



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0088458
(43) 공개일자 2018년08월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7019140
- (22) 출원일자(국제) 2016년12월05일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년07월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/064969
- (87) 국제공개번호 WO 2017/096374
국제공개일자 2017년06월08일
- (30) 우선권주장
62/263,377 2015년12월04일 미국(US)
62/422,454 2016년11월15일 미국(US)

- (71) 출원인
다나-파버 캔서 인스티튜트 임크.
미국 메사추세츠 보스턴 브루클린 애비뉴
450
- (72) 발명자
부허페니히 카이
미국 02445 메사추세츠주 보스턴 퀸즈베리 스트
리트 111 아파트먼트 씨
- (74) 대리인
바드리나트 소우미아
김진희, 김태홍

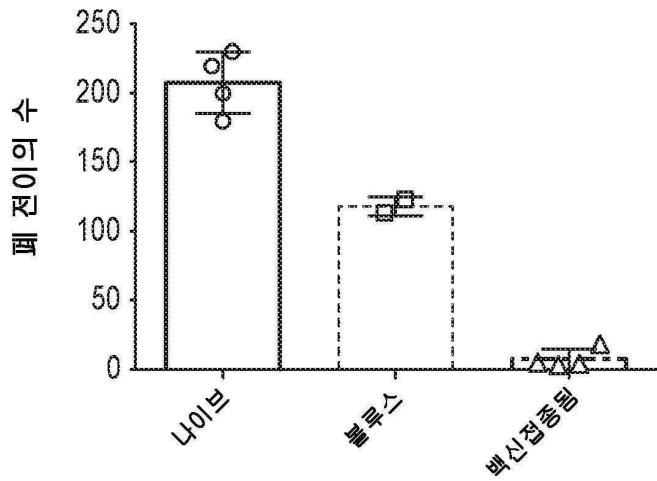
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 암의 치료를 위한 MICA/B 알파 3 도메인의 백신접종

(57) 요약

본 발명은 MIC 알파 3-도메인 폴리펩타이드에 대해 면역 반응을 유발함으로써 대상에서 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도11a



(52) CPC특허분류

A61K 2039/55522 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

A61K 2039/6068 (2013.01)

A61K 2039/645 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

면역원성 성분으로서 MIC 알파 3-도메인을 포함하거나 이로 구성되는 웹타이드의 유효량을 포함하는 백신 조성물로서, 유효량은 MIC 알파 3-도메인에 대해 면역 반응을 유발하는데 효과적인 양인 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, MIC 알파 3-도메인은 MICA 또는 MICB 알파 3-도메인인 백신 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, MIC 알파 3-도메인은 당화되지 않은 것인 백신 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 웹타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 것인 백신 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 백신 조성물은 복수의 웹타이드를 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 웹타이드는 캐리어 단백질에 접합된 것인 백신 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, GM-CSF를 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 8

MIC 알파 3-도메인 단백질에 연결된 단량체성 페리틴 서브유닛 단백질을 포함하는 융합 단백질로서, 단량체성 페리틴 서브유닛 단백질은 융합 단백질을 나노입자로 자기조립시키는 도메인을 포함하는 융합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 단량체성 서브유닛은 헬리코박터 파일로리 페리틴 단백질의 단량체성 서브유닛인 융합 단백질.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 시토신-구아노신(CpG) 올리고뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하는 융합 단백질.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 나노입자.

청구항 12

복수의 MIC 알파 3-도메인 웹타이드를 포함하는 나노입자.

청구항 13

제11항 또는 제12항의 나노입자를 포함하는 백신 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, GM-CSF를 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제7항 및 제13항 내지 제14항 중 어느 한 항의 백신 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 암을 치료하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, GM-CSF를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 백신 조성물은 치료 요법의 일부로서 투여되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 치료 요법은 방사선 요법, 표적 요법, 면역요법, 또는 화학요법인 방법.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 이의 혈청에서 탈락된 MIC에 대해 양성으로 판정된 것인 방법.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, MIC 알파 3-도메인 항원 이외의 항원에 특이적인 하나 이상의 백신을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 21

MIC 알파-3 도메인을 발현하는 세포를 포함하는 백신을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법.

청구항 22

MIC에 대한 면역 반응이 복제 또는 비복제 바이러스의 사용에 의해 유도되는 암을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

본원은 2015년 12월 4일에 출원된 미국 가출원 제62/263,377호 및 2016년 11월 15일에 출원된 제62/422,454호의 우선권 및 이익을 주장하며, 이를 각각의 내용은 그 전체가 참고로 본원에 포함되어 있다.

[0003] 서열목록의 참조에 의한 포함

2016년 12월 2일에 생성된 30.9 KB 크기의 "DFCI-126-001WO-Sequence Listing.txt"라는 명칭의 텍스트 파일의 내용은 그 전체가 참고로 본원에 포함되어 있다.

[0005] 발명의 기술분야

본 발명은 일반적으로 대상에서 항종양 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0007] 정부 이익

본 발명은 미국 국립 보건원에 의해 수여된 R01CA173750 하에 미국 정부의 지원으로 이뤄졌다. 미국 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

[0009] 암 면역요법 분야에서의 최근의 발전은 심지어 진행암을 박멸하는 우리의 면역 체계의 능력을 입증하였다. 이들 요법은 암 치료의 측면을 빠르게 변화시키고 있다. 종양 재발을 예방하기 위해 항체를 반복 투여해야 하는 단클론 항체 요법과 달리, 백신은 내인성 면역 기억을 유도할 수 있으므로 장기간 예방을 제공할 가능성이 있다.

[0010] 백신 요법을 위한 항원의 선택은 후보 항원의 종양 성장에서의 생물학적 역할 및 정상 조직 대비 종양 세포에 의한 이들의 발현 수준의 종합적인 이해를 필요로 한다. MICA 및 밀접하게 관련된 MICB 단백질(MIC로 약칭됨)은 정상 세포에 의해 존재하지 않거나 매우 낮은 수준으로 발현되지만, 게놈 손상에 이차적인 다양한 상이한 암에 의해 광범위하게 상향조절되는 항원이다. MIC는 세포독성 립프구, 특히 NK 세포, CD8 T 세포 및 감마-델타 T 세포 상의 NKG2D 수용체에 대한 중요한 리간드이다. MIC의 발현은 면역 체계에 의한 제거를 위해 이러한 세포를 표적으로 한다. 그러나, 많은 종양은 세포 표면으로부터 MIC를 탈락(shedding)시킴으로써 이 중요한 면역 감시 경로를 회피하는 것으로 밝혀지며, 이는 MIC 알파3 도메인이 디설파이드 이소머라아제 ERp5에 의해 언폴딩(unfolding)되어 ADAM 10 및 ADAM 17과 같은 매트릭스 메탈로프로테아제에 의한 절단에 민감하게 되는 과정이다. 탈락된 MIC는 NK 세포 및 CD8 T 세포 상에서 NKG2D 수용체의 하향조절을 일으킨다. 따라서, 단백분해 절단은 면역 자극 단백질을 면역억제 물질로 전환시킨다.

[0011] 따라서, MICA 탈락을 억제하는 화합물이 필요하다.

발명의 내용

[0012] 다양한 양태에서, 본 발명은 면역원성 성분으로서 MIC 알파 3-도메인을 포함하는 웨타이드의 유효량을 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 유효량은 MIC 알파 3-도메인에 대해 면역 반응을 유발하는데 효과적인 양을 의미한다.

[0013] MIC 알파 3-도메인은 MICA 또는 MICB 알파 3-도메인이다. 선택적으로, MIC 알파 3-도메인은 당화되지 않는다. 바람직하게는, 웨타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 다양한 양태에서, 백신 조성물은 복수의 웨타이드를 포함한다. 일부 양태에서, 웨타이드는 캐리어 단백질에 접합된다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 MIC 알파 3-도메인 단백질에 연결된 단량체성 폐리틴 서브유닛 단백질을 갖는 융합 단백질을 제공한다. 단량체성 폐리틴 서브유닛 단백질은 융합 단백질을 나노입자로 자기조립시키는 도메인을 갖는다. 바람직한 구현예에서, 단량체성 서브유닛은 헬리코박터 과일로리 폐리틴 단백질이다. 선택적으로, 융합 단백질은 CpG 올리고뉴클레오타이드에 추가로 접합된다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 융합 단백질을 포함하는 나노입자를 제공한다. 나노입자는 복수의 MIC 알파 3-도메인 웨타이드를 포함한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 나노입자를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 백신 조성물은 GM-CSF를 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 백신 조성물을 대상에게 투여함으로써 대상에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 선택적으로, 백신 조성물은 GM-CSF를 함유한다. 대상은 이들의 혈청에서 탈락된 MIC에 대해 양성으로 판정되었다. 백신 조성물은 치료 요법의 일부로서 투여된다. 치료 요법은 예를 들어, 방사선 요법, 표적 요법, 면역요법, 또는 화학요법을 포함한다. 선택적으로, 대상은 MIC 알파 3-도메인 항원 이외의 항원에 특이적인 하나 이상의 백신을 추가로 투여받는다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 MIC 알파-3 도메인을 발현하는 세포를 포함하는 백신을 대상에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. 추가의 양태에서, 본 발명은 MIC에 대한 면역 반응이 복제 또는 비복제 바이러스의 사용에 의해 유도되는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0019] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재되어 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 및 다른 참고문헌은 그 전체가 참고로 본원에 명시적으로 포함되어 있다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 본원에 기재된 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 다른 특징 및 장점을 하기 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백할 것이며 이에 의해 포함될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021]

도 1a는 NKG2D 동종이랑체 및 MICA 사이의 상호작용을 나타내는 개략도이다. 도식이다. MICA-알파3 도메인이 참고를 위해 확인된다(Nat Immunol. 2001 May;2(5):443-51. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA).

도 1b는 종양 세포의 표면으로부터 MIC의 탈락을 통해 종양이 면역 감시를 회피하는 하나의 기전을 나타내는 개략도이다.

도 1c는 폐리틴 입자를 도시하는 개략도이다.

도 1d는 인간 및 마우스 폐리틴에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응을 나타내는 지도를 도시한 개략도이다.

도 2a는 MICA 알파3 폐리틴 융합 유전자 구조물의 개략도이다.

도 2b는 (좌측) XK16/60 Superdex200 컬럼(유속: 2ml/분; 러닝 완충액: 50mM Tris, 150mM NaCl pH 7.5)을 사용한 MICA 알파3-폐리틴의 크기 배제 크로마토그램이다. 도 2b는 (우측) 단백질 피크에서 22분 내지 27분에 수집된 샘플을 함유하는 환원 조건하의 SDS 겔을 추가로 도시한다.

도 2c는 탈당화된(deglycosylated) MICA 알파3 구조물의 개략도이다.

도 2d는 (좌측) Superdex200 컬럼(유속: 1ml/분; 러닝 완충액: 50mM Tris, 150mM NaCl pH 7.5)을 사용한 MICA 알파3의 크기 배제 크로마토그램이다. 도 2d는 (우측) 피크 단백질에서 16분 내지 20분에 수집된 샘플을 함유하는 환원 조건하의 SDS 겔을 추가로 도시한다.

도 3은 피하 주사를 위한 메조다공성 실리카 막대(MSR) 백신의 사용, 및 생성된 강력한 면역 반응의 유도를 도시하는 개략도이다. 문헌[Kim, J & Aileen, W.L. et al. Nature Biotech. 2015]을 참고한다.

도 4a 및 4b는 폐 전이 모델에서 MIC α3 도메인 백신의 효능을 도시하는 일련의 그래프이다. 도 4a에 제시된 데이터는 하기와 같이 얻었다. B6 마우스를, 스캐폴드(scaffold)가 없는 볼루스(bolus)로서(볼루스) 또는 메조다공성 실리카 막대(MSR) 스캐폴드 내에서(MSR 백신), 200 μg의 MIC α3 단백질, 1 μg의 GM-CSF 및 100 μg의 CpG-ODN으로 면역화시켰다. 마우스에게 28일에 하나의 부스터(boosting) 주사를 투여하였다. 3주 후, 마우스에게 5×10^5 B16-MIC 종양 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 폐 전이의 수를 종양 세포 주사 후 14일에 정량화하였다. 도 4b에서 수득된 데이터는 하기와 같이 얻었다. 탈락된 MIC를 종양 세포 주사 후 0, 5, 및 13일에 ELISA에 의해 정량하였다. 이전 실험은 MIC α3 도메인 특이적 항체가 탈락된 MIC를 검출하는데 사용된 ELISA를 방해하지 않는다는 것을 보여주었다.

