro Gly Ala Phe Pro Thr Gly Glu Val Gly Ser
65 70 75 80

Pro Glu Val Pro Ala Val Arg Lys Leu Ile Ala Val Pro Val Gly Ala
85 90 95

Thr Pro Val Val Arg Val Lys Ser Phe Thr Glu Gln Val Tyr Ser Leu
100 105 110

Asn Gln Tyr Gly Ser Glu Lys Leu Met Pro His Gln Pro Ser Met Ser
115 120 125

Lys Ser Asp Asp Pro Glu Lys Val Pro Phe Val Tyr Asn Ala Ala Ala
130 135 140

Tyr Ala Arg Lys Gly Phe Val Gly Gln Glu Leu Thr Gln Val Glu Met
145 150 155 160
Leu Gly Thr Met Arg Gly Val Arg Ile Ala Ala Leu Thr Ile Asn Pro
165 170 175

Val Gln Tyr Asp Val Val Ala Asn Gln Leu Lys Val Arg Asn Asn Ile
180 185 190
Glu Ile Glu Val Ser Phe Gln Gly Ala Asp Glu Val Ala Thr Gln Arg
195 200 205
Leu Tyr Asp Ala Ser Phe Ser Pro Tyr Phe Glu Thr Ala Tyr Lys Gln
210 215 220
Leu Phe Asn Arg Asp Val Tyr Thr Asp His Gly Asp Leu Tyr Asn Thr
225 230 235 240

Pro Val Arg Met Leu Val Val Ala Gly Ala Lys Phe Lys Glu Ala Leu
245 250 255
Lys Pro Trp Leu Thr Trp Lys Ala Gln Lys Gly Phe Tyr Leu Asp Val
260 265 270
His Tyr Thr Asp Glu Ala Glu Val Gly Thr Thr Asn Ala Ser Ile Lys
275 280 285
Ala Phe Ile His Lys Lys Tyr Asn Asp Gly Leu Ala Ala Ser Ala Ala
290 295 300

Pro Val Phe Leu Ala Leu Val Gly Asp Thr Asp Val Ile Ser Gly Glu
305 310 315 320
Lys Gly Lys Lys Thr Lys Lys Val Thr Asp Leu Tyr Tyr Ser Ala Val
325 330 335
Asp Gly Asp Tyr Phe Pro Glu Met Tyr Thr Phe Arg Met Ser Ala Ser
340 345 350
Ser Pro Glu Glu Leu Thr Asn Ile Ile Asp Lys Val Leu Met Tyr Glu
355 360 365

Lys Ala Thr Met Pro Asp Lys Ser Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ile
370 375 380
Ala Gly Ala Asp Ser Tyr Trp Asn Pro Lys Ile Gly Gln Gln Thr Ile

385 390 395 400

Lys Tyr Ala Val Gln Tyr Tyr Tyr Asn Gln Asp His Gly Tyr Thr Asp

405 410 415

Val Tyr Ser Tyr Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Gly Cys Tyr Ser His Leu

420 425 430

Asn Thr Gly Val Gly Phe Ala Asn Tyr Thr Ala His Gly Ser Glu Thr

435 440 445

Ser Trp Ala Asp Pro Ser Leu Thr Ala Thr Gln Val Lys Ala Leu Thr

450 455 460

Asn Lys Asp Lys Tyr Phe Leu Ala Ile Gly Asn Cys Cys Val Thr Ala

465 470 475 480

Gln Phe Asp Tyr Pro Gln Pro Cys Phe Gly Glu Val Met Thr Arg Val

485 490 495

Lys Glu Lys Gly Ala Tyr Ala Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Asn Ser Tyr

500 505 510

Trp Gly Glu Asp Tyr Tyr Trp Ser Val Gly Ala Asn Ala Val Phe Gly

515 520 525

Val Gln Pro Thr Phe Glu Gly Thr Ser Met Gly Ser Tyr Asp Ala Thr

530 535 540

Phe Leu Glu Asp Ser Tyr Asn Thr Val Asn Ser Ile Met Trp Ala Gly

545 550 555 560

Asn Leu Ala Ala Thr His Ala Gly Asn Ile Gly Asn Ile Thr His Ile

565 570 575

Gly Ala His Tyr Tyr Trp Glu Ala Tyr His Val Leu Gly Asp Gly Ser

580 585 590

Val Met Pro Tyr Arg Ala Met Pro Lys Thr Asn Thr Tyr Thr Leu Pro

595 600 605

Ala Ser Leu Pro Gln Asn Gln Ala Ser Tyr Ser Ile Gln Ala Ser Ala

610 615 620

Gly Ser Tyr Val Ala Ile Ser Lys Asp Gly Val Leu Tyr Gly Thr Gly

625 630 635 640

Val Ala Asn Ala Ser Gly Val Ala Thr Val Asn Met Thr Lys Gln Ile
645 650 655
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Val Val Ile Thr Arg Ser Asn Tyr Leu
660 665 670
Pro Val Ile Lys Gln Ile Gln Ala Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro
675 680 685

Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr Gln Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys
690 695 700
Trp Asp Ala Pro Ser Ala Lys Lys Ala Glu Ala Ser Arg Glu Val Lys
705 710 715 720
Arg Ile Gly Asp Gly Leu Phe Val Thr Ile Glu Pro Ala Asn Asp Val
725 730 735
Arg Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Gly
740 745 750

Asp Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe
755 760 765
Gly Ser Val Ile Pro Ala Thr Gly Pro Leu Phe Thr Gly Thr Ala Ser
770 775 780
Ser Asn Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Tyr Leu Ile Pro Ala Asn Ala
785 790 795 800
Asp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu
805 810 815

Val Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Cys Ile Thr Asn Pro Glu
820 825 830
Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro
835 840 845
Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe
850 855 860
Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu
865 870 875 880

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

885 890 895

Lys Ile Gln Glu Gly Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val

900 905 910

Ala Ala Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly

915 920 925

Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu

930 935 940

Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val

945 950 955 960

Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn

965 970 975

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

980 985 990

Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp

995 1000 1005

Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly Cys

1010 1015 1020

Val Tyr Ser Glu Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Gly Val Leu Thr Pro

1025 1030 1035 1040

Asp Asn Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Leu Asp Leu Pro Asn Gly Gly Lys

1045 1050 1055

Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu His

1060 1065 1070

Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe Thr

1075 1080 1085

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

1090 1095 1100

Glu Ala Ile Arg Gly Arg Ile Gln Gly Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val

1105 1110 1115 1120

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

1125 1130 1135

Thr Asp Met Phe Tyr Ile Asp Leu Asp Glu Val Glu Ile Lys Ala Asn
1140 1145 1150
Gly Lys Arg Ala Asp Phe Thr Glu Thr Phe Glu Ser Ser Thr His Gly
1155 1160 1165
Glu Ala Pro Ala Glu Trp Thr Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Gln
1170 1175 1180
Asp Trp Leu Cys Leu Ser Ser Gly Gln Leu Asp Trp Leu Thr Ala His
1185 1190 1195 1200

Gly Gly Thr Asn Val Val Ala Ser Phe Ser Trp Asn Gly Met Ala Leu
1205 1210 1215
Asn Pro Asp Asn Tyr Leu Ile Ser Lys Asp Val Thr Gly Ala Thr Lys
1220 1225 1230
Val Lys Tyr Tyr Tyr Ala Val Asn Asp Gly Phe Pro Gly Asp His Tyr
1235 1240 1245
Ala Val Met Ile Ser Lys Thr Gly Thr Asn Ala Gly Asp Phe Thr Val
1250 1255 1260