도 5a 및 5b는 MICA-폐리틴 융합 단백질의 백신접종이 MICA 특이적 항체의 높은 역가(titer)를 유도한다는 것을 나타내는 일련의 플롯 및 그래프이다. 도 5a는 B16F10 마우스 흑색종 세포의 표면 상에 발현된 전장 MICA에 대한 면역화된 마우스의 혈청 내의 MICA α3 특이적 항체의 FACS 플롯을 도시한다. B16F10 흑색종 세포를 인간 MICA cDNA(대립유전자 009)로 형질감염시킨 다음, 아이소타입 대조군 항체(음성 대조군) 또는 MICA에 특이적인 젖과 mAb의 포화 농도(6D4, 양성 대조군)로 표지하였다. 이후, 이 시스템을 사용하여 MICA α3-폐리틴 또는 대조군 항원(OVA)으로 백신접종된 마우스의 혈청을 시험하였다. PE-표지된 이차 항마우스 IgG 항체를 사용하여 세포 표면에 결합된 항체를 검출하였다. 형광을 FACS에 의해 정량화하였다. 백신접종 후 14-42일에 마우스의 1 μl의 혈청을 사용하는 경우에도 강한 염색이 검출되었다. 도 5b는 B16F10 마우스 흑색종 세포의 표면 상에 발현된 전장 MICA에 대한 면역화된 마우스의 혈청 내의 MICA α3 특이적 항체의 결합의 3반복의 +/- SD를 나타내는 평균 형광 강도(MFI)의 막대 그래프를 도시한다.

도 6은 백신접종시 유도된 IgG의 상이한 하위클래스를 결정하기 위해 ELISA에 의해 분석된 MICA-폐리틴 면역화된 마우스의 시험된 혈청을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 7은 MICA-폐리틴 면역화된 그룹 내의 혈청 항체가 종양 세포 표면으로부터의 MICA 탈락을 방지한다는 것을 나타내는 그래프이다.

도 8a 및 8b는 MICA-폐리틴 백신의 치료 활성을 도시하는 일련의 그래프이다. C57BL/6 마우스를 MICA α3-폐리틴 또는 난백알부민으로 면역화시키고 28일에 부스터 주사를 투여하였다. 마우스에게 폐 전이를 형성하는 5×10^5 B16-MIC 종양 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 폐 전이의 수를 14일에 계수하였고(도 8a), 탈락된 MICA를 혈청에서 정량화하였다(도 8b). MICA α3 도메인 백신은 실질적으로 폐 전이의 수를 감소시킨 반면, 대조군 백신은 효과가 없었다. 또한, 탈락된 MICA는 MICA α3-폐리틴 백신을 받은 마우스의 혈청에서는 검출불가능해진 반

면, 탈락된 MICA 수준은 두 대조군에서 매우 높았다. 도 8a는 MICA 알파3-페리틴을 이용한 면역화가 나이브(naive) 대조군, 또는 OVA-단백질 주사를 받은 동물과 비교하여 전이를 예방한다는 것을 입증한다. 도 8b는 백신접종된 마우스가 혈청에서 검출불가능한 수준의 sMICA(탈락된 MICA)를 가지고 있었음을 나타내는 ELISA에 의해 수득된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9a-9c는 MICA-페리틴 백신에 의해 유도된 항체의 역가(도 9a) 뿐만 아니라 백신 투여량이 폐 결절의 수(도 9b) 및 sMICA의 양(도 9c)에 미치는 효과를 도시하는 일련의 그래프이다.

도 10a 및 10b는 유세포 분석에 의해 시험된 B16F10 마우스 흑색종 세포의 표면 상에서 발현된 전장 MICA에 대한 면역화된 마우스의 혈청 내의 MICA α 3 특이적 항체의 결합에 대한 MICA α 3 백신(페리틴 나노입자에 연결되지 않음)의 탈당화된 형태의 효과를 도시하는 일련의 그래프(도 10a), 뿐만 아니라 백신접종시 유도된 IgG의 상이한 서브클래스를 결정하는데 사용된 ELISA 분석으로부터의 결과를 도시하는 그래프(도 10b)이다.

도 11a 및 11b는 MICA α 3 백신 단독(페리틴 융합 없음)이 생체내에서 유의한 치료 이점을 갖는다는 것을 도시하는 일련의 그래프이다. 도 11a는 MICA α 백신 단독의 백신접종 후 폐 전이의 수를 도시하는 그래프이다. 도 11b는 MICA α 백신 단독의 백신접종 후 0일, 5일 및 13일에 혈청 내 sMICA의 양을 도시하는 그래프이다.

도 12a 및 12b는 MICA-페리틴 백신이 B16F10 피하 흑색종 모델에서 종양 성장을 지연시킨다는 것을 나타낸다. 도 12a에서, 7주령 C57BL/6 암컷 마우스(n=8)를 MICA-페리틴 백신으로 면역화시키고 12일에 부스트하였다. 마우스에게 초기 백신접종 후 25일에 MICA를 발현하는 0.5×10^6 B16F10 세포의 피하 주사를 투여하고 종양 부피를 2일마다 측정하였다. MICA-페리틴 면역화된 그룹에서의 종양 성장은 나이브, 처리되지 않은 연령 일치된 대조군(검은색 원)과 비교하여 유의하게 더 느린 것으로 나타났다(흰색 정사각형). 도 12b에서, sMICA 수준은 MICA-페리틴 백신으로 면역화된 마우스(흰색 삼각형)의 혈청에서는 검출불가능한 반면, 비면역화된 대조군(검은색 삼각형)의 혈청에서는 종양 투여 후 2주 이내에 높은 수준의 sMICA가 검출되었다.

도 13a 및 13b는 CD8 T 세포의 고갈이 MICA-페리틴 백신접종된 B16F10 피하 흑색종 모델에서 종양 성장을 가속화한다는 것을 나타낸다. 도 13a에서, 7주령 C57BL/6 암컷 마우스를 MICA-페리틴 백신(n=16) 또는 OVA 대조군 백신(n=8)으로 면역화시키고 14일에 부스트하였다. 마우스에게 초기 백신접종 후 21일에 MICA를 발현하는 0.5×10^6 B16F10 세포의 피하 주사를 투여하였다. 마우스에게 종양 투여 2일 전에 200 μ g의 항-CD8 항체(n=8) 또는 아이소타입 대조군 항체(n=8)의 정맥 내 주사를 투여하고 이후 연구 종점까지 매주 2회 마우스당 100 μ g의 용량으로 투여하였다. 종양 부피를 2일마다 측정하였다. 종양이 $\geq 250 \text{mm}^2$ 에 도달하면 마우스를 안락사시켰다. 종양은 CD8 항체로 처리된 OVA 단백질 백신접종된 대조군 마우스(흰색 삼각형)에서 12일에 그리고 나이브, 처리되지 않은, 비교같은 대조군(검은색 원)에서 14일에 이들의 최대 부피에 도달하였다. CD8 고갈은 아이소타입 항체를 받은 MICA-백신접종된 그룹(흰색 정사각형)과 비교하여 MICA-백신접종된 그룹(검은색 삼각형)에서 종양 성장을 가속화하였다. 도 13b에서, CD8 고갈 실험의 생존 분석은 연령 일치된 나이브, 처리되지 않은, 비교같은 대조군을 굵은 선으로 표시하며, OVA 단백질 백신접종된 그룹을 가는 점선으로 표시하고, MICA-페리틴 백신접종된, CD8 고갈을 굵은 점선으로 표시하며, MICA-페리틴 백신접종된, 아이소타입 항체 주사된 마우스를 가는 선으로 표시한다.

도 14a 및 14b는 NK 세포가 B16F10 피하 흑색종 모델에서 MICA-페리틴 백신의 치료 효과에 기여한다는 것을 나타낸다. 도 14a에서, 7주령 C57BL/6 암컷 마우스를 MICA-페리틴 백신(n=16)으로 면역화시키고 14일에 부스트하였다. 마우스에게 초기 백신접종 후 21일에 MICA를 발현하는 0.5×10^6 B16F10 세포의 피하 주사로 투여하였다. 마우스에게 종양 투여 2일 전에 200 μ g의 항-NK1.1 항체(n=8) 또는 아이소타입 대조군 항체(n=8)의 정맥 내 주사를 투여하고 이후 연구 종점까지 매주 2회 마우스당 100 μ g의 용량으로 투여하였다. 종양 부피를 2일마다 측정하였다. 종양이 $\geq 250 \text{mm}^2$ 에 도달하면 마우스를 안락사시켰다. 종양은 나이브, 처리되지 않은, 비교같은 대조군(검은색 원)에서 14일에 이들의 최대 부피에 도달하였다. NK 세포 고갈은 아이소타입 항체를 받은 MICA-백신접종된 그룹(검은색 정사각형)과 비교하여 MICA-백신접종된 그룹(흰색 삼각형)에서 종양 성장을 가속화하였다. 도 14b에서, NK 세포 고갈 실험의 생존 분석은 연령 일치된 나이브, 처리되지 않은, 비교같은 대조군을 굵은 선으로 표시하며, MICA-페리틴 백신접종된, NK 세포 고갈을 점선으로 표시하며, MICA-페리틴 백신접종된, 아이소타입 항체 주사된 마우스를 가는 선으로 표시한다.

도 15a 및 15b는 MICA-페리틴 백신에 대한 반응으로 생성된 혈청 다클론 항체가 B16F10-MICA 종양 세포의 폐 전이를 예방한다는 것을 나타낸다. 도 15a에서, 8주령 IgM tum1Cgn/J 암컷 마우스(n=12)에게 0.5×10^6 MICA 발현

B16F10 흑색종 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 마우스를 각각 4마리의 마우스를 갖는 3개의 코호트로 무작위 배정하였다. 종양 투여 후 1, 2, 4 및 6일에, 마우스에게 나이브, OVA-단백질 또는 MICA-페리틴 면역화된 C57BL/6 마우스의 $100\mu l$ 의 종점 혈청을 주사하였다. 마우스를 종양 투여 14일 후에 안락사시키고; 폐를 수확하고, 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키고, 폐 전이의 수를 정량화하였다. MICA-페리틴 백신접종된 그룹의 혈청이 주사된 마우스(흰색 정사각형)는 처리되지 않은, 연령 일치된 대조군(검은색 원) 및 OVA-단백질 면역화된 그룹의 혈청이 주사된 마우스와 비교하여 유의하게 더 적은 폐 전이를 가지고 있었다. 도 15b에서, sMICA 수준은 나이브 또는 OVA-단백질 면역화된 그룹의 혈청을 받은 마우스와 비교하여 MICA-페리틴 백신접종된 그룹의 혈청을 받은 마우스(흰색 정사각형)에서 더 낮았다.

도 16a 및 16b는 MICA-페리틴 백신이 또한 B16F10-MICB005 피하 종양 성장을 제어한다는 것을 나타낸다. 도 16a에서, 7주령 C57BL/6 암컷 마우스(n=4)를 MICA-페리틴 백신으로 면역화시키고 14일에 부스트시켰다. 마우스에게 초기 백신접종 후 21일에 MICB를 발현하는 0.5×10^6 B16F10 세포의 피하 주사를 투여하고, 종양 부피를 2일마다 측정하였다. MICA-페리틴 면역화된 그룹에서의 B16F10-MICB 종양 성장은 OVA-단백질 면역화된 대조군(검은색 원)과 비교하여 유의하게 더 느린 것으로 나타났다(흰색 정사각형). 도 16b에서, sMICB 수준은 MICA-페리틴 백신으로 면역화된 마우스(흰색 정사각형)의 혈청에서 거의 검출불가능한 반면, OVA-단백질 면역화된 대조군(검은색 원)의 혈청에서 종양 투여 후 2주 이내에 높은 수준의 sMICB가 검출되었다.

도 17은 메조다공성 실리카 막대(MSR)로 제제화된 MICA-페리틴 백신(점선) 또는 MICA-페리틴(MSR 없음)에 대한 CpG의 직접 접합(가는 실선)으로 면역화된 마우스의 혈청을 이용한 MICA를 발현하는 B16 세포주의 염색을 나타내는 일련의 그래프이다. 이들 데이터는 MICA-페리틴 웨بت아이드에 직접 적합된 CpG의 백신접종이 MSR 스캐폴드로 제제화된 백신보다 MICA 알파 3 도메인에 대해 더 강한 면역 반응을 유도한다는 것을 보여준다. MSR 백신의 경우, 5mg MSR+200ug 단백질+100ug CpG+1ug GM-CSF, 0일에 면역화; 14일에 부스트; 28일부터 혈청. 직접 접합의 경우, ~5ug CpG에 접합된 200ug 단백질(일차 면역화); 부스트(~5ug CpG에 접합된 100ug 단백질 + addavax(100ul) + GM-CSF(1ug)); 0일에 면역화; 21일에 부스트; 28일부터 혈청.