Val Phe Glu Glu Thr Pro Asn Gly Ile Asn Lys Gly Gly Ala Arg Phe
1265 1270 1275 1280
Gly Leu Ser Thr Glu Ala Asn Gly Ala Lys Pro Gln Ser Val Trp Ile
1285 1290 1295
Glu Arg Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe Arg
1300 1305 1310
His Tyr Asn Cys Ser Asp Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Ile Gln
1315 1320 1325

Phe Thr Met Gly Gly Ser Pro Thr Pro Thr Asp Tyr Thr Tyr Thr Val
1330 1335 1340
Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Glu Thr Thr Phe
1345 1350 1355 1360
Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val
1365 1370 1375
Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Val Asn Val Thr Ile

1380 1385 1390

Asn Pro Thr Gln Phe Asn Pro Val Lys Asn Leu Lys Ala Gln Pro Asp
1395 1400 1405
Gly Gly Asp Val Val Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Gly Lys Arg Gly
1410 1415 1420
Glu Leu Leu Asn Glu Asp Phe Glu Gly Asp Ala Ile Pro Thr Gly Trp
1425 1430 1435 1440
Thr Ala Leu Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn Trp Asp Ile Thr Leu
1445 1450 1455

Asn Glu Phe Thr Arg Gly Glu Arg His Val Leu Ser Pro Leu Arg Ala
1460 1465 1470
Ser Asn Val Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Leu Leu Gln Gly Gln Glu Tyr
1475 1480 1485
Leu Pro Leu Thr Pro Asn Asn Phe Leu Ile Thr Pro Lys Val Glu Gly
1490 1495 1500
Ala Lys Lys Ile Thr Tyr Lys Val Gly Ser Pro Gly Leu Pro Gln Trp
1505 1510 1515 1520

Ser His Asp His Tyr Ala Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala
1525 1530 1535
Ala Asp Phe Glu Val Ile Phe Glu Glu Thr Met Thr Tyr Thr Gln Gly
1540 1545 1550
Gly Ala Asn Leu Thr Arg Glu Lys Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr
1555 1560 1565
Val Ala Phe Arg His Tyr Asn Cys Thr Asp Val Leu Gly Ile Met Ile
1570 1575 1580

Asp Asp Val Val Ile Thr Gly Glu Gly Glu Gly Pro Ser Tyr Thr Tyr
1585 1590 1595 1600
Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Gln Glu Gly Leu Thr Glu Thr
1605 1610 1615
Thr Tyr Arg Asp Ala Gly Met Ser Ala Gln Ser His Glu Tyr Cys Val
1620 1625 1630

Glu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Val Asp Tyr
1635 1640 1645

Ile Pro Asp Gly Val Ala Asp Val Thr Ala Gln Lys Pro Tyr Thr Leu
1650 1655 1660
Thr Val Val Gly Lys Thr Ile Thr Val Thr Cys Gln Gly Glu Ala Met
1665 1670 1675 1680
Ile Tyr Asp Met Asn Gly Arg Arg Leu Ala Ala Gly Arg Asn Thr Val
1685 1690 1695
Val Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Met Val Val Val Asp
1700 1705 1710

Gly Lys Ser Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ile Lys
1715 1720

<210> 447
<211> 1723
<212> PRT
<213> Porphyromonas gingivalis
<220>
<223> Lysine-gingipain HG66 (UniProt Accession No.:
P72197)
<400> 447
Met Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Leu Gly Val Gly
1 5 10 15
Leu Tyr Ala Gln Asn Ala Lys Ile Lys Leu Asp Ala Pro Thr Thr Arg
20 25 30

Thr Thr Cys Thr Asn Asn Ser Phe Lys Gln Phe Asp Ala Ser Phe Ser
35 40 45
Phe Asn Glu Val Glu Leu Thr Lys Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Phe
50 55 60
Ala Ser Val Ser Ile Pro Gly Ala Phe Pro Thr Gly Glu Val Gly Ser
65 70 75 80
Pro Glu Val Pro Ala Val Arg Lys Leu Ile Ala Val Pro Val Gly Ala

85 90 95

Thr Pro Val Val Arg Val Lys Ser Phe Thr Glu Gln Val Tyr Ser Leu
100 105 110
Asn Gln Tyr Gly Ser Glu Lys Leu Met Pro His Gln Pro Ser Met Ser
115 120 125
Lys Ser Asp Asp Pro Glu Lys Val Pro Phe Ala Tyr Asn Ala Ala Ala
130 135 140
Tyr Ala Arg Lys Gly Phe Val Gly Gln Glu Leu Thr Gln Val Glu Met
145 150 155 160

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

Leu Phe Asn Arg Asp Val Tyr Thr Asp His Gly Asp Leu Tyr Asn Thr
225 230 235 240
Pro Val Arg Met Leu Val Val Ala Gly Ala Lys Phe Lys Glu Ala Leu
245 250 255
Lys Pro Trp Leu Thr Trp Lys Ala Gln Lys Gly Phe Tyr Leu Asp Val
260 265 270
His Tyr Thr Asp Glu Ala Glu Val Gly Thr Thr Asn Ala Ser Ile Lys
275 280 285

Ala Phe Ile His Lys Lys Tyr Asn Asp Gly Leu Ala Ala Ser Ala Ala
290 295 300
Pro Val Phe Leu Ala Leu Val Gly Asp Thr Asp Val Ile Ser Gly Glu
305 310 315 320
Lys Gly Lys Lys Thr Lys Lys Val Thr Asp Leu Tyr Tyr Ser Ala Val
325 330 335

Asp Gly Asp Tyr Phe Pro Glu Met Tyr Thr Phe Arg Met Ser Ala Ser
340 345 350

Ser Pro Glu Glu Leu Thr Asn Ile Ile Asp Lys Val Leu Met Tyr Glu
355 360 365
Lys Ala Thr Met Pro Asp Lys Ser Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ile
370 375 380
Ala Gly Ala Asp Ser Tyr Trp Asn Pro Lys Ile Gly Gln Gln Thr Ile
385 390 395 400
Lys Tyr Ala Val Gln Tyr Tyr Tyr Asn Gln Asp His Gly Tyr Thr Asp
405 410 415

Val Tyr Ser Tyr Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Gly Cys Tyr Ser His Leu
420 425 430
Asn Thr Gly Val Gly Phe Ala Asn Tyr Thr Ala His Gly Ser Glu Thr
435 440 445
Ser Trp Ala Asp Pro Ser Val Thr Ala Thr Gln Val Lys Ala Leu Thr
450 455 460
Asn Lys Asn Lys Tyr Phe Leu Ala Ile Gly Asn Cys Cys Val Thr Ala
465 470 475 480

Gln Phe Asp Tyr Pro Gln Pro Cys Phe Gly Glu Val Met Thr Arg Val
485 490 495
Lys Glu Lys Gly Ala Tyr Ala Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Asn Ser Tyr
500 505 510
Trp Gly Glu Asp Tyr Tyr Trp Ser Val Gly Ala Asn Ala Val Phe Gly
515 520 525
Val Gln Pro Thr Phe Glu Gly Thr Ser Met Gly Ser Tyr Asp Ala Thr
530 535 540

Phe Leu Glu Asp Ser Tyr Asn Thr Val Asn Ser Ile Met Trp Ala Gly
545 550 555 560
Asn Leu Ala Ala Thr His Ala Glu Asn Ile Gly Asn Val Thr His Ile
565 570 575
Gly Ala His Tyr Tyr Trp Glu Ala Tyr His Val Leu Gly Asp Gly Ser

580 585 590

Val Met Pro Tyr Arg Ala Met Pro Lys Thr Asn Thr Tyr Thr Leu Pro

595 600 605

Ala Ser Leu Pro Gln Asn Gln Ala Ser Tyr Ser Ile Gln Ala Ser Ala

610 615 620

Gly Ser Tyr Val Ala Ile Ser Lys Asp Gly Val Leu Tyr Gly Thr Gly

625 630 635 640

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

645 650 655

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Val Val Ile Thr Arg Ser Asn Tyr Leu

660 665 670

Pro Val Ile Lys Gln Ile Gln Ala Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro

675 680 685

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

690 695 700

Trp Asp Ala Pro Ser Ala Lys Lys Ala Glu Gly Ser Arg Glu Val Lys

705 710 715 720

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

725 730 735

Arg Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Gly

740 745 750

Asp Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe

755 760 765

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

770 775 780

Ser Asn Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Tyr Leu Ile Pro Ala Asn Ala

785 790 795 800

Asp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu

805 810 815

Val Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Cys Ile Thr Asn Pro Glu

820 825 830

Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro
835 840 845
Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe
850 855 860

Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu
865 870 875 880
Asp Asp Ser Pro Ala Ser Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr
885 890 895
Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val
900 905 910
Ala Ala Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly
915 920 925

Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu
930 935 940
Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val
945 950 955 960
Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn
965 970 975
Pro Asn Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe Glu Asn Gly Ile
980 985 990

Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp
995 1000 1005
Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly Cys
1010 1015 1020
Val Tyr Ser Glu Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Gly Val Leu Thr Pro
1025 1030 1035 1040
Asp Asn Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Leu Asp Leu Pro Asn Gly Gly Lys
1045 1050 1055

Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu His
1060 1065 1070
Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe Thr

1075 1080 1085

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

1090 1095 1100

Glu Ala Ile Arg Gly Arg Ile Gln Gly Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val

1105 1110 1115 1120

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

1125 1130 1135

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

1140 1145 1150

Gly Lys Arg Ala Asp Phe Thr Glu Thr Phe Glu Ser Ser Thr His Gly

1155 1160 1165

Glu Ala Pro Ala Glu Trp Thr Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Gln

1170 1175 1180

Gly Trp Leu Cys Leu Ser Ser Gly Gln Leu Asp Trp Leu Thr Ala His

1185 1190 1195 1200

Gly Gly Thr Asn Val Val Ala Ser Phe Ser Trp Asn Gly Met Ala Leu

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

Val Lys Tyr Tyr Tyr Ala Val Asn Asp Gly Phe Pro Gly Asp His Tyr

1235 1240 1245

Ala Val Met Ile Ser Lys Thr Gly Thr Asn Ala Gly Asp Phe Thr Val

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275 1280

Gly Leu Ser Thr Glu Ala Asp Gly Ala Lys Pro Gln Ser Val Trp Ile

1285 1290 1295

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

1300 1305 1310

His Tyr Asn Cys Ser Asp Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Ile Gln

1315 1320 1325

Phe Thr Met Gly Gly Ser Pro Thr Pro Thr Asp Tyr Thr Tyr Thr Val
1330 1335 1340

Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Glu Thr Thr Phe
1345 1350 1355 1360

Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val
1365 1370 1375

Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro Lys Lys Cys Val Asn Val Thr Ile
1380 1385 1390

Asn Pro Thr Gln Phe Asn Pro Val Lys Asn Leu Lys Ala Gln Pro Asp
1395 1400 1405

Gly Gly Asp Val Val Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Ala Lys Lys Ala
1410 1415 1420

Glu Gly Ser Arg Glu Val Lys Arg Ile Gly Asp Gly Leu Phe Val Thr
1425 1430 1435 1440

Ile Glu Pro Ala Asn Asp Val Arg Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu
1445 1450 1455

Ala Ala Asp Asn Val Trp Gly Asp Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu
1460 1465 1470

Asp Ala Asp His Asn Thr Phe Gly Ser Val Ile Pro Ala Thr Gly Pro
1475 1480 1485

Leu Phe Thr Gly Thr Ala Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu
1490 1495 1500

Tyr Leu Ile Pro Ala Asn Ala Asp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile
1505 1510 1515 1520

Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu Val Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp
1525 1530 1535

Tyr Cys Ile Thr Asn Pro Glu Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala
1540 1545 1550

Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu
1555 1560 1565

Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp

1570 1575 1580

Gly Thr Asp Met Glu Val Glu Asp Asp Ser Pro Ala Ser Tyr Thr Tyr

1585 1590 1595 1600

Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly Leu Thr Glu Thr

1605 1610 1615

Thr Tyr Arg Asp Ala Gly Met Ser Ala Gln Ser His Glu Tyr Cys Val

1620 1625 1630

Glu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Val Asp Tyr

1635 1640 1645

Ile Pro Asp Gly Val Ala Asp Val Thr Ala Gln Lys Pro Tyr Thr Leu

1650 1655 1660

Thr Val Val Gly Lys Thr Ile Thr Val Thr Cys Gln Gly Glu Ala Met

1665 1670 1675 1680

Ile Tyr Asp Met Asn Gly Arg Arg Leu Ala Ala Gly Arg Asn Thr Val

1685 1690 1695

Val Tyr Thr Ala Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Met Val Val Val Asp

1700 1705 1710

Gly Lys Ser Tyr Val Glu Lys Leu Ala Val Lys

1715 1720

<210> 448

<211> 828

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF3a

<400> 448

atggatttgt ttatgagaat cttcacaatt ggaactgtaa ctttgaagca aggtgaaatc 60

aaggatgcta ctccttcaga ttttgttcgc gctactgcaa cgataccgat acaagcctca 120

ctcccctttcg gatggcttat tgttggcgtt gcacttcttg ctgtttttca gagcgcttcc 180

aaaatcataa ccctcaaaaa gagatggcaa ctagcactct ccaagggtgt tcactttgtt 240

tgcaacttgc tgttgttgtt tgtaacagtt tactcacacc ttttgctcgt tgctgctggc 300

cttgaagccc cttttctcta tctttatgct ttagtctact tcttgcagag tataaacttt 360

gtaagaataa taatgaggct ttggctttgc tggaaatgcc gttccaaaaa cccattactt 420

tatgatgcca actattttct ttgctggcat actaattgtt acgactattg tataccttac 480

aatagtgtaa cttcttcaat tgtcattact tcaggtgatg gcacaacaag tcctatttct 540

gaacatgact accagattgg tggttatact gaaaaatggg aatctggagt aaaagactgt 600

gttgtattac acagttactt cacttcagac tattaccagc tgtactcaac tcaattgagt 660

acagacactg gtgttgaaca tgttaccttc ttcatctaca ataaaattgt tgatgagcct 720

gaagaacatg tccaaattca cacaatcgac ggttcatccg gagttgttaa tccagtaatg 780

gaaccaattt atgatgaacc gacgacgact actagcgtgc ctttgtaa 828

<210> 449

<211> 275

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF3a

<400> 449

Met Asp Leu Phe Met Arg Ile Phe Thr Ile Gly Thr Val Thr Leu Lys
1 5 10 15

Gln Gly Glu Ile Lys Asp Ala Thr Pro Ser Asp Phe Val Arg Ala Thr
20 25 30

Ala Thr Ile Pro Ile Gln Ala Ser Leu Pro Phe Gly Trp Leu Ile Val
35 40 45

Gly Val Ala Leu Leu Ala Val Phe Gln Ser Ala Ser Lys Ile Ile Thr
50 55 60

Leu Lys Lys Arg Trp Gln Leu Ala Leu Ser Lys Gly Val His Phe Val
65 70 75 80

Cys Asn Leu Leu Leu Leu Phe Val Thr Val Tyr Ser His Leu Leu Leu
85 90 95

Val Ala Ala Gly Leu Glu Ala Pro Phe Leu Tyr Leu Tyr Ala Leu Val
100 105 110

Tyr Phe Leu Gln Ser Ile Asn Phe Val Arg Ile Ile Met Arg Leu Trp
115 120 125

Leu Cys Trp Lys Cys Arg Ser Lys Asn Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Asn