도 18a는 정제된 MICA α3 - 페리틴 나노입자의 전자 현미경 사진이다.

도 18b는 친화성 및 겔 여과 크로마토그래피 후 백신 단백질의 SDS-PAGE의 사진이다.

도 19는 MICA α3 도메인 백신에 의해 유도된 다클론 항체가 인간 종양 세포에 의한 MICA 탈락을 억제한다는 것을 나타내는 그래프이다. 인간 A375 흑색종 세포주에 의한 MICA 탈락을 샌드위치 ELISA를 사용하여 정량화하였다. MICA α3 - 페리틴으로 백신접종된 마우스의 소량의 혈청($1-10\mu l$)의 첨가는 탈락을 강하게 억제한 반면, 대조군 마우스의 혈청의 첨가는 효과가 없었다.

도 20a-20c는 MICA-페리틴 백신이 신생항원(neoantigen)에 대한 2차 T 세포 반응을 유도한다는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. MICB α3 도메인 백신이 종양 신생항원에 대해 2차 반응을 유도하는지 조사하였다. 립프절 T 세포를 CFSE로 표지하고, CD4 T 세포 에피토프로서 B16F10 종양에 대해 이전에 확인된 4개의 상이한 신생항원 웨بت아이드와 함께 3일 동안 배양하였다. CD4 T 세포 반응은 중식 세포(CFSE^{low})에서 세포내 IFN γ 염색에 기초하여 4개의 웨بت아이드 중 3개에 대해 확인되었다. 우리는 MICA 항체가 수지상 세포에 의한 세포사멸 종양 단편의 Fc 수용체 매개 흡수를 촉발함으로써 신생항원에 대한 T 세포 반응을 촉진한다는 가설을 세운다. 도 20a-20b에서, B6 마우스를 MICB α3 - 페리틴 또는 OVA(n=5/그룹)로 면역화시키고 B16F10-MICB 종양 세포를 주사하였다. T 세포를 종양 이식 후 10일에 종양 배수 립프절로부터 단리하고 CFSE로 표지하였다. T 세포를 B16F10 종양에 대해 이전에 확인된 4개의 상이한 CD4 신생항원 웨بت아이드($10\mu g/ml$)의 존재하에 CD11c+ 비장 세포와 함께 3일 동안 배양하였다. 세포내 IFN γ 염색을 수행하고, 세포내 IFN γ에 대해 양성인 중식 T 세포(CFSE-low)를 정량화하였다. 신생항원 웨بت아이드에 대한 T 세포 반응을 OVA 대조군 항원(도 20a) 또는 MICB α3 도메인(도 20b)으로 면역화된 마우스 사이에서 비교하였다. 두 T 세포 집단을 M30 신생항원과 함께 시험관내에서 배양하였다. 도 20c에서, MICB 면역화된 마우스에서 향상된 T 세포 반응이 관찰된 3개의 신생항원(M30, M44 및 M48)에 대한 T 세포 반응의 요약.

도 21a-21b는 CpG와 접합된 MICA-페리틴 나노입자를 이용한 면역화가 높은 역가 항체를 유도한다는 것을 나타내는 그래프이다. 도 21a에서, 짧은 코리 원숭이(macaque) MICA/B-페리틴을 CLICK 화학(단백질-올리고 접합 키트, Solulink)에 의해 CpG ODN 1826에 접합시켰다. 간략하게, S-HyNic(석신이미딜-6-하이드라지노-니코틴아미드) 링커를 리신 상의 일차 아민을 통해 단백질에 접합시키고 S-4B(석신이미딜-4-포르밀벤즈아미드) 링커를 CpG 올리고에 첨가하였다. 변형된 단백질 및 올리고를 촉매화된 접합 반응에서 배양하였다. 이 반응 후, 과량의 비접합

된 CpG를 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 형성된 단백질-올리고 접합체 결합(안정적인, 비스-아릴하이드라존 결합)은 350nm에서 UV 추적가능하다(그래프 참고). 도 21b에서, CpG 접합된 단백질을 사용하여 C57BL/6 마우스를 면역화시켰다. 혈청 내의 MICA/B 특이적 항체를 B16-MICA 세포를 표지화하여 14일에 분석하였다. CpG 연결된 단백질은 스캐폴드로 제제화된 MICA-페리틴 단백질(점선; 굵은 선은 백그라운드 염색 수준을 나타냄)과 비교하여 더 높은 역가 항체(가는 선)을 유도하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

본 발명은 암을 위한 백신을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 MIC 알파 3-도메인에 대해 면역 반응을 유발할 수 있는 MIC 알파 3-도메인 백신을 제공한다. 중요하게도, 백신은 MIC α3 도메인에 대해 항체를 유발하지만, α1-α2 도메인이 NK 세포 상의 NKG2D 수용체에 결합하는 것을 방해하지 않도록, MIC의 α1-α2 도메인에 대해 항체를 유발하지 않는다.

[0023]

백신의 목적은 MICA의 막-근접 Ig 도메인에 결합하고 종양 세포로부터 이 단백질의 단백분해 탈락(proteolytic shedding)을 억제하는 다클론 항체를 유도하는 것이다. MICA 알파 3 도메인은 나노입자의 표면상에서 발현되었다. 구체적으로, 페리틴이 자발적으로 나노입자를 형성한다는 것을 고려하여, MICA 알파 3 도메인 코딩 서열은 페리틴 서열(*H. pylori* 유래)에 융합되었다. 백신은 보조체로서 CpG 및 수지상 세포를 주사 부위로 모집하기 위한 GM-CSF를 사용하여 면역화 스캐폴드(메조다공성 실리카 막대)로 제제화되거나 또는 CpG를 MICA 알파 3 도메인-페리틴 융합 단백질 및 GM-CSF에 직접 접합하여 제제화되었다. 이들 백신의 주사는 MICA 알파 3 도메인에 대해 높은 역가 항체를 유도한 것으로 밝혀졌다. 놀랍게도, CpG가 직접 접합된 MICA 알파 3 도메인-페리틴 융합 단백질은 더 높은 항체 역가를 달성하였다.

[0024]

본 발명의 백신 조성물에 의해 유도된 이들 항체는 다수의 MICA 대립유전자에 결합하였고, MICA 양성인 종양 세포를 염색하였다. 중요하게도, 이들 다클론 항체는 종양 세포에 의한 MICA의 탈락을 억제하였다. 백신의 생체내 효능을 흑색종의 전이성 마우스 모델에서 시험하였다. B16F10 흑색종 세포를 MICA를 발현하도록 유전적으로 변형시키고, 마우스에게 2회 백신 접종한 후 정맥내로 주사하였다. 백신은 높은 수준의 예방을 제공한 반면, 대조군 마우스는 많은 수의 폐 전이(~150-200)를 가지고 있었다.

[0025]

본 발명의 백신은 특정 항원을 발현하는 모든 암세포를 제거하는 면역반응을 유도하고자 시도하는 종래의 암 백신과 개념적으로 상이하다. 대조적으로, 본 발명의 백신의 목적은 중요한 면역 감시 경로로부터 종양 회피를 방지하는 것이다. 이 백신은 MICA 항체를 갖는 환자의 연구 및 MIC 발현이 세포독성 림프구에 의한 제거를 위해 세포를 표시한다는 사실에 근거하여 안전할 것이다. 백신 접근법의 이점은 백신의 낮은 비용, 면역 감시로부터의 회피에 대한 장기간 예방, 면역 복합체의 형성에 의해 탈락을 억제하고 탈락된 MIC를 빠르게 제거하는 다클론 항체의 유도 및 수지상 세포에 의한 세포자멸사 종양 단편의 향상된 흡수에 의한 다른 종양 항원에 대한 T 세포 반응의 유도이다.

[0026]

또한 MICA 알파 3 도메인의 면역원성 부분을 그들의 표면상에 표시하는 자기조립성 페리틴계 나노입자가 본 발명에 의해 제공된다. 선택적으로, 나노입자는 CpG 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 예를 들어, CpG 올리고뉴클레오타이드는 MICA 알파 3 도메인-페리틴 융합 단백질에 공유 결합된다. 이러한 나노입자는 개체에게 백신을 접종하는데 유용하다. 따라서, 본 발명은 또한 이러한 나노입자를 생산하기 위한 융합 단백질 및 이러한 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 나노입자를 생산하는 방법, 및 이러한 나노입자를 사용하여 개체에게 백신을 접종하는 방법에 관한 것이다.

[0027]

또한, CpG 올리고뉴클레오타이드에 연결된 MIC 알파 3-도메인 웨타이드를 포함하는 백신 조성물이 본 발명에 의해 제공된다.

[0028]

MIC 알파3 도메인 단백질에 대한 백신

[0029]

본 발명은 면역원성 성분으로서 적어도 하나의 MIC 알파 3-도메인 웨타이드를 포함하는 인간에게 투여하는데 적합한 백신 조성물을 제공한다. MIC 알파 3-도메인 웨타이드는 MICA 또는 MICB의 전장 알파 3 도메인을 포함하거나 이로 구성되며, 이 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 181 내지 274에 해당한다. 선택적으로, 상기 웨타이드는 하나 이상의 측접(flanking) 아미노산을 포함한다. 이 문맥에서, 용어 "측접 아미노산"은 전장 참고 서열 [MICA의 경우 서열번호 1 또는 MICB의 경우 서열번호 2]에서 MIC 알파 3-도메인 서열에 인접한 아미노산을 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 웨타이드는 그의 N- 또는 C-말단, 또는 모두 상에 2, 4, 6, 8, 또는 10개의 측접 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 백신 웨타이드는 당화되지 않는다.

MICA 의 아미노산 서열
HSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKP QGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHKDQKEGL HSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEEWTVPQS SRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLES SVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQD GVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYME HSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAAAIFVIIIFYV RCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMS ALGSTGSTEAGA (서열번호 1)

MICB 의 아미노산 서열
PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRA KPQGQWAEDVLGAKTWDTETEDELTENGQDLRRTLTHIKDQKG GLHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYDGEFLSQNLETQESTVP QSSRAQTLAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRY LKSGVAIRRTPVPPMVNVTCSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTW RQDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCY MEHSGNHGTHPVPMSGKALVLQSQRTDFPYVSAAMPCFVIIILCVP CCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTGDHRDAAGLGFQPLMSA TGSTGSTEAGA (서열번호 2)

[0030]

바람직한 구현예에서, 백신은 하기의 아미노산 서열을 갖는 웨타이드를 포함한다:

RTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPD
GNGTYQTWVATRIS QGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFH
(서열번호 3) 또는

RTVPPMVQVTRSEASEGQITVTCRASGFYPWNINLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPD
GNGTYQTWVA TRISQGEEQRFTCYMEHSGQHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFH

[0032]

또 다른 구현예에서, 백신 조성물은 MIC 알파 3-도메인 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다. 핵산은 발현 벡터, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태일 수 있거나, 또는 핵산은 나노입자 내로 패키징될 수 있다. 일 구현예에서, 핵산은 주사에 의해 대상에게 전달된다. 일 구현예에서, 핵산은 정제된 DNA로서 또는 나노입자의 형태로 주사된다. 일 구현예에서, 핵산을 발현하기 위해 변형된 변형된 면역 세포가 주사된다. 일 구현예에서, 면역 세포는 핵산을 포함하는 벡터를 이용하여 시험관내에서 형질감염 또는 감염을 통해 변형된다.

[0034]

본 발명의 백신 조성물을 형성하거나 이에 포함된 웨타이드는, 화학적으로 합성되는 경우, 바람직하게는 오염성 화학 전구체로부터 정제되거나, 또는 이들이 유래된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질이 실질적으로 없다. 특정 구현예에서, 웨타이드는 오염성 화학 전구체, 단백질, 지질 또는 핵산의 60%, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 없다. 바람직한 구현예에서, 웨타이드는 오염성 바이러스가 실질적으로 없다. 바람직하게는, 대상에게 투여하기 위한 각 조성물은 오염성 바이러스가 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 없다.