130 135 140

Tyr Phe Leu Cys Trp His Thr Asn Cys Tyr Asp Tyr Cys Ile Pro Tyr

145 150 155 160

Asn Ser Val Thr Ser Ser Ile Val Ile Thr Ser Gly Asp Gly Thr Thr

165 170 175

Ser Pro Ile Ser Glu His Asp Tyr Gln Ile Gly Gly Tyr Thr Glu Lys

180 185 190

Trp Glu Ser Gly Val Lys Asp Cys Val Val Leu His Ser Tyr Phe Thr

195 200 205

Ser Asp Tyr Tyr Gln Leu Tyr Ser Thr Gln Leu Ser Thr Asp Thr Gly

210 215 220

Val Glu His Val Thr Phe Phe Ile Tyr Asn Lys Ile Val Asp Glu Pro

225 230 235 240

Glu Glu His Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser Ser Gly Val Val

245 250 255

Asn Pro Val Met Glu Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr Thr Thr Thr Ser

260 265 270

Val Pro Leu

275

<210> 450

<211> 228

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> Envelope (E)

<400> 450

atgtactcat tcgtttcgga agagacaggt acgttaatag ttaatagcgt acttcttttt 60

cttgctttcg tggtattctt gctagttaca ctagccatcc ttactgcgct tcgattgtgt 120

gcgtactgct gcaatattgt taacgtgagt cttgtaaaac cttcttttta cgtttactct 180

cgtgttaaaa atctgaattc ttctagagtt cctgatcttc tggtctaa 228

<210> 451

<211> 75

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> Envelope (E)

<400> 451

Met Tyr Ser Phe Val Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser
1 5 10 15

Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala
20 25 30

Ile Leu Thr Ala Leu Arg Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn
35 40 45

Val Ser Leu Val Lys Pro Ser Phe Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn
50 55 60

Leu Asn Ser Ser Arg Val Pro Asp Leu Leu Val
65 70 75

<210> 452

<211> 669

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> Membrane (M)

<400> 452

atggcagatt ccaacggtac tattaccgtt gaagagctta aaaagctcct tgaacaatgg 60

aacctagtaa taggtttcct attccttaca tggatttgtc ttctacaatt tgcctatgcc 120

aacaggaata ggtttttgta tataattaag ttaattttcc tctggctgtt atggccagta 180

actttagctt gttttgtgct tgctgctgtt tacagaataa attggatcac cggtggaatt 240

gctatcgcaa tggcttgtct tgtaggcttg atgtggctca gctacttcat tgcttctttc 300

agactgtttg cgcgtacgcg ttccatgtgg tcattcaatc cagaaactaa cattcttctc 360

aacgtgccac tccatggcac tattctgacc agaccgcttc tagaaagtga actcgtaatc 420

ggagctgtga tccttcgtgg acatcttcgt attgctggac accatctagg acgctgtgac 480

atcaaggacc tgcctaaaga aatcactgtt gctacatcac gaacgctttc ttattacaaa 540

ttgggagctt cgcagcgtgt agcaggtgac tcaggttttg ctgcatacag tcgctacagg 600

attggcaact ataaattaaa cacagaccat tccagtagca gtgacaatat tgctttgctt 660

gtacagtaa 669

<210> 453

<211> 222

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> Membrane (M)

<400> 453

Met Ala Asp Ser Asn Gly Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Lys Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gln Trp Asn Leu Val Ile Gly Phe Leu Phe Leu Thr Trp Ile
20 25 30

Cys Leu Leu Gln Phe Ala Tyr Ala Asn Arg Asn Arg Phe Leu Tyr Ile
35 40 45

Ile Lys Leu Ile Phe Leu Trp Leu Leu Trp Pro Val Thr Leu Ala Cys
50 55 60

Phe Val Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ile Asn Trp Ile Thr Gly Gly Ile
65 70 75 80

Ala Ile Ala Met Ala Cys Leu Val Gly Leu Met Trp Leu Ser Tyr Phe
85 90 95

Ile Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Glu Thr Asn Ile Leu Leu Asn Val Pro Leu His Gly Thr Ile
115 120 125

Leu Thr Arg Pro Leu Leu Glu Ser Glu Leu Val Ile Gly Ala Val Ile
130 135 140

Leu Arg Gly His Leu Arg Ile Ala Gly His His Leu Gly Arg Cys Asp
145 150 155 160

Ile Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu
165 170 175

Ser Tyr Tyr Lys Leu Gly Ala Ser Gln Arg Val Ala Gly Asp Ser Gly

180 185 190

Phe Ala Ala Tyr Ser Arg Tyr Arg Ile Gly Asn Tyr Lys Leu Asn Thr

195 200 205

Asp His Ser Ser Ser Ser Asp Asn Ile Ala Leu Leu Val Gln

210 215 220

<210> 454

<211> 186

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF6

<400> 454

atgtttcatc tcgttgactt tcaggttact atagcagaga tattactaat tattatgagg 60

acttttaaag tttccatttg gaatcttgat tacatcataa acctcataat taaaaattta 120

tctaagtcac taactgagaa taaatattct caattagatg aagagcaacc aatggagatt 180

gattaa 186

<210> 455

<211> 61

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF6

<400> 455

Met Phe His Leu Val Asp Phe Gln Val Thr Ile Ala Glu Ile Leu Leu

1 5 10 15

Ile Ile Met Arg Thr Phe Lys Val Ser Ile Trp Asn Leu Asp Tyr Ile

20 25 30

Ile Asn Leu Ile Ile Lys Asn Leu Ser Lys Ser Leu Thr Glu Asn Lys

35 40 45

Tyr Ser Gln Leu Asp Glu Glu Gln Pro Met Glu Ile Asp

50 55 60

<210> 456

<211> 366

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF7a

<400> 456

atgaaaatta ttcttttctt ggcactgata acactcgcta cttgtgagct ttatcactac 60

caagagtgtg ttagaggtac aacagtactt ttaaaagaac cttgctcttc tggaacatac 120

gagggcaatt caccatttca tcctctagct gataacaaat ttgcactgac ttgctttagc 180

actcaatttg cttttgcttg tcctgacggc gtaaaacacg tctatcagtt acgtgccaga 240

tcagtttcac ctaaactgtt catcagacaa gaggaagttc aagaacttta ctctccaatt 300

tttcttattg ttgcggcaat agtgtttata acactttgct tcacactcaa aagaaagaca 360

gaatga 366

<210> 457

<211> 121

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF7a

<400> 457

Met Lys Ile Ile Leu Phe Leu Ala Leu Ile Thr Leu Ala Thr Cys Glu

1 5 10 15

Leu Tyr His Tyr Gln Glu Cys Val Arg Gly Thr Thr Val Leu Leu Lys

20 25 30

Glu Pro Cys Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Gly Asn Ser Pro Phe His Pro

35 40 45

Leu Ala Asp Asn Lys Phe Ala Leu Thr Cys Phe Ser Thr Gln Phe Ala

50 55 60

Phe Ala Cys Pro Asp Gly Val Lys His Val Tyr Gln Leu Arg Ala Arg

65 70 75 80

Ser Val Ser Pro Lys Leu Phe Ile Arg Gln Glu Glu Val Gln Glu Leu

85 90 95

Tyr Ser Pro Ile Phe Leu Ile Val Ala Ala Ile Val Phe Ile Thr Leu

100 105 110

Cys Phe Thr Leu Lys Arg Lys Thr Glu

115 120

<210> 458

<211> 132

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223

> ORF7b

<400> 458

atgattgaac tttcattaat tgacttctat ttgtgctttt tagcctttct gctattcctt 60

gttttaatta tgcttattat cttttggttc tcacttgaac tgcaagatca taatgaaact 120

tgtcacgcct aa 132

<210> 459

<211> 43

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF7b

<400> 459

Met Ile Glu Leu Ser Leu Ile Asp Phe Tyr Leu Cys Phe Leu Ala Phe

1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Val Leu Ile Met Leu Ile Ile Phe Trp Phe Ser Leu

20 25 30

Glu Leu Gln Asp His Asn Glu Thr Cys His Ala

35 40

<210> 460

<211> 366

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF8

<400> 460

atgaaatttc ttgttttctt aggaatcatc acaactgtag ctgcatttca ccaagaatgt 60

agtttacagt catgtactca acatcaacca tatgtagttg atgacccgtg tcctattcac 120

ttctattcta aatggtatat tagagtagga gctagaaaat cagcaccttt aattgaattg 180

tgcgtggatg aggctggttc taaatcaccc attcagtaca tcgatatcgg taattataca 240

gtttcctgtt tacctttac aattaattgc caggaaccta aattgggtag tcttgtagtg 300

cgttgttcgt tctatgaaga ctttttagag tatcatgacg ttcgtgttgt tttagatttc 360

atctaa 366

<210> 461

<211> 121

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> ORF8

<400> 461

Met Lys Phe Leu Val Phe Leu Gly Ile Ile Thr Thr Val Ala Ala Phe

1 5 10 15

His Gln Glu Cys Ser Leu Gln Ser Cys Thr Gln His Gln Pro Tyr Val

20 25 30

Val Asp Asp Pro Cys Pro Ile His Phe Tyr Ser Lys Trp Tyr Ile Arg

35 40 45

Val Gly Ala Arg Lys Ser Ala Pro Leu Ile Glu Leu Cys Val Asp Glu

50 55 60

Ala Gly Ser Lys Ser Pro Ile Gln Tyr Ile Asp Ile Gly Asn Tyr Thr

65 70 75 80

Val Ser Cys Leu Pro Phe Thr Ile Asn Cys Gln Glu Pro Lys Leu Gly

85 90 95

Ser Leu Val Val Arg Cys Ser Phe Tyr Glu Asp Phe Leu Glu Tyr His

100 105 110

Asp Val Arg Val Val Leu Asp Phe Ile

115 120

<210> 462

<211> 1260

<212> DNA

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> Nucleocapsid (N)

<400> 462

atgtctgata atggacccca aaatcagcga aatgcacccc gcattacgtt tggtggaccc 60

tcagattcaa ctggcagtaa ccagaatgga gaacgcagtg gggcgcgatc aaaacaacgt 120

cggccccaag gtttacccaa taatactgcg tcttggttca ccgctctcac tcaacatggc 180

aaggaagacc ttaaattccc tcgaggacaa ggcgttccaa ttaacaccaa tagcagtcca 240

gatgaccaaa ttggctacta ccgaagagct accagacgaa ttcgtggtgg tgacggtaaa 300

atgaaagatc tcagtccaag atggtatttc tactacctag gaactgggcc agaagctgga 360

cttccctatg gtgctaacaa agacggcatc atatgggttg caactgaggg agccttgaat 420

acaccaaaag atcacattgg cacccgcaat cctgctaaca atgctgcaat cgtgctacaa 480

cttcctcaag gaacaacatt gccaaaaggc ttctacgcag aagggagcag aggcggcagt 540

caagcctctt ctcgttcctc atcacgtagt cgcaacagtt caagaaattc aactccaggc 600

agcagtaggg gaacttctcc tgctagaatg gctggcaatg gcggtgatgc tgctcttgct 660

ttgctgctgc ttgacagatt gaaccagctt gagagcaaaa tgtctggtaa aggccaacaa 720

caacaaggcc aaactgtcac taagaaatct gctgctgagg cttctaagaa gcctcggcaa 780

aaacgtactg ccactaaagc atacaatgta acacaagctt tcggcagacg tggtccagaa 840

caaacccaag gaaattttgg ggaccaggaa ctaatcagac aaggaactga ttacaaacat 900

tggccgcaaa ttgcacaatt tgcccccagc gcttcagcgt tcttcggaat gtcgcgcatt 960

ggcatggaag tcacaccttc gggaacgtgg ttgacctaca caggtgccat caaattggat 1020

gacaaagatc caaatttcaa agatcaagtc attttgctga ataagcatat tgacgcatac 1080

aaaacattcc caccaacaga gcctaaaaag gacaaaaaga agaaggctga tgaaactcaa 1140

gccttaccgc agagacagaa gaaacagcaa actgtgactc ttcttcctgc tgcagatttg 1200

gatgatttct ccaaacaatt gcaacaatcc atgagcagtg ctgactcaac tcaggcctaa 1260

<210> 463

<211> 419

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> Nucleocapsid (N)

<400> 463

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr
1 5 10 15

Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg

20 25 30

Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn
35 40 45

Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu
50 55 60

Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro
65 70 75 80

Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly

85 90 95

Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr
100 105 110

Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp
115 120 125

Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp
130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser
165 170 175

Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn
180 185 190

Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala
195 200 205

Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu

210 215 220

Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln

260 265 270

Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp

275 280 285

Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile

290 295 300

Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile

305 310 315 320

Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala

325 330 335

Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu

340 345 350

Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro

355 360 365

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

370 375 380

Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu

385 390 395 400

Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser

405 410 415

Thr Gln Ala

<210> 464

<211> 803

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<220>

<223> thyA gene

<400> 464

gaggaaccat gaaacagtat ttagaactga tgcaaaaagt gctggatgaa ggcacacaga 60

aaaacgaccg taccggcacc ggcacgcttt ccatttttgg ccatcagatg cgttttaacc 120

tgcaggaagg ctttcctctg gtgacgacga aacgctgcca tttacgttca attattcacg 180

aactgctatg gtttttgcag ggcgatacca acatcgctta cctgcacgaa aataatgtca 240

ccatctggga cgaatgggcc gatgagaacg gcgatttagg cccggtttat ggtaagcagt 300

ggcgtgcatg gccaacaccg gatggccgcc atatcgatca gatcgccacg gtcttaagcc 360

agcttaaaaa cgacccggac tctcgtcgta ttatcgtttc tgcgtggaac gtcggcgagc 420

tggataagat ggcgctggcg ccgtgtcacg ccttttcca gttttatgtc gcagatggaa 480

aactctcctg tcagctttat cagcgctcct gcgatgtgtt cctcggtctg ccgttcaaca 540

ttgccagcta cgcgttactg gtgcatatga tggcgcaaca gtgcgacctg gacgtcggcg 600

attttgtctg gaccggcggc gacacgcacc tgtacagcaa ccatatggag cagacgcacc 660

tgcaattaag ccgtgaaccg cgcgcgctgc cgaaattggt cattaagcgt aaacccgatt 720

cgctttttga ctaccggttc gatgatttcg aaattgaagg ctatgatccg caccccggta 780

ttaaagcgcc ggtcgctatc taa 803

<210> 465

<211> 264

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<220>

<223> thyA

<400> 465

Met Lys Gln Tyr Leu Glu Leu Met Gln Lys Val Leu Asp Glu Gly Thr
1 5 10 15

Gln Lys Asn Asp Arg Thr Gly Thr Gly Thr Leu Ser Ile Phe Gly His
20 25 30

Gln Met Arg Phe Asn Leu Gln Glu Gly Phe Pro Leu Val Thr Thr Lys
35 40 45

Arg Cys His Leu Arg Ser Ile Ile His Glu Leu Leu Trp Phe Leu Gln
50 55 60

Gly Asp Thr Asn Ile Ala Tyr Leu His Glu Asn Asn Val Thr Ile Trp
65 70 75 80

Asp Glu Trp Ala Asp Glu Asn Gly Asp Leu Gly Pro Val Tyr Gly Lys

85 90 95

Gln Trp Arg Ala Trp Pro Thr Pro Asp Gly Arg His Ile Asp Gln Ile
100 105 110

Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Lys Asn Asp Pro Asp Ser Arg Arg Ile
115 120 125