[0035]

일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물의 MIC 알파 3-도메인 웨타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 181 내지 274를 포함하는 웨타이드와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 하나 이상의 웨타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 이 문맥에서, 용어 "유사한"은 참고 서열 대비 질의(query) 서열 내의 보존적 및 비보존적 아미노산 변화의 수에 따라 정의되는 아미노산 서열 유사성을 지칭한다. 보존적 및 비보존적 아미노산 변화는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[W. R. Taylor, The Classification of Amino Acid Conservation, J. Theor. Biol. 1986 119:205-218, and D. Bordo and P. Argos, Suggestions for "Safe"

Residue Substitutions in Site-Directed Mutagenesis, 1991 J. Mol. Biol. 217:721-729]을 참고한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 변화는, 특히 아미노산 측쇄에 관하여, 하나의 아미노산을 실질적으로 유사한 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 비보존적 변화는 하나의 아미노산을 실질적으로 상이한 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 일반적으로, 보존적 치환은 폴리펩타이드의 전체 구조 또는 생물학적 기능에 영향을 미치지 않을 가능성이 있다고 당업계에 인식되는 것인데 반해, 비보존적 변화는 구조 및 기능에 영향을 미칠 가능성이 높은 것으로 인식된다.

[0036] 보존적 아미노산 변화의 비제한적인 예는 하기 그룹 내의 아미노산의 치환을 포함한다: 지방족, 방향족, 극성, 비극성, 산성, 염기성, 인산화가능한(phosphorylatable) 소수성, 친수성, 작은 비극성, 작은 극성, 큰 비극성, 및 큰 극성. 비보존적 아미노산 변화의 비제한적인 예는 전술한 그룹 사이의 아미노산의 치환을 포함한다.

[0037] 일 구현예에서, 보존적 아미노산 변화는 잔기의 쌍에 대한 치환 매트릭스가 양의 값을 갖는 치환이다. 아미노산 치환 매트릭스의 예는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 BLOSUM50 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스이다(W. A. Pearson, Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA, Meth. Enzymology, 1990 183:63-98, ed. R. Doolittle, Academic Press, San Diego 참고). 스코어링 매트릭스 및 이를 사이의 비교의 추가 예를 위해, 문헌[M. S. Johnson and J. P. Overington, 1993, A Structural Basis for Sequence Comparisons: An Evaluation of Scoring Methodologies, J. Mol. Biol. 233:716-738]을 참고한다.

[0038] 바람직한 구현예에서, 보존적 아미노산 변화는 하나의 아미노산을 동일한 화학적 그룹 내의 또 다른 아미노산으로 치환하는 것이며, 그룹은 중성 및 극성 아미노산(Ser, Thr, Pro, Ala, Gly, Asn, Gln), 음전하 및 극성 아미노산(Asp, Glu), 양전하 및 극성 아미노산(His, Arg, Lys), 고리 구조가 결여된 비극성 아미노산(Met, Ile, Leu, Val), 고리 구조를 갖는 비극성 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 및 시스테인으로부터 선택된다.

[0039] 다양한 구현예에서, 펩타이드는 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열에 접합된다.

[0040] 다른 구현예에서, 펩타이드는 캐리어 단백질에 접합된다. 용어 "캐리어 단백질"은 작은 펩타이드 및 큰 폴리펩타이드(>10 kDa) 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 캐리어 단백질은 임의의 펩타이드 또는 단백질일 수 있다. 그것은 하나 이상의 T-헬퍼 에피토프를 포함할 수 있다. 캐리어 단백질은 파상풍 특소이드(TT), 파상풍 특소이드 단편 C, 파상풍 독소의 비독성 돌연변이체[TT의 모든 이러한 변이체는 본 발명의 목적을 위해 동일한 유형의 캐리어 단백질임 것으로 간주됨에 유의함], N19와 같은 파상풍 독소 T-세포 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드 (WO 제2006/067632호), 디프테리아 특소이드(DT), CRM197, 디프테리아 독소의 다른 비독성 돌연변이체, 예컨대 CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45(Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 및 CRM107 및 문헌[Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에서 Nicholls 및 Youle에 의해 기술된 다른 돌연변이; Glu-148의 결실 또는 Glu-148에서 Asp, Gln 또는 Ser으로 돌연변이 및/또는 Ala 158의 결실 또는 Ala 158에서 Gly로의 돌연변이 및 미국 특허 제4,709,017호 또는 제4,950,740호에 개시된 다른 돌연변이; 적어도 하나 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534 중 적어도 하나의 돌연변이 및 미국 특허 제5,917,017호 또는 제6,455,673호에 개시된 다른 돌연변이; 또는 미국 특허 제5,843,711호에 개시된 단편](DT의 모든 이러한 변이체는 본 발명의 목적을 위해 동일한 유형의 캐리어 단백질임에 유의한다), 폐렴구균 뉴모라이신(pneumolysin)(Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), OMPC(수막구균 외막 단백질—일반적으로 *N. meningitidis* serogroup B로부터 추출됨—EP 제0372501호), 합성 펩타이드(EP 제0378881호, EP 제0427347호), 열 충격 단백질(WO 제93/17712호, WO 제94/03208호), 백일해 단백질 (WO 제98/58668호, EP 제0471177호), 사이토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬(WO 제91/01146호), 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다수의 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질(Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), 예컨대 N19 단백질(Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) 폐렴구균 표면 단백질 PspA(WO 제02/091998호), 철 흡수 단백질(WO 제01/72337호), *C. difficile*의 독소 A 또는 B(WO 제00/61761호), *H. influenzae* 단백질 D(EP 제594610호 및 WO 제00/56360호), 폐렴구균 PhtA(WO 제98/18930호, Sp36으로도 지칭됨), 폐렴구균 PhtD(WO 제00/37105호 개시되며, Sp036D로도 지칭됨), 폐렴구균 PhtB(WO 제00/37105호에 개시되며, Sp036B로도 지칭됨), 또는 PhtE(WO 00030299호에 개시되며 BVH-3으로 지칭됨)일 수 있다.

[0041] 일 구현예에서, 캐리어 단백질은 파상풍 특소이드(TT), 파상풍 특소이드의 단편, 디프테리아 특소이드(DT), CRM197, 뉴모라이신(pneumolysin)(Ply), 단백질 D, PhtD, PhtDE 및 N19로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구현예에서 캐리어 단백질은 CRM197이다.

[0042] HA-폐리틴 융합 단백질을 포함하는 백신

- [0043] 본 발명자들은 MIC 알파 3-도메인 웹타이드와 페리틴 단백질의 융합(MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질)이 암에 대해 견고한 면역 반응을 유발하는 백신을 생성한다는 것을 발견하였다. 이러한 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 이들의 표면 상에 MIC 알파 3-도메인 웹타이드의 면역원성 부분을 나타내는 나노입자로 자기조립된다. 이를 나노입자는 MIC 알파 3-도메인에 대해 개체에게 백신을 접종하는데 유용하다. 따라서, 본 발명의 일 구현에는 본원에 개시된 MIC 알파 3-도메인 웹타이드에 연결된 본원에 개시된 단량체성 페리틴 서브유닛을 포함하는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질이다. MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 나노입자로 자기조립될 수 있다. 다양한 양태에서, 융합 단백질은 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. CpG 올리고뉴클레오타이드 서열은 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질에 공유 결합될 수 있다.
- [0044] 페리틴은 모든 동물, 박테리아, 및 식물에서 발견되는 구형 단백질로서, 수화된 철 이온 및 양성자를 미네랄화된 코어로 그리고 미네랄화된 코어로부터 수송하여 다헥 $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ 형성의 속도 및 위치를 제어하는 역할을 주로 한다. 구형 형태의 페리틴은 약 17-20 kDa의 분자량을 갖는 폴리펩타이드인 단량체성 서브유닛 단백질(단량체성 페리틴 서브유닛으로도 지칭됨)로 구성된다. 각각의 단량체성 페리틴 서브유닛은 4개의 역평행 나선 모티프를 포함하는 나선 다발의 위상기하학(topology)을 가지며, 5번째의 더 짧은 나선(c-말단 나선)은 4개의 나선 다발의 장축에 대략 수직으로 놓여 있다. 관례에 따르면, 나선은 N-말단으로부터 각각 'A, B, C, 및 D & E'로 명명된다. N-말단 서열은 캡시드 3겹 축에 인접하여 놓여 있으며 표면으로 확장하는 반면, E 나선은 입자 코어 내로 확장하는 C-말단과 함께 4겹 축에서 팩킹된다. 이 팩킹의 결과로 캡시드 표면상에 2개의 구멍이 생긴다. 이 구멍 중 하나 또는 둘 모두는 수화된 철이 캡시드 내외로 확산되는 지점을 나타낼 것으로 예상된다. 생산 후, 이들 단량체성 페리틴 서브유닛 단백질은 구형 페리틴 단백질로 자기조립된다. 따라서, 구형 형태의 페리틴은 24개의 단량체성, 페리틴 서브유닛 단백질을 포함하고, 432 대칭을 갖는 캡시드 유사 구조를 갖는다.
- [0045] 본 발명에 따르면, 본 발명의 단량체성 페리틴 서브유닛은 페리틴 단백질의 전장의 단일 폴리펩타이드, 또는 이의 임의의 부분이며, 이는 단량체성 페리틴 서브유닛을 구형 형태의 단백질로 자기조립하는 것을 유도할 수 있다. 임의의 공지된 페리틴 단백질의 단량체성 페리틴 서브유닛의 아미노산 서열은, 단량체성 페리틴 서브유닛이 그 표면 상에 MIC 알파 3-도메인을 나타내는 나노입자로 자기조립할 수 있는 한, 본 발명의 융합 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 단량체성 서브유닛은 박테리아 페리틴 단백질, 식물 페리틴 단백질, 조류(algal) 페리틴 단백질, 곤충 페리틴 단백질, 진균 페리틴 단백질 및 포유동물 페리틴 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 페리틴 단백질 유래이다. 일 구현예에서, 페리틴 단백질은 헬리코박터 파일로리 유래이다.
- [0046] 본 발명의 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 페리틴 단백질의 단량체성 서브유닛 폴리펩타이드의 전장 서열을 포함할 필요는 없다. 단량체성 페리틴 서브유닛 단백질의 부분, 또는 영역은, 상기 부분이 단량체성 페리틴 서브유닛을 구형 형태의 단백질로 자기조립하는 것을 유도하는 아미노산 서열을 포함하는 한, 이용될 수 있다. 이러한 영역의 한 가지 예는 헬리코박터 파일로리 페리틴 단백질의 아미노산 5 및 167 사이에 위치한다. 보다 구체적인 영역은 문헌[Zhang, Y. Self-Assembly in the Ferritin Nano-Cage Protein Super Family. 2011, Int. J. Mol. Sci., 12, 5406-5421]에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 참고로 본원에 포함되어 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구현에는 단량체성 페리틴 서브유닛으로부터 적어도 25개의 인접 아미노산, 적어도 50개의 인접 아미노산, 적어도 75개의 인접 아미노산, 적어도 100개의 인접 아미노산, 또는 적어도 150개의 인접 아미노산에 연결된 본 발명의 MIC 알파 3-도메인 단백질을 포함하는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질이며, MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 나노입자로 자기조립될 수 있다. 본 발명의 일 구현에는 단량체성 서브유닛을 구형 형태의 페리틴 단백질로 자기조립하는 것을 유도하는 헬리코박터 파일로리 페리틴 단량체성 서브유닛의 아미노산 서열에 상응하는 페리틴 단백질의 영역으로부터 적어도 25개의 인접 아미노산, 적어도 50개의 인접 아미노산, 적어도 75개의 인접 아미노산, 적어도 100개의 인접 아미노산, 또는 적어도 150개의 인접 아미노산에 연결된 본 발명의 MIC 알파 3-도메인 단백질을 포함하는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질이며, MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 나노입자로 자기조립될 수 있다.
- [0048] 단백질의 활성에 영향을 미치지 않으면서 단백질의 아미노산 서열에 일부 변이가 이뤄질 수 있음이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 변이는 아미노산 잔기의 삽입, 아미노산 잔기의 결실, 및 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 단량체성 페리틴 서브유닛의 서열은 포유동물에서 자연적으로 발견되는 페리틴 서브유닛의 서열과 충분히 다르므로, 변이체 단량체성 페리틴 서브유닛이 포유동물 내로 도입될 때, 포유동물의 천연 페리틴 단백질과 반응하는 항체를 생산하지 않는다. 본 발명에 따르면, 이러한 단량체성 서브유닛은 면역원성으로 중성인 것으로 지정된다. 본 발명의 일 구현에는 단량체성 페리틴 서브유닛이 구형 형태의 단백질로 자기조립되는 것을 유도하는 역할을 하는 단량체성 페리틴 서브유닛의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도

85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 및 적어도 97% 동일한 아미노산 서열에 연결된 본 발명의 MIC 알파 3-도메인 단백질을 포함하는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질이며, MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 나노입자로 자기조립될 수 있다. 일 구현예에서, HA-페리틴 융합 단백질은 단량체성 페리틴 서브유닛과 서열이 동일한 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예는 헬리코박터 파일로리로부터의 단량체성 페리틴 서브유닛의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 및 적어도 97% 동일한 아미노산 서열에 연결된 본 발명의 MIC 알파 3-도메인 단백질을 포함하는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질이며, MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 나노입자로 자기조립될 수 있다.