Ile Val Ser Ala Trp Asn Val Gly Glu Leu Asp Lys Met Ala Leu Ala
130 135 140

Pro Cys His Ala Phe Phe Gln Phe Tyr Val Ala Asp Gly Lys Leu Ser
145 150 155 160

Cys Gln Leu Tyr Gln Arg Ser Cys Asp Val Phe Leu Gly Leu Pro Phe
165 170 175

Asn Ile Ala Ser Tyr Ala Leu Leu Val His Met Met Ala Gln Gln Cys
180 185 190

Asp Leu Asp Val Gly Asp Phe Val Trp Thr Gly Gly Asp Thr His Leu
195 200 205

Tyr Ser Asn His Met Glu Gln Thr His Leu Gln Leu Ser Arg Glu Pro
210 215 220

Arg Ala Leu Pro Lys Leu Val Ile Lys Arg Lys Pro Asp Ser Leu Phe
225 230 235 240

Asp Tyr Arg Phe Asp Asp Phe Glu Ile Glu Gly Tyr Asp Pro His Pro
245 250 255

Gly Ile Lys Ala Pro Val Ala Ile
260

<210> 466

<211> 1842

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse membrane bound IL-12p70

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(1005)

<223> mouse IL-12p40

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(66)

<223> IL-12p40 signal sequence

<220>

<221> misc_feature

<222

> (1006)...(1050)

<223> (Gly4-Ser)3 Linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (1051)...(1629)

<223> mouse IL-12p35 del1-22

<220>

<221> misc_feature

<222> (1630)...(1839)

<223> muB7 TM

<220>

<221> misc_feature

<222> (1630)...(1839)

<223> muCD80 (Isoform 1)

<400> 466

atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg ttttgctggt gtctccactc 60

atggccatgt gggagctgga gaaagacgtt tatgttgtag aggtggactg gactcccgat 120

gcccctggag aaacagtgaa cctcacctgt gacacgcctg aagaagatga catcacctgg 180

acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga ccctgaccat cactgtcaaa 240

gagtttctag atgctggcca gtacacctgc cacaaaggag gcgagactct gagccactca 300

catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggtcca ctgaaatttt aaaaaatttc 360

aaaaacaaga ctttcctgaa gtgtgaagca ccaaattact ccggacggtt cacgtgctca 420

tggctggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca agagcagtag cagttcccct 480

gactctcggg cagtgacatg tggaatggcg tctctgtctg cagagaaggt cacactggac 540

caaagggact atgagaagta ttcagtgtcc tgccaggagg atgtcacctg cccaactgcc 600

gaggagaccc tgcccattga actggcgttg gaagcacggc agcagaataa atatgagaac 660

tacagcacca gcttcttcat cagggacatc atcaaaccag acccgcccaa gaacttgcag 720

atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg agtaccctga ctcctggagc 780

actccccatt cctacttctc cctcaagttc tttgttcgaa tccagcgcaa gaaagaaaag 840

atgaaggaga cagaggaggg gtgtaaccag aaaggtgcgt tcctcgtaga gaagacatct 900

accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag ctcaggatcg ctattacaat 960

tcctcatgca gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc gatccggtgg cggtggctcg 1020

ggcggtggtg ggtcgggtgg cggcggatct agggtcattc cagtctctgg acctgccagg 1080

tgtcttagcc agtcccgaaa cctgctgaag accacagatg acatggtgaa gacggccaga 1140

gaaaaactga aacattattc ctgcactgct gaagacatcg atcatgaaga catcacacgg 1200

gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta ccactggaac tacacaagaa cgagagttgc 1260

ctggctacta gagagacttc ttccacaaca agagggagct gcctgccccc acagaagacg 1320

tctttgatga tgaccctgtg ccttggtagc atctatgagg acttgaagat gtaccagaca 1380

gagttccagg ccatcaacgc agcacttcag aatcacaacc atcagcagat cattctagac 1440

aagggcatgc tggtggccat cgatgagctg atgcagtctc tgaatcataa tggcgagact 1500

ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca gacccttaca gagtgaaaat gaagctctgc 1560

atcctgcttc acgccttcag cacccgcgtc gtgaccatca acagggtgat gggctatctg 1620

agctccgccc ccccagaaga ccctcctgat agcaagaaca cacttgtgct ctttggggca 1680

ggattcggcg cagtaataac agtcgtcgtc atcgttgtca tcatcaaatg cttctgtaag 1740

cacagaagct gtttcagaag aaatgaggca agcagagaaa caaacaacag ccttaccttc 1800

gggcctgaag aagcattagc tgaacagacc gtcttccttt ag 1842

<210> 467

<211> 1767

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human membrane bound IL-12p70

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(984)

<223> huIL-12p40

<220>

<221> misc_feature

<222

> (985)...(1029)

<223> (Gly4-Ser)3 Linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (1030)...(1620)

<223> huIL-12p35 del1-22

<220>

<221> misc_feature

<222> (1621)...(1764)

<223> Hu CD80 (Isoform 1)

<400> 467

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg ttttttctggc atctcccctc 60

gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat 120

gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacacccctg aagaagatgg tatcacctgg 180

accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa 240

gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300

ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag 360

aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc 420

acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480

ggctcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540

agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgccca 600

gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660

gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgaccc acccaagaac 720

ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780

acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840

agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900

cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960

gaatgggcat ctgtgccctg cagtggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 1020