[0049] 일부 구현예에서, 본 발명의 단백질의 아미노산 서열 내로 돌연변이를 조작하는 것이 유용할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질에 유익한 특성(예컨대, 용해도, 반감기, 면역 감시로부터 단백질의 마스크 부분)을 제공하기 위해, 단량체성 페리틴 서브유닛 내의 효소 인식 부위 또는 당화 부위와 같은 부위, 삼량체화 도메인, 또는 링 커 서열을 변경하는 것이 유용할 수 있다. 이와 관련하여, 페리틴의 단량체성 서브유닛은 자연적으로 당화되지 않은 것으로 알려져 있다. 그러나, 그것은 포유동물 또는 효모 세포에서 분비된 단백질로서 발현되는 경우 당화될 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 단량체성 페리틴 서브유닛으로부터의 아미노산 서열 내의 잠재적인 N-연결된 당화 부위는 돌연변이된 페리틴 서브유닛 서열이 돌연변이된 부위에서 더 이상 당화되지 않도록 돌연변이된다.

[0050] 본 발명의 단백질은 본 발명의 핵산 분자에 의해 코딩된다. 또한, 이들은 본 발명의 핵산 구조물에 의해 발현된다. 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 구조물은 재조합 발현 벡터, 즉, 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 연결된 벡터이므로, 핵산 구조물이, 예를 들어, 대상 또는 장기, 조직 또는 세포에 투여될 때 핵산 분자는 단백질의 발현을 달성할 수 있다. 벡터는 또한 비제한적으로 유기체, 조직, 또는 세포 배양과 같은 환경 내에서 핵산 분자를 세포에 수송할 수 있다. 본 개시내용의 핵산 구조물은 인간 개입에 의해 생성된다. 핵산 구조물은 DNA, RNA 또는 이의 변이체일 수 있다. 벡터는 DNA 플라스미드, 바이러스 벡터, 또는 다른 벡터일 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 사이토메갈로바이러스(CMV), 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시나 바이러스, 폴리오바이러스, 신드비스 바이러스, 또는 임의의 다른 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터일 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 의사형(pseudotyped) 랜티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 DNA 플라스미드일 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 핵산 분자 전달 및 발현을 가능하게 하는 바이러스 성분 및 플라스미드 성분을 포함하는 DNA 플라스미드일 수 있다. 본 개시내용의 핵산 구조물의 제작 방법은 널리 알려져 있다. 예를 들어, 문현[Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3.sup.rd edition, Sambrook et al. 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press, and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1994]을 참고한다. 일 구현예에서, 벡터는 DNA 플라스미드, 예컨대 CMV/R 플라스미드, 예컨대 CMV/R 또는 CMV/R 8 KB(또한 본원에서 CMV/R 8 kb로도 지칭됨)이다. CMV/R 및 CMV/R 8 kb의 예는 본원에 제공되어 있다. CMV/R은 또한 2006년 8월 22일에 발행된 미국 특허 제7,094,598호 B2에 기재되어 있다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 분자는 본 발명의 MIC 알파 3-도메인 웹타이드 면역원, 페리틴 단량체성 서브유닛, 및/또는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 핵산 분자는 재조합으로, 합성으로, 또는 재조합 및 합성 절차의 조합에 의해 생산될 수 있다. 본 개시내용의 핵산 분자는 야생형 핵산 서열 또는, 예를 들어, 인간 면역 시스템에 의해 더 잘 인식되는 코돈을 포함하기 위해 코돈 변형 핵산 서열을 가질 수 있다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 N-연결된 당화 부위를 코딩하는 코돈을 도입하는 것과 같이 상이한 아미노산 코딩하는 코돈을 도입하거나 제거하도록 유전적으로 조작될 수 있다. 본 개시내용의 핵산 분자를 생산하는 방법은, 특히 핵산 서열이 공지되면, 당업계에 널리 알려져 있다. 핵산 구조물은 하나의 핵산 분자 또는 둘 이상의 핵산 분자를 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한 핵산 분자는 하나의 단백질 또는 둘 이상의 단백질을 코딩할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0052] 일 구현예에서, 페리틴의 단량체성 서브유닛은 헬리코박터 파일로리의 페리틴 단백질로부터 유래된다.

[0053] 또한 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 변이체인 핵산 서열이 본 발명에서 구현된다. 이러한 변이체는 나노입자로 자기조립되는 본 발명의 융합 단백질의 능력에 영향을 미치지 않거나, 융합 단백질의 MIC 알파 3-도메인 부분이 MIC 알파 3-도메인 단백질에 대해 면역 반응을 유발하는 융합 단백질의 MIC 알파 3-도메인 부분의 능력에 유의하게 영향을 미치지 않는 한, 뉴클레오타이드 삽입, 결실, 및 치환을 포함한다.

[0054] 또한 본 발명의 융합 단백질을 생산하기 위한 발현 시스템이 본 발명에 포함된다. 일 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 본원에 사용된 바와 같이, 작동가능하게 연결된다는 것은 연결된

핵산 분자에 의해 코딩된 단백질이 연결된 프로모터가 활성화될 때 발현될 수 있다는 것을 의미한다. 본 발명을 실시하는데 유용한 프로모터는 당업계에 알려져 있다. 본 발명의 일 구현예는 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 재조합 세포이다. 본 발명의 일 구현예는 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 재조합 바이러스이다.

[0055] 상기에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 페리틴 융합 단백질의 재조합 생산은 기술분야에서 현재 공지된 임의의 적합한 종래의 재조합 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 재조합 MIC 알파 3-도메인 단백질과 같은 적합한 단백질을 갖는 페리틴과 같은 융합 단백질을 분자 클로닝하는 것은, 적합한 단량체성 서브유닛 단백질, 예컨대 헬리코박터 과일로리 페리틴 단량체성 서브유닛을 갖는 대장균(*E. coli*)에서의 발현을 통해 수행될 수 있다. 이후, 구조물은 단백질 발현 세포 내로 형질전환되고, 적합한 크기로 성장되고, 융합 단백질을 생산하도록 유도될 수 있다.

[0056] 기술된 바와 같이, 본 발명의 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질은 페리틴의 단량체성 서브유닛을 포함하기 때문에, 이들은 자기조립될 수 있다. 본 발명에 따르면, 이러한 자기조립으로부터 생성된 초분자(supramolecule)는 MIC 알파 3 발현 페리틴계 나노입자로 지칭된다. 논의의 편의를 위해, MIC 알파 3 발현 페리틴계 나노입자는 간단히 나노입자(np)로 지칭될 것이다. 본 발명의 나노입자는 전술한 페리틴 단백질과 동일한 구조적 특징을 갖는다. 즉, 이들은 24개의 서브유닛을 함유하고 432개 대칭을 갖는다. 본 발명의 나노입자의 경우, 서브유닛은 MIC 알파 3-도메인 단백질에 연결된 페리틴 단량체성 서브유닛을 포함하는 융합 단백질이다. 이러한 나노입자는 그 표면 상에 MIC 알파 3-도메인 단백질의 적어도 일부를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 일 구현예는 MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질을 포함하는 나노입자이며, 융합 단백질은 MIC 알파 3-도메인 단백질에 연결된 단량체성 페리틴 서브유닛을 포함한다. 일 구현예에서, 나노입자는 8면체이다.

[0057] MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질 및 본 발명의 나노입자는 MIC 알파 3-도메인 단백질에 대한 면역 반응을 유발할 수 있기 때문에, 이들은 암을 치료하는 백신으로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 백신은 MIC 알파 3-도메인 웨타이드 면역원, MIC 알파 3-페리틴 융합 단백질, 또는 본 발명의 나노입자일 수 있다. 본 발명의 백신은 또한 보조제, 완충제 등과 같은 다른 성분을 함유할 수 있다. 임의의 보조제가 사용될 수 있지만, 바람직한 구현예는 화학적 보조제, 예컨대 인산 알루미늄, 염화 벤지알코늄 우베니멕스, 및 QS21; 유전적 보조제, 예컨대 IL-2 유전자 또는 이의 단편, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF) 유전자 또는 이의 단편, IL-18 유전자 또는 이의 단편, 케모카인(C-C 모티프) 리간드 21(CCL21) 유전자 또는 이의 단편, IL-6 유전자 또는 이의 단편, CpG, LPS, TLR 작용제, 및 다른 면역 자극 유전자; 단백질 보조제, 예컨대 IL-2 또는 이의 단편, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF) 또는 이의 단편, IL-18 또는 이의 단편, 케모카인(C-C 모티프) 리간드 21(CCL21) 또는 이의 단편, IL-6 또는 이의 단편, CpG, LPS, TLR 작용제 및 다른 면역 자극 사이토카인 또는 이의 단편; 지질 보조제, 예컨대 양이온성 리포좀, N3(양이온성 지질), 모노포스포릴 지질 A(MPL1); 다른 보조제, 예컨대 콜레라 독소, 엔테로독소, Fms-유사 티로신 키나아제-3 리간드(Flt-3L), 부피바카인, 마르카인, 및 레바미술을 함유할 수 있다.

메조다공성 실리카

[0059] 본 발명에 따른 백신 조성물은 면역화 스캐폴드(immunization scaffold)를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 면역화 스캐폴드는 메조다공성 실리카 나노입자(MSR)이다. MSR은 막대, 구, 와이어, 큐브, 또는 다면체와 같은 임의의 모양 또는 형태일 수 있다. MSR의 모양 및 형태는 전형적으로 특정 반응 조건의 결과이다. 예를 들어, 메조다공성 실리카 나노입자는 테트라에틸 오르토실리케이트를 미셀 막대로 만들어진 주형과 반응시키는 것과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 합성될 수 있다. 결과는 규칙적인 배열의 구멍으로 채워진 나노크기 구 또는 막대의 집합이다. 이후, 주형은 적절한 pH로 조정된 용매로 세척함으로써 제거될 수 있다. 또 다른 기술에서, 메조다공성 입자는 간단한 줄-겔 방법 또는 분무 건조 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 테트라에틸 오르토실리케이트는 또한 추가의 중합체 단량체(주형으로서)와 함께 사용된다. 다른 방법은 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제20150072009호, 제20120264599호 및 제20120256336호에 기재된 것을 포함한다.

과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF)

[0061] 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF)는 대식세포, T 세포, 비만 세포, 내피 세포 및 섬유아세포에 의해 분비된 단백질이다. 구체적으로, GM-CSF는 백혈구 성장 인자로서 기능하는 사이토카인이다. GM-CSF는 줄기 세포를 자극하여 과립구 및 단핵구를 생산한다. 단핵구는 혈류를 빠져나가, 조직으로 이동한 다음, 대식세포로 성숙된다.

[0062] 본원에 기재된 스캐폴드 장치는 GM-CSF 폴리펩타이드를 포함하고 방출하여 숙주 DC를 장치로 끌어당긴다. 고려

된 GM-CSF 폴리펩타이드는 내인성 공급원으로부터 분리되거나 또는 생체내 또는 시험관내에서 합성된다. 내인성 GM-CSF 폴리펩타이드는 건강한 인간 조직으로부터 단리된다. 합성 GM-CSF 폴리펩타이드는 주형 DNA를 숙주 유기체 또는 세포, 예컨대 포유동물 또는 배양된 인간 세포주 내로 형질침염 또는 형질전환한 후 생체내에서 합성된다. 대안적으로, 합성 GM-CSF 폴리펩타이드는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 다른 당업계에서 인정된 방법(예컨대, 참고로 본원에 포함된, Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989))에 의해 시험관내에서 합성된다.

[0063] GM-CSF 폴리펩타이드는 생체내에서 단백질 안정성을 증가시키기 위해 변형된다. 대안적으로, GM-CSF 폴리펩타이드는 어느 정도 면역원성이 되도록 조작된다. 내인성 성숙한 인간 GM-CSF 폴리펩타이드는, 보고에 따르면, 아미노산 잔기 23(류신), 27(아스파라긴), 및 39(글루탐산)에서 당화된다(미국 특허 제5,073,627호 참고). 본 발명의 GM-CSF 폴리펩타이드는 당화 상태와 관련하여 이들 아미노산 잔기 중 하나 이상에서 변형된다.

[0064] GM-CSF 폴리펩타이드는 재조합이다. 대안적으로, GM-CSF 폴리펩타이드는 포유동물 GM-CSF 폴리펩타이드의 인간화된 유도체이다. GM-CSF 폴리펩타이드가 유래되는 예시적인 포유동물 종은, 비제한적으로, 마우스, 랫트, 햄스터, 기니어 피그, 페럿(ferret), 고양이, 개, 원숭이, 또는 영장류를 포함한다. 바람직한 구현예에서, GM-CSF는 재조합 인간 단백질(PeproTech, Catalog #300-03)이다. 대안적으로, GM-CSF는 재조합 쥐과(마우스) 단백질(PeproTech, Catalog #315-03)이다. 마지막으로, GM-CSF는 재조합 마우스 단백질의 인간화된 유도체이다.

[0065] 인간 재조합 GM-CSF(PeproTech, Catalog #300-03)는 하기 폴리펩타이드 서열에 의해 코딩된다:

[0066] MAPARSPSPS TQPWEHVNAI QEARRLLNLS RDTAAEMNET VEVISEMFDL QEPTCLQTRL ELYKQGLRGS LTKLGPLTM MASHYKQHCP PTPETSCATQ IITFESFKEN LKDFLLVIPF DCWEPVQE (서열번호 26)

[0067] 쥐과 재조합 GM-CSF(PeproTech, Catalog #315-03)는 하기 폴리펩타이드 서열에 의해 코딩된다:

[0068] MAPTRSPITV TRPWKHVEAI KEALNLLDDM PVTLNEEVEV VSNEFSFKKL TCVQTRLKIF EQGLRGNFTK LKGALNMTAS YYQTYCPPTP ETDCETQVTT YADFIDSLKT FLTDIPFECK KPVQK (서열번호 27)

[0069] 인간 내인성 GM-CSF는 하기 mRNA 서열(NCBI 등록번호 NM_000758 및 서열번호 28)에 의해 코딩된다:

```
acacagagag aaaggctaaa gttctctgga ggatgtggct gcagagcctg ctgctcttgg 61
gcactgtggc ctgcagcatc tctgcacccg cccgctcgcc cagccccagc acgcagccct 121
gggagcatgt gaatgcccattc caggaggccc ggctgttcctt gaacctgagt agagacactg 181
ctgtctgatgtt gaatgaaaca gtagaaagtca tctcagaaat gtttgcaccc caggagccga 241
cctgcctaca gacccgcctg gagctgtaca agcaggccct gccccccagc ctcaccaagc 301
tcaaggggccc cttgaccatg atggccagcc actacaagca gcactgcctt ccaacccccc 361
aaacttcctt tgcaacccag attatcacct ttgaaagttt caaaagagaac ctgaaggact 421
ttctgttgtt catccccctt gactgctggg agccagtcca ggagtggagcc cgcccatgt 481
aggctggcca agccggggag ctgctcttc atgaaacaag agctagaaac tcaggatgg 541
catcttgag ggaccaaggg gtggccaca gccatggtgg gaggccctg gacccctt 601
ggccacact gaccctgata caggcatggc agaagaatgg gaatattta tactgacaga 661
aatcaaat atttatatat ttatattttt aaaatattta ttatattttt tatttaagtt 721
catattccat atttattcaa gatgtttac cgtaataatt attttaaaa atatgcttct 781 a
```

[0070] (서열번호 28)

[0071] 인간 내인성 GM-CSF는 하기 아미노산 서열(NCBI 등록번호 NP000749.2 및 서열번호 29)에 의해 코딩된다:

[0072] MWLQSLLLGTVACSIAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDT

[0073] AAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRL ELYKQGLRGS LTKLGPLTM

[0074] ASHYKQHCPPTPETSCATQI ITFESFKEN LKDFLLVIPF DCWEPVQE (서열번호 29)

[0075] 시토신-구아노신(CpG) 올리고뉴클레오타이드(CpG-ODN) 서열

[0076] CpG 부위는 그 길이를 따라 염기의 선형 서열 내에서 시스테인 뉴클레오타이드가 의 구아닌 뉴클레오타이드의 옆에 존재하는 데옥시리보핵산(DNA)의 영역이다("p"는 이들 사이의 인산 결합을 나타내며 이들을 시토신-구아닌 상보적 염기쌍과 구별함). CpG 부위는 유전자 발현을 침묵시키기 위해 세포가 사용하는 몇 가지 내인성 기전 중

하나인 DNA 메틸화에서 중추적인 역할을 한다. 프로모터 요소 내의 CpG 부위의 메틸화는 유전자 침묵을 야기할 수 있다. 암의 경우, 종양 억제 유전자는 종종 침묵되는 반면 종양유전자, 또는 암 유도 유전자는 발현되는 것으로 알려져 있다. 종양 억제 유전자(암 형성을 예방함)의 프로모터 영역 내의 CpG 부위는 메틸화되는 것으로 나타난 반면, 종양유전자의 프로모터 영역 내의 CpG 부위는 특정 암에서 저메틸화되거나 비메틸화되어 있다. TLR-9 수용체는 DNA 내의 메틸화되지 않은 CpG 부위에 결합한다.

[0077] 본원에 기재된 백신 조성물은 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. CpG 올리고뉴클레오타이드는 내인성 공급원으로부터 단리되거나 생체내 또는 시험관내에서 합성된다. 내인성 CpG 올리고뉴클레오타이드의 예시적인 공급원은, 비제한적으로, 미생물, 박테리아, 진균류, 원생동물, 바이러스, 곰팡이, 또는 기생충을 포함한다. 대안적으로, 내인성 CpG 올리고뉴클레오타이드는 포유동물의 양성 또는 악성 신생 종양으로부터 단리된다. 합성 CpG 올리고뉴클레오타이드는 주형 DNA를 숙주 유기체 내로 형질감염 또는 형질전환한 후 생체내에서 합성된다. 대안적으로, 합성 CpG 올리고뉴클레오타이드는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 다른 당업계에 인정된 방법(본원에 참고로 포함된, Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989), herein incorporated by reference)에 의해 시험관내에서 합성된다.

[0078] CpG 올리고뉴클레오타이드는 수지상 세포에 의한 세포 흡수를 위해 제시된다. 예를 들어, 네이키드(naked) CpG 올리고뉴클레오타이드가 사용된다. 용어 "네이키드(naked)"는 추가적인 치환체가 없는 단리된 내인성 또는 합성 폴리뉴클레오타이드(또는 올리고뉴클레오타이드)를 기술하는데 사용된다. 또 다른 구현예에서, CpG 올리고뉴클레오타이드는 세포 흡수의 효율을 증가시키기 위해 하나 이상의 화합물에 결합된다. 대안적으로, 또는 부가적으로, CpG 올리고뉴클레오타이드는 스캐폴드 및/또는 수지상 세포 내에서 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 증가시키기 위해 하나 이상의 화합물에 결합된다. CpG 올리고뉴클레오타이드는 세포 흡수 전에 선택적으로 응축된다. 예를 들어, CpG 올리고뉴클레오타이드는 수지상 세포로의 세포 흡수의 효율을 증가시키는 양이온성 중합체인 폴리에틸이민(PEI)을 사용하여 응축된다.

[0079] CpG 올리고뉴클레오타이드는 다수의 클래스로 나뉠 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물, 방법 및 장치에 포함되는 예시적인 CpG-ODN은 자극성, 중성, 또는 억제성이다. 용어 "자극성"은 TLR9를 활성화시키는 CpG-ODN 서열의 클래스를 기술한다. 용어 "중성"은 TLR9를 활성화시키지 않는 CpG-ODN 서열의 클래스를 기술한다. 용어 "억제성"은 TLR9를 억제하는 CpG-ODN 서열의 클래스를 기술한다. 용어 "TLR9를 활성화시키다"는 TLR9가 세포내 신호전달을 개시하는 과정을 기술한다.

[0080] 자극성 CpG-ODN은 면역 자극 활성이 상이한 3가지 유형 A, B 및 C로 더 나뉠 수 있다. 유형 A 자극성 CpG ODN은 포스포디에스테르 중심 CpG-함유 회문(palindromic) 모티프 및 포스포로티오에이트 3' 폴리-G 스트링(string)을 특징으로 한다. TLR9의 활성화 후, 이를 CpG ODN은 형질세포양(plasmacytoid) 수지상 세포(pDC)로부터 높은 IFN-알파 생산을 유도한다. 유형 A CpG ODN은 TLR9-의존적 NF-카파B 신호전달을 약하게 자극한다.

[0081] 유형 B 자극성 CpG ODN은 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 완전한 포스포로티오에이트 백본을 함유한다. TLR9 활성화 후, 이를 CpG-ODN은 B 세포를 강하게 활성화시킨다. 유형 A CpG-ODN과 달리, 유형 B CpG-ODN은 IFN-알파 분비를 약하게 자극한다.

[0082] 유형 C 자극성 CpG ODN은 유형 A 및 B의 특징을 포함한다. 유형 C CpG-ODN은 완전한 포스포로티오에이트 백본 및 CpG 함유 회문 모티프를 함유한다. 유형 A CpG ODN와 유사하게, 유형 C CpG ODN은 pDC로부터 강한 IFN-알파 생산을 유도한다. 유형 B CpG ODN과 유사하게, 유형 C CpG ODN은 강한 B 세포 자극을 유도한다.

[0083] 예시적인 자극성 CpG ODN은, 비제한적으로, ODN 1585, ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006, ODN 2006-G5, ODN 2216, ODN 2336, ODN 2395, ODN M362(모두 InvivoGen)를 포함한다. 본 발명은 또한 전술한 CpG ODN의 임의의 인간화 형태를 포함한다. 일 바람직한 구현예에서, 본 발명의 조성물, 방법, 및 장치는 ODN 1826(5'에서 3'으로의 서열은 tccatgacgttcctgacgt이며, 여기서 CpG 요소는 굵은 글씨임, 서열번호 30)을 포함한다.

[0084] TLR9를 자극하지 않는 중성, 또는 대조군, CpG ODN이 본 발명에 포함된다. 이를 ODN은 이들의 자극성 대응물과 동일한 서열을 포함하나 CpG 디뉴클레오타이드 대신에 GpC 디뉴클레오타이드를 함유한다.

[0085] 본 발명에 포함되는 예시적인 중성, 또는 대조군, CpG ODN은, 비제한적으로, ODN 1585 대조군, ODN 1668 대조군, ODN 1826 대조군, ODN 2006 대조군, ODN 2216 대조군, ODN 2336 대조군, ODN 2395 대조군, ODN M362 대조군(모두 InvivoGen)을 포함한다. 본 발명은 또한 전술한 CpG ODN의 임의의 인간화 형태를 포함한다.

[0086] 치료 및 투여 방법

본 발명의 백신 조성물은 암의 예방 및 치료에 유용하다. 따라서, 본 발명은 암이 발생할 위험이 있는 대상에서 암을 예방하는 방법 및 이러한 치료를 필요로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 암은 전립선암, 다발성 골수종, 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 암은 흑색종이다.

일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 MICA의 과발현과 관련된 암을 가진 대상에게 투여된다. MICA의 과발현은 단백질 또는 상응하는 핵산의 발현 수준을 측정하는 당업계의 임의의 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 비제한적으로, 웨스턴 블롯, 노던 블롯, 서던 블롯, ELISA, 면역침전, 면역형광, 유세포분석, 면역세포화학, 핵산 혼성화 기술, 핵산 역전자 방법, 및 핵산 증폭 방법을 포함한다. 일 구현예에서, 암은 흑색종, 폐, 유방, 신장, 난소, 전립선, 췌장, 위, 및 결장 암종, 림프종 또는 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 암은 흑색종이다. 일 구현예에서, 암은 혈장 세포 악성종양(plasma cell malignancy)이다. 예를 들어, 다발성 골수종(MM) 또는 혈장 세포의 악성전 상태이다. 일부 구현예에서, 대상은 암을 갖거나 또는 암에 걸리기 쉬운 것으로 진단되었다.

본 발명의 백신 조성물은 하기 기재된 바와 같이, 별개로 또는 치료 요법 또는 조합 요법의 일부로서 투여될 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 또한 단일로, 또는 다중 투여로, 예를 들어 프라임-부스트(prime-boost) 전략으로 투여될 수 있다. 이 문맥에서, 용어 "프라임-부스트"는 2개의 상이한 면역원을 연속으로 사용하는 것을 지칭한다. 2개의 상이한 면역원은 전형적으로 10 내지 30일 또는 10 내지 60일과 같은 일정한 기간 후 연속적으로 투여된다. 일 구현예에서, 기간은 2 내지 4주이다. 따라서, 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 0시간에 투여되고, 본 발명의 제2 백신 조성물(상이한 면역원을 포함함)은 일정 기간, 예를 들어 10 내지 30일, 10 내지 60일, 또는 2 내지 4주 후에 투여된다.