ggcggatcta gaaacctccc cgtggccact ccagacccag gaatgttccc atgccttcac 1080

cactcccaaa acctgctgag ggccgtcagc aacatgctcc agaaggccag acaaactcta 1140

gaattttacc cttgcacttc tgaagagatt gatcatgaag atatcacaaa agataaaacc 1200

agcacagtgg aggcctgttt accattggaa ttaaccaaga atgagagttg cctaaattcc 1260

agagagacct ctttcataac taatgggagt tgcctggcct ccagaaagac ctcttttatg 1320

atggccctgt gccttagtag tatttatgaa gacttgaaga tgtaccaggt ggagttcaag 1380

accatgaatg caaagcttct gatggatcct aagaggcaga tctttctaga tcaaaacatg 1440

ctggcagtta ttgatgagct gatgcaggcc ctgaatttca acagtgagac tgtgccacaa 1500

aaatcctccc ttgaagaacc ggatttttat aaaactaaaa tcaagctctg catacttctt 1560

catgctttca gaattcgggc agtgactatt gatagagtga tgagctatct gaatgcttcc 1620

gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 1680

tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 1740

agaagggaaa gtgtacgccc tgtataa 1767

<210> 468

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human IRF3 S396D

<400> 468

atgggaaccc caaagccacg gattctgccc tggctggtgt cgcagctgga cctggggcaa 60

ctggagggcg tggcctgggt gaacaagagc cgcacgcgct tccgcatccc ttggaagcac 120

ggcctacggc aggatgcaca gcaggaggat ttcggaatct tccaggcctg ggccgaggcc 180

actggtgcat atgttcccgg gagggataag ccagacctgc caacctggaa gaggaatttc 240

cgctctgccc tcaaccgcaa agaagggttg cgtttagcag aggaccggag caaggaccct 300

cacgacccac ataaaatcta cgagtttgtg aactcaggag ttggggactt ttcccagcca 360

gacacctctc cggacaccaa tggtggaggc agtacttctg atacccagga agacattctg 420

gatgagttac tgggtaacat ggtgttggcc ccactcccag atccgggacc cccaagcctg 480

gctgtagccc ctgagccctg ccctcagccc ctgcggagcc ccagcttgga caatcccact 540

cccttcccaa acctggggcc ctctgagaac ccactgaagc ggctgttggt gccgggggaa 600

gagtgggagt tcgaggtgac agccttctac cggggccgcc aagtcttcca gcagaccatc 660

tcctgcccgg agggcctgcg gctggtgggg tccgaagtgg gagacaggac gctgcctgga 720

tggccagtca cactgccaga ccctggcatg tccctgacag acaggggagt gatgagctac 780

gtgaggcatg tgctgagctg cctgggtggg ggactggctc tctggcgggc cgggcagtgg 840

ctctgggccc agcggctggg gcactgccac acatactggg cagtgagcga ggagctgctc 900

cccaacagcg ggcatgggcc tgatggcgag gtccccaagg acaaggaagg aggcgtgttt 960

gacctggggc ccttcattgt agatctgatt accttcacgg aaggaagcgg acgctcacca 1020

cgctatgccc tctggttctg tgtgggggag tcatggcccc aggaccagcc gtggaccaag 1080

aggctcgtga tggtcaaggt tgtgcccacg tgcctcaggg ccttggtaga aatggcccgg 1140

gtagggggtg cctcctccct ggagaatact gtggacctgc acattgacaa cagccaccca 1200

ctctccctca cctccgacca gtacaaggcc tacctgcagg acttggtgga gggcatggat 1260

ttccagggcc ctggggagag ctga 1284

<210> 469

<211> 567

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IFN alpha 2

<400> 469

atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctcctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60

tctgtgggct gtgatctgcc tcaaacccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc 120

ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tcctgcttga aggacagaca tgactttgga 180

tttccccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat 240

gagatgatcc agcagatctt caatctcttc agcacaaagg actcatctgc tgcttgggat 300

gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc 360

tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag actcccctga tgaaggagga ctccattctg 420

gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480

tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg 540

caagaaagtt taagaagtaa ggaatga 567

<210> 470

<211> 564

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IFN beta

<400> 470

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctcctgttgt gcttctccac tacagctctt 60

tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120

ctcctgtggc aattgaatgg gaggcttgaa tactgcctca aggacaggat gaactttgac 180

atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240

tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300

aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360

acagtcctgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420

ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480

cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540

cttacaggtt acctccgaaa ctga 564

<210> 471

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thya-1 primer

<400> 471

ccttcccagt tgtatgagtt ggc 23

<210> 472

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thya-2 primer

<400> 472

ctgttatccc tagaagcagc tccagcctac acctgtgtgc cttcatccag ca 52

<210> 473

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thya-3 primer

<400> 473

gatgaaggca cacagtgaaa ttgaaggcta tgatccgcac 40

<210> 474

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thya-4 primer

<400> 474

gttgccagcc ataaagtcct gtg 23

<210> 475

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thya-5 primer

<400> 475

ccatgctctt tcctggctca 20

<210> 476

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thya-6 primer

<400> 476

ctgacaaagc accatgaacc g 21

<210> 477

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FRT-3 primer

<400> 477

gtgtaggctg gagctgcttc 20

<210> 478

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> loxp-4 primer

<400> 478

ggcttcccaa ccttaccaga g 21

<210> 479

<211> 203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thyA MHA gBlock fragment

<400> 479

ggcttcccaa ccttaccaga gggcgcccca gctggcaatt ccgggtaccg gcaagtaggg 60

ataacagggt aatgttatct gcagaccaag gacccagatt atgcagcaac acgtttcctg 120

aggaaccatg aaacagtatt tagaactgat gcaaaaagtg ctggatgaag gcacacagtg 180

aaattgaagg ctatgatccg cac 203

<210> 480

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid linker

<400> 480

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 481

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> transmembrane and cytosolic portions of murine
CD80

<400> 481

Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly
1 5 10 15

Ala Gly Phe Gly Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile
20 25 30

Lys Cys Phe Cys Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser
35 40 45

Arg Glu Thr Asn Asn Ser Leu Thr Phe Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala
50 55 60

Glu Gln Thr Val Phe Leu
65 70

<210> 482

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human IL-12p40

<400> 482

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

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

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160
Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175
Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190
Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220
Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240
Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255
Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285
Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300
Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320
Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210> 483

<211> 197

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human IL-12p35

<400> 483

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

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65                  70                  75                  80
Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
                85                  90                  95
Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
            100                 105                 110
Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
        115                 120                 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
    130                 135                 140
Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145                 150                 155                 160
Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
                165                 170                 175
Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
            180                 185                 190