제1 및 제2 백신 조성물은 동일한 조성물일 수 있으나 동일한 조성물일 필요는 없다. 따라서, 본 발명의 일 구현예에서, 백신을 투여하는 단계는 제1 백신 조성물을 투여한 다음, 이후에 제2 백신 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

일 구현예에서, 본 발명의 하나의 또는 복수의 상이한 백신 조성물은 US 제8,110,196호에 기재된 바와 같이 다수의 부위에서 대상에게 투여된다. 바람직하게는, 각 부위는 림프절 또는 림프절의 그룹으로 배수된다. 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 두경부의 림프절, 겨드랑이 림프절, 기관지 림프절, 벽측 림프절, 위 림프절, 회결장 림프절, 및 서혜 및 설하 림프절로 이루어진 군으로부터 선택되는 둘 이상의 림프절로 배수되는 다수의 부위에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 부위는 오른쪽 팔, 왼쪽 팔, 오른쪽 허벅지, 왼쪽 허벅지, 오른쪽 어깨, 왼쪽 어깨, 오른쪽 가슴, 왼쪽 가슴, 복부, 오른쪽 엉덩이, 및 왼쪽 엉덩이로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 부위는 편도선, 인두 편도(adenoid), 맹장, 및 페이에르판(Peyer's patch)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 림프양 조직의 비캡슐화된 클러스터이거나 이로 배수된다. 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 비장으로 배수되는 부위에 투여된다.

일 구현예에서, 각각의 백신 조성물은 진피내, 피하, 경피, 근육내, 경구, 직장, 질내, 흡입 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 경로에 의해 투여된다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 조성물은 해부학상으로 구별되는 림프절, 림프절 클러스터, 또는 림프양 조직의 비캡슐화된 클러스터 내로 직접 주사된다.

임의의 적합한 투여 경로, 예컨대 진피내, 피하, 정맥내, 근육내, 또는 점막이 본 발명의 방법에 포함된다. 점막 투여 경로는, 비제한적으로, 경구, 직장, 질내, 및 비강 투여를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 조성물은 경피로, 진피내로, 피하로, 경구로, 직장으로, 질내로 또는 흡입에 의해 투여된다. 미국 식품의약국(FDA)에 의해 승인된 임의의 경로가 본 발명의 백신 조성물을 사용될 수 있다. 예시적인 투여 방법은 FDA의 CDER 데이터 표준 매뉴얼, 버전 번호 004(fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm에서 이용가능함)에 기재되어 있다.

바람직하게는, 투여 경로는, 예를 들어, 림프절 또는 림프절 클러스터 내로의 직접 주사에 의해, 위장의 림프절을 표적화하기 위한 경구 투여에 의해, 직장의 림프절을 표적화하기 위한 항문 투여에 의해, 폐의 림프절을 표적화하기 위한 흡입 또는 에어로졸에 의해, 또는 임의의 다른 적합한 투여 경로에 의해, 조성물을 특정 부위에 표적화하도록 선택된다.

본 발명의 방법이 다수의 부위에 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 경우, 각각의 조성물은 바람직하게는 실질적으로 동일한 시간에, 예를 들어, 1 내지 8시간 이내에 또는 동일한 의사의 방문 동안 투여된다. 일 구현

예에서, 각각의 조성물은 1 내지 2시간 이내, 1 내지 3시간 이내, 1 내지 4시간 이내, 또는 1 내지 5시간 이내에 투여된다.

- [0096] 백신 조성물이 스캐폴드의 형태인 경우, 대상에게 백신을 접종하는 방법은 대상에서 스캐폴드 조성물을 이식하는 단계, 바람직하게는 피하 이식을 포함한다. 특정 구현예에서, 대상에게 백신을 접종하는 방법은 대상의 해부학의 둘 이상의 영역에서 스캐폴드 백신 조성물을 이식하거나 주사하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0097] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 적어도 하나의 MIC 웨بت아이드로 감작된 항원 제시 세포를 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 구현예에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포이다.
- [0098] 일 구현예에서, 방법은 하나 이상의 보조제를 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 하나 이상의 보조제는 오일계 보조제, CpG DNA 보조제, 폴리이노신:폴리시티딜산(일반적으로 폴리(I:C)로 약칭됨), 미네랄 염 보조제, 미네랄 염 젤 보조제, 미립자 보조제, 미세미립자 보조제, 점막 보조제, 및 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 보조제는 본 발명의 조성물과 함께 제제화될 수 있거나 또는 조성물과 별도로, 예컨대, 조성물이 대상에게 투여되기 이전에, 이와 동시에, 또는 이후에, 투여될 수 있다. 하나 이상의 보조제는 본 발명의 웨بت아이드 또는 융합 단백질에 공유 결합될 수 있다. 예를 들어, CpG DNA 보조제는 본 발명의 웨بت아이드 또는 융합 단백질에 공유 결합된다.
- [0099] 본원에 개시된 방법은 광범위한 종, 예컨대, 인간, 비인간 영장류(예컨대, 원숭이), 말, 소, 돼지, 양, 사슴, 엘크, 염소, 개, 고양이, 족제비과, 토끼, 기니어 피그, 햄스터, 랫트, 및 마우스에 적용될 수 있다.
- [0100] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다" 또는 "치료하는"은 대상이 고통받고 있는 질환 또는 병태를 부분적으로 또는 완전히 완화, 억제, 개선, 및/또는 경감시키는 것을 지칭한다. 일부 경우, 치료는 대상이 고통받는 질환 또는 병태의 지속적인 부재를 야기할 수 있다.
- [0101] 일반적으로, 방법은 병태 또는 질환의 위험에 있거나 이를 갖는 대상을 선택하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 대상의 병태 또는 질환은 본원에 개시된 약제학적 조성물로 치료될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우, 방법은 암을 가진 대상을 선택하는 단계를, 예컨대, 대상의 암은 MICA 중 하나 또는 둘을 표적화함으로써 치료될 수 있다.
- [0102] 일부 경우, 치료 방법은 대상이 고통받고 있는 질환 또는 병태의 예방 또는 치료에 필요한 단일 투여, 다중 투여, 및 반복 투여를 포함할 수 있다. 일부 경우, 치료 방법은 치료 전, 치료 동안, 및/또는 치료 후 대상에서 질환의 수준을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 치료는 대상의 질환의 수준의 감소가 검출될 때까지 계속할 수 있다.
- [0103] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "투여하다," "투여하는" 또는 "투여"는 형태에 관계없이, 본 발명의 웨بت아이드를 이식, 흡수, 섭취, 주입, 또는 흡입하는 것을 지칭한다. 일부 경우, 본원에 개시된 하나 이상의 웨بت아이드는 국소로(예컨대, 비강으로) 및/또는 경구로 대상에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원의 방법은 원하는 또는 언급된 효과를 달성하기 위해 화합물 또는 화합물 조성물의 유효량의 투여를 포함한다. 임의의 특정 환자에 대한 특정 투여량 및 치료 요법은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별, 식이, 투여 시간, 배설 속도, 약물 조합, 질환, 병태 또는 증상의 중증도 및 경과, 질환에 대한 환자의 소인, 및 치료 의사의 판단을 포함하는, 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.
- [0104] 투여 후, 대상은 그들의 질환 수준을 검출, 평가, 또는 결정하기 위해 평가될 수 있다. 일부 경우, 치료는 대상의 질환 수준의 변화(예컨대, 감소)가 검출될 때까지 계속할 수 있다.
- [0105] 환자의 병태의 개선(예컨대, 대상의 질환 수준의 변화(예컨대, 감소)), 필요한 경우, 본 발명의 화합물, 조성물 또는 조합의 유지 용량이 투여될 수 있다. 이후, 투여의 투여량 또는 빈도, 또는 둘 모두는, 증상의 기능으로서, 개선된 병태가 유지되는 수준까지 감소될 수 있다. 그러나, 환자는 질환 증상의 임의의 재발시 장기적으로 간헐적인 치료가 필요할 수 있다.
- [0106] 일부 경우, 본 개시내용은 인간 대상으로부터, 면역 세포, 예컨대, B 세포 및/또는 기억 B 세포를 검출하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 예컨대, 사건 후, 예를 들어, 인간 대상에서 면역 세포, 예컨대, B 세포 및/또는 기억 B 세포의 수준을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 예시적인 사건은, 비제한적으로, 질환, 감염의 검출; 본원에 개시된 치료 조성물의 투여, 치료제 또는 치료 요법의 투여, 백신의 투여, 면역 반응의 유도를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 임상적으로 및/또는 연구를 위해 사용될 수 있다.

[0107] **유효량 및 투여량**

일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물의 유효량은 암을 갖는 대상에서 암의 중증도를 감소시키는데 충분한 양, 또는 이의 하나 이상의 증상의 중증도를 감소시키거나 개선하는데 충분한 양, 암의 진행을 예방하는데 충분한 양, 암의 추가 전이를 예방하는데 충분한 양, 암의 임상 퇴행을 일으키는데 충분한 양, 또는 본 발명의 백신 조성물과 동시에, 이전에, 또는 이후에 투여되는 또 다른 요법 또는 치료제의 치료 효과(들)를 향상시키거나 개선하는데 충분한 양이다.

[0109] 암의 증상은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 이는 비제한적으로, 비정상적인 점 특성, 비대칭, 경계, 색 및/또는 직경을 포함하는 점의 외관의 변화, 새롭게 착색된 피부 부위, 비정상적인 점, 손톱 밑의 어두운 부분, 유방 덩어리, 유두 변화, 유방 낭종, 유방 통증, 사망, 체중 감소, 약화, 과도한 피로, 먹기 어려움, 식욕 상실, 만성 기침, 호흡 곤란, 피 토하기, 요혈, 혈변, 구역질, 구토, 간 전이, 폐 전이, 골 전이, 복부 팽만, 팽창(bloating), 복강내 유체, 질 출혈, 변비, 복부 팽창(abdominal distension), 결장 천공, 급성 복막염(감염, 발열, 통증), 통증, 토혈, 비지땀, 발열, 고혈압, 빈혈, 설사, 황달, 현기증, 오한, 근육 경련, 결장 전이, 폐 전이, 방광 전이, 간 전이, 골 전이, 신장 전이, 및 췌장 전이, 삼키기 어려움 등을 포함한다.

[0110] 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물의 유효량은 본 발명의 백신 조성물의 하나 이상의 웨타이드에 대해 항체 분비 B 세포 또는 세포독성 T 세포 매개 면역 반응을 생성하는데 충분한 양이다. 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물의 유효량은 암세포에 대해 항체 분비 B 세포 또는 세포독성 T 세포 매개 면역 반응을 생성하는데 충분한 양이다. 면역 반응을 유발하는 본 발명의 백신 조성물의 능력은 당업자에게 이용가능한 임의의 통상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 각 조성물의 유효량은, 예를 들어, 혼합 림프구 T 세포 분석에 의해 측정된 바와 같이, 대상에서 세포독성 T 세포 반응을 생성하는데 충분한 양이다.

[0111] 일 구현예에서, 대상에, 또는 대상의 특정 부위에 투여되는 백신 조성물의 유효량은 조성물의 하나 이상의 웨타이드의 1 내지 1000 µg을 전달하는 양이다. 일 구현예에서, 웨타이드의 양은 1 내지 100 µg, 1 내지 200 µg, 1 내지 300 µg, 1 내지 400 µg, 1 내지 500 µg, 1 내지 600 µg, 1 내지 700 µg, 1 내지 800 µg, 또는 1 내지 900 µg이다. 또 다른 구현예에서, 웨타이드의 양은 1 내지 10 µg, 1 내지 20 µg, 1 내지 30 µg, 1 내지 40 µg, 1 내지 50 µg, 1 내지 60 µg, 1 내지 70 µg, 1 내지 80 µg, 또는 1 내지 90 µg이다. 일 구현예에서, 대상에게 투여되는 웨타이드의 총량은 5 mg을 초과하지 않는다. 일 구현예에서, 대상에게 투여되는 웨타이드의 총량은 2 mg을 초과하지 않는다.

[0112] **조합 요법**

[0113] 본 발명은 또한 하나 이상의 추가의 치료제 또는 치료 요법과 함께, 본 발명의 백신 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 수술, 화학치료제, 또는 방사선 요법, 면역요법, 또는 전술한 것의 임의의 조합을 포함하는 치료 요법의 일부로서 투여된다.