Tyr Leu Asn Ala Ser
        195
```

<210> 484

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> transmembrane and cytosolic portions of human CD80

<400> 484

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
1 5 10 15

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
20 25 30

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val

35 40 45

<210> 485

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SC16.56 DLL3HLxCD3HL

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(21)

<223> mouse IgGK leader

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)...(139)

<223> SC16.56 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (140)...(154)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (155)...(261)

<223> SC16.56 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (262)...(266)

<223> amino acid linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (267)...(382)

<223> 145-2C11 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (383)...(397)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (398)...(504)

<223> 145-2C11 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (505)...(512)

<223> Flag tag

<400> 485

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Lys Trp Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser

85 90 95

Ala Ser Thr Ala Ser Leu Gln Ile Ile Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Val Met Thr Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Val Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg

195 200 205

Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr

245 250 255

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

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys

275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val

325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu

340 345 350

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp

355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp

420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr

435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile

465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly

485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

500 505 510

<210> 486

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SC16.56 DLL3LHxCD3HL

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(21)

<223> mouse IgGK leader

<220

>

<221> misc_feature

<222> (22)...(128)

<223> SC16.56 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (129)...(143)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (144)...(261)

<223> SC16.56 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (262)...(266)

<223> amino acid linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (267)...(382)

<223> 145-2C11 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (383)...(397)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (398)...(504)

<223> 145-2C11 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (505)...(512)

<223> Flag tag

<400> 486

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu
20 25 30

Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
35 40 45

Ser Val Ser Asn Asp Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser

50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile
85 90 95

Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp
100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
145 150 155 160

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Ala

180 185 190

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
195 200 205

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser Leu
210 215 220

Gln Ile Ile Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
225 230 235 240

Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

245 250 255

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys

275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val

325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu

340 345 350

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp

355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp

420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr

435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile

465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly

485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

500 505 510

<210> 487

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SC16.15 DLL3HLxCD3HL

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(21)

<223> mouse IgGK leader

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)...(138)

<223> SC16.15 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (139)...(153)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (154)...(260)

<223> SC16.15 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (261)...(265)

<223> amino acid linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (266)...(381)

<223> 145-2C11 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (382)...(396)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (397)...(503)

<223> 145-2C11 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (504)...(511)

<223> Flag tag

<400> 487

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30

Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Val Tyr Thr Glu
65 70 75 80

Phe Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Thr Thr Ala Ser Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Asn Phe Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Ala Ile Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

180 185 190

Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Asn Ser Leu Glu

195 200 205

Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr

210 215 220

Ser Leu Lys Ile Asn Ser Met Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe

225 230 235 240

Cys Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

245 250 255

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

260 265 270

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

275 280 285

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln

290 295 300

Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser

305 310 315 320

Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser

325 330 335

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys

340 345 350

Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys

355 360 365

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met

385 390 395 400

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

405 410 415

Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr

420 425 430

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn

435 440 445

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

450 455 460

Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly

465 470 475 480

Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro

485 490 495

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

500 505 510

<210> 488

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SC16.15 DLL3LHxCD3HL

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(21)

<223> mouse IgGK leader

<220>

<221

> misc_feature

<222> (22)...(128)

<223> SC16.15 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (129)...(143)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (144)...(260)

<223> SC16.15 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (261)...(265)

<223> amino acid linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (266)...(381)

<223> 145-2C11 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (382)...(396)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (397)...(503)

<223> 145-2C11 VL

<

220>

<221> misc_feature

<222> (504)...(511)

<223> Flag tag

<400> 488

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20 25 30

Ala Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

35 40 45

Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser

50 55 60

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile
85 90 95
Asn Ser Met Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Ala
100 105 110
Tyr Asp Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

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

180 185 190
Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Val Tyr Thr Glu Phe Asn Gln Asn Phe Lys
195 200 205
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Met
210 215 220
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240
Arg Gly Gly Ser Asn Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

245 250 255
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
260 265 270
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu
275 280 285
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln
290 295 300
Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser

305 310 315 320

Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser

325 330 335

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys

340 345 350

Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys

355 360 365

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met

385 390 395 400

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

405 410 415

Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr

420 425 430

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn

435 440 445

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

450 455 460

Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly

465 470 475 480

Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro

485 490 495

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

500 505 510

<210> 489

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SC16.34 DLL3HLxCD3HL

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(21)

<223> mouse IgGK leader

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)...(139)

<223> SC16.34 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (140)...(154)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (155)...(261)

<223> SC16.34 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (262)...(266)

<223> amino acid linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (267)...(382)

<223> 145-2C11 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (383)...(397)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (398)...(504)

<223> 145-2C11 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (505)...(512)

<223> Flag tag

<400> 489

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Lys Arg Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asp Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser
85 90 95

Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Gly Gly Asn Ser Pro Ser Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Val Met Thr Gln
145 150 155 160

Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
165 170 175

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg
195 200 205

Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp
210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr

245 250 255

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys

275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val

325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu

340 345 350

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp

355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp

420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr

435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile

465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly
485 490 495
Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
500 505 510

<210> 490
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> SC16.34 DLL3LHxCD3HL
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(21)
<223> mouse IgGK leader
<220
>
<221> misc_feature
<222> (22)...(128)
<223> SC16.34 VL
<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(143)
<223> amino acid GS linker
<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(261)
<223> SC16.34 VH
<220>
<221> misc_feature
<222> (262)...(266)
<223> amino acid linker
<220>
<221> misc_feature
<222> (267)...(382)
<223> 145-2C11 VH

<220>

<221> misc_feature

<222> (383)...(397)

<223> amino acid GS linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (398)...(504)

<223> 145-2C11 VL

<220>

<221> misc_feature

<222> (505)...(512)

<223> Flag tag

<400> 490

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu
20 25 30

Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
35 40 45

Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser

50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
85 90 95

Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp
100 105 110

Tyr Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly

180 185 190

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asp Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

195 200 205

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu

210 215 220

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

225 230 235 240

Arg Ile Gly Gly Asn Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

245 250 255

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys

275 280 285

Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val

325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu

340 345 350

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp

355 360 365

Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp

420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr

435 440 445

Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

450 455 460

Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile

465 470 475 480

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly

485 490 495

Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

500 505 510

<210> 491

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> codon optimized leader sequence

<400> 491

atggagacac ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggc 60

<210> 492

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ovalbumin peptide

<400> 492

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 493

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> human IRF3 S396D

<400> 493

Met Gly Thr Pro Lys Pro Arg Ile Leu Pro Trp Leu Val Ser Gln Leu
1 5 10 15

Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gly Val Ala Trp Val Asn Lys Ser Arg Thr
20 25 30

Arg Phe Arg Ile Pro Trp Lys His Gly Leu Arg Gln Asp Ala Gln Gln
35 40 45

Glu Asp Phe Gly Ile Phe Gln Ala Trp Ala Glu Ala Thr Gly Ala Tyr
50 55 60

Val Pro Gly Arg Asp Lys Pro Asp Leu Pro Thr Trp Lys Arg Asn Phe
65 70 75 80

Arg Ser Ala Leu Asn Arg Lys Glu Gly Leu Arg Leu Ala Glu Asp Arg
85 90 95

Ser Lys Asp Pro His Asp Pro His Lys Ile Tyr Glu Phe Val Asn Ser
100 105 110

Gly Val Gly Asp Phe Ser Gln Pro Asp Thr Ser Pro Asp Thr Asn Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Thr Ser Asp Thr Gln Glu Asp Ile Leu Asp Glu Leu Leu
130 135 140

Gly Asn Met Val Leu Ala Pro Leu Pro Asp Pro Gly Pro Pro Ser Leu
145 150 155 160

Ala Val Ala Pro Glu Pro Cys Pro Gln Pro Leu Arg Ser Pro Ser Leu
165 170 175

Asp Asn Pro Thr Pro Phe Pro Asn Leu Gly Pro Ser Glu Asn Pro Leu
180 185 190

Lys Arg Leu Leu Val Pro Gly Glu Glu Trp Glu Phe Glu Val Thr Ala
195 200 205

Phe Tyr Arg Gly Arg Gln Val Phe Gln Gln Thr Ile Ser Cys Pro Glu
210 215 220
Gly Leu Arg Leu Val Gly Ser Glu Val Gly Asp Arg Thr Leu Pro Gly
225 230 235 240
Trp Pro Val Thr Leu Pro Asp Pro Gly Met Ser Leu Thr Asp Arg Gly
245 250 255

Val Met Ser Tyr Val Arg His Val Leu Ser Cys Leu Gly Gly Gly Leu
260 265 270
Ala Leu Trp Arg Ala Gly Gln Trp Leu Trp Ala Gln Arg Leu Gly His
275 280 285
Cys His Thr Tyr Trp Ala Val Ser Glu Glu Leu Leu Pro Asn Ser Gly
290 295 300
His Gly Pro Asp Gly Glu Val Pro Lys Asp Lys Glu Gly Gly Val Phe
305 310 315 320

Asp Leu Gly Pro Phe Ile Val Asp Leu Ile Thr Phe Thr Glu Gly Ser
325 330 335
Gly Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Leu Trp Phe Cys Val Gly Glu Ser Trp
340 345 350
Pro Gln Asp Gln Pro Trp Thr Lys Arg Leu Val Met Val Lys Val Val
355 360 365
Pro Thr Cys Leu Arg Ala Leu Val Glu Met Ala Arg Val Gly Gly Ala
370 375 380

Ser Ser Leu Glu Asn Thr Val Asp Leu His Ile Asp Asn Ser His Pro
385 390 395 400
Leu Ser Leu Thr Ser Asp Gln Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln Asp Leu Val
405 410 415
Glu Gly Met Asp Phe Gln Gly Pro Gly Glu Ser
420 425

<210> 494
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> IFN alpha 2

<400> 494

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys

1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu

20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser

35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu

50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His

65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser

85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr

100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val

115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys

130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro

145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu

165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

180 185

<210> 495

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IFN beta

<400> 495

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180 185