[0114] 일 구현예에서, 치료 요법은 하나 이상의 면역자극제를 포함하거나 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 하나 이상의 면역자극제는 항-CTLA-4 항체 또는 웨타이드, 항-PD-1 항체 또는 웨타이드, 항-PDL-1 항체 또는 웨타이드, 항-OX40(CD134, TNFRSF4, ACT35 및/또는 TXGP1L로도 알려짐) 항체 또는 웨타이드, 항GITR(TNFRSF18, AIR, 및/또는 CD357로도 알려짐) 항체 또는 웨타이드, 항-LAG-3 항체 또는 웨타이드, 및/또는 항-TIM-3 항체 또는 웨타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0115] 일 구현예에서, 하나 이상의 면역자극제는 WO 제2013/049517호 또는 WO 제2008/036981호에 기재된 항-MICA 항체로부터 선택된다. 일 구현예에서, 하나 이상의 면역자극제는 미국 출원 제61/792,034호 및 제61/913,198호 및 미국 출원 제14/025,573호에 기재된 CM33322 Ab4, CM33322 Ab28, 및 CM33322 Ab29로부터 선택된다.

[0116] 일 구현예에서, 치료 요법은 하나 이상의 사이토카인을 포함하거나 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 사이토카인은 인터루킨 또는 인터페론이다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 사이토카인은 IL-1알파, IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, 및 IL-18로 이루어진 군으로부터 선택되는 인터루킨이다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 사이토카인은 IFN알파, IFN베타, 및 IFN감마로부터 선택된 인터루킨이다.

[0117] 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 히스톤 데아세틸라아제 억제제("HDAC") 억제제, 프로테아좀 억제제, 알킬화제, 및 토포이소머라아제 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화학치료제를 대상에게

투여하는 단계를 포함하는 치료 요법의 일부로서 투여된다.

[0118] 일 구현예에서, 화학요법제는 하이드록삼산, 보리노스타트(Zolinza), 수베로일아닐리드 하이드록삼산(SAHA)(Merck), 트리코스타틴 A(TSA), LAQ824(Novartis), 파노비노스타트(LBH589)(Novartis), 벨리노스타트(PXD101)(CuraGen), ITF2357 이탈파르마코 SpA(Cinisello), 사이클릭 테트라펩타이드, 텁시펩타이드(romidepsin, FK228)(Gloucester Pharmaceuticals), 벤즈아미드, 엔티노스타트(SNDX-275/MS-275)(Syndax Pharmaceuticals), MGCD0103(Celgene), 단쇄 지방족산, 밤프로산, 페닐 부티레이트, AN-9, 피바넥스(Titan Pharmaceutical), CHR-3996(Chroma Therapeutics), 및 CHR-2845(Chroma Therapeutics)로 이루어진 군으로부터 선택되는 HDAC 억제제이다.

[0119] 일 구현예에서, 화학치료제는 보르테조립(Millennium Pharmaceuticals), NPI-0052(Nereus Pharmaceuticals), 카르필조립(PR-171)(Onyx Pharmaceuticals), CEP 18770, 및 MLN9708로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테아좀 억제제이다.

[0120] 일 구현예에서, 화학치료제는 메팔란과 같은 알킬화제이다.

[0121] 일 구현예에서, 화학치료제는 아드리아마이신(독소루비신)과 같은 토포이소머라아제 억제제이다.

[0122] 일 구현예에서, 치료 요법은 하나 이상의 화학요법, 방사선 요법, 사이토카인, 케모카인 및 다른 생물학적 신호 전달 문자, 종양 특이적 백신, 세포성 암 백신(예컨대, GM-CSF 형질도입된 암세포), 종양 특이적 단클론 항체, 자가 및 동종(allogeneic) 줄기 세포 구조(이식편 대 종양 효과를 증대시키기 위해), 다른 치료 항체, 분자 표적화 요법, 항혈관신행 요법, 치료 목적을 갖는 감염제(예컨대, 종양 국소 박테리아) 및 유전자 요법을 포함하거나 추가로 포함한다.

키트

[0123] [0124] 본 발명은 본 발명의 방법 또는 치료 요법을 수행하기 위한 약제학적 포장 또는 키트를 제공한다. 일 구현예에서, 키트는 동결건조된 형태의 본 발명의 백신 조성물을 포함한다. 일 구현예에서, 키트는 단백질 스캐폴드의 형태의 본 발명의 백신 조성물을 포함한다.

[0125] 또 다른 구현예에서, 키트는 하나 이상의 추가의 용기 내에 사이토카인 또는 보조제를 추가로 포함한다.

[0126] 각 용기 내의 조성물은, 예컨대, 멸균 식염수, 텍스트로스 용액, 또는 완충액, 또는 다른 약제학적으로 허용 가능한 멸균 유체와 조합된, 약제학적으로 허용가능한 용액의 형태일 수 있다. 대안적으로, 조성물은 동결건조되거나 건조될 수 있으며, 이 경우, 키트는 선택적으로 별도의 용기 내에 조성물을 재구성하여 주사 목적을 위한 용액을 형성하기 위해, 바람직하게는 멸균된, 약제학적으로 허용가능한 용액(예컨대, 식염수, 텍스트로스 용액 등)을 추가로 포함한다.

[0127] 또 다른 구현예에서, 키트는 바람직하게는 멸균 형태로 포장된 하나 이상의 재사용가능하거나 또는 일회용의 투여용 장치(들)(예컨대, 주사기, 바늘, 분배 웬), 및/또는 포장된 알코올 패드를 추가로 포함한다. 임상의 또는 환자가 조성물을 투여하기 위한 설명서가 선택적으로 포함된다. 키트는 또한 다른 물질, 예컨대, 금속 또는 플라스틱 호일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다.

[0128] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기 방법에서 본원에 개시된 임의의 하나 이상의 백신 조성물(하기에 'X'로 나타냄)을 사용하는 방법을 제공한다.

[0129] 본원에 개시된 하나 이상의 질환 또는 병태(예컨대, 하기 실시예에 'Y'로서 지칭된 암)의 치료에서 약물로서 사용하기 위한 물질 X. Y의 치료를 위한 약물의 제조를 위한 물질 X의 용도; 및 Y의 치료에서 사용하기 위한 물질 X.

[0130] 일부 경우, 본원에 개시된 치료 조성물은 미국에서 판매, 미국으로 수입, 및/또는 미국으로부터 수출하기 위해 제제화될 수 있다.

[0131] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 방법 및 물질은 본 발명에서 사용하기 위해 본원에 기재되어 있으며, 당업계에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히, 서열, 데이터베이스 입력, 및 다른 참고문헌은 그 전체가 참고로 본원에 포함되어 있다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다.

[0132]

실시예

[0133]

실시예 1: 일반적인 방법

[0134]

벡터 제작

[0135]

다가 백신은 1가 단백질보다 실질적으로 더 높은 역가 항체 반응을 유도한다. 본원에서는 MICA 알파3 도메인(Helicobacter pylori) 페리틴에 융합된 다가 디스플레이를 사용한다. 페리틴계 나노입자는 최근에 인플루엔자 및 EBV 백신에 대해 높은 역가 항체를 유도하는 것으로 나타났다. 페리틴은 대부분의 유기체에서 철 저장 단백질로서 발견된다. 페리틴은 24개의 서브유닛으로 구성된 8면체 대칭을 가진 구형 입자를 형성하는 자기 조립 입자이다. 페리틴 입자의 개략도뿐만 아니라 인간 및 마우스 페리틴에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응을 나타내는 지도에 대해 도 1c 및 1d를 참고한다. Gly-Ser-Gly 링커를 사용하여 MICA의 α3 도메인을 코딩하는 유전자를 *H. pylori* 페리틴에 융합하여 MICA 알파3 페리틴 융합 유전자(MICA-페리틴으로 약칭됨)를 생성하였다(도 2a). 잠재적인 N-당화 부위를 폐지하기 위해, 점 돌연변이(Asn19Gln)를 *H. pylori* 페리틴에 도입하였다. MICA α3 단독(페리틴 없음)의 항체 반응을 결정하기 위해, 8개의 잠재적인 N-당화 부위 중 7개를 Asp 또는 Gln으로 돌연변이시켜 MICA α3 유전자의 탈당화된 형태를 생성하였다. 하류 단백질 정제 목적을 위해 C-말단 HA 태그를 포함시켰다. 유전자를 GeneArt® 유전자 합성 플랫폼을 사용하여 합성하고, 코돈을 곤충 세포 발현을 위해 최적화하였다. 합성된 유전자를 pAcDB3 배클로바이러스 발현 벡터 내로 클로닝하였다(도 2c 참고).

[0136]

MIC 알파 3 도메인 백신의 생성 및 탈당화된 MICA 알파3 백신의 생성을 입증하는 분석이 각각 도 2b 및 2d에 제시되어 있다.

[0137]

단백질 생합성 및 정제

[0138]

Sf9(Spodoptera frugiperda) 곤충 세포를 10의 다중 감염도로 재조합 배클로바이러스로 감염시켜 이들 세포에서 MICA α3 및 MICA-페리틴 융합 단백질을 발현시켰다. 세포를 Sf900 무혈청 발현 배지(Life Technologies)에서 성장시키고 배양된 상층액을 형질감염 3일 후에 수집하였다. 상층액을 농축시킨 다음, 트리스 완충액(50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5 완충액)으로 교환하였다. 단백질을 HA 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하고, Superose 6 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 응집물을 제거하였다. 정제된 단백질을 PD-10 탈염 컬럼(GE)을 사용하여 PBS로 완충액 교환하고, Amicon Ultra 4ml 원심분리 필터를 사용하여 1mg/ml으로 농축시켰다. 단백질 순도 및 크기를 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.

[0139]

MPS 백신의 제조 및 면역화

[0140]

본원에 기재된 스캐폴드 백신은 최근에 보고되었다(Kim et al *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 64-72). 바늘로 주사된 메조다공성 실리카 막대(MSR)는 생체내에서 자발적으로 조립되어 수지상 세포에게 3D 세포 미세 환경을 제공하는 건초더미(haystack)와 유사한 거대다공성 구조를 형성한다. 이 생분해성 스캐폴드는 수지상 세포를 모집하고 교육하며, 이후 수지상 세포는 림프절로 이동하여 면역 반응을 유도한다. 5mg의 MSR에 1 μg의 GM-CSF(수지상 세포를 모집하기 위해), 100 μg의 CpG 올리고뉴클레오타이드(수지상 세포 활성화를 유도하기 위해) 및 200 μg의 MICA-페리틴 융합 또는 대조군 단백질(난백알부민)을 실온에서 12시간 동안 로딩하였다. 입자를 동결건조시키고, PBS에 재현탁시키고 C57BL/6 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 마우스는 초기 면역화 후 14 또는 21일에 부스트를 받는다. 연령 일치된 비면역화된 마우스(나이브) 및 난백알부민으로 면역화된 마우스를 MICA-페리틴 면역화 실험을 위한 대조군으로서 사용하였다. MICA α3 실험에서 추가의 대조군으로서, 마우스를 MSR 스캐폴드가 없는 모든 백신 성분(볼루스)으로 면역화하였다.

[0141]

MICA α3 및 MICA-페리틴 면역화된 마우스에서 폐 전이 실험

[0142]

C57B1/6J 마우스를 MICA α3 또는 MICA α-페리틴 백신으로 면역화하였다. 부스트 3주 후, 마우스에게 0.5×10^6 MICA 발현 B16F10 흑색종 세포의 정맥내(i.v) 주사를 투여하였다. 종양 투여 전 그리고 매주 간격으로 혈청을 수집하여 탈락된 MICA 수준을 분석하였다. 마우스를 종양 투여 후 14일에 안락사시키고; 폐를 수화하고 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키고, 폐 전이의 수를 정량화하였다.

[0143]

면역화된 마우스에서 MICA 항체 역가를 결정하기 위한 유세포 분석 및 ELISA

[0144]

MICA 특이적 항체 역가를 MICA의 전장 세포외 도메인을 사용한 ELISA에 의해 시험하였다. 전장 MICA 단백질(0.2 μg)을 96 웰 ELISA 플레이트에서 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBS/2% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 세척하고, 각각의 실험군으로부터 매주 간격으로 수집된 혈청의 연속 회석액과 함께 배양

하였다. 염소 항마우스 HRP를 검출 항체로서 사용하였다. 유세포 분석을 사용하여 종양 세포의 표면에 발현된 전장에 대한 혈청 항체의 결합을 평가하였다. 간략하게, 1×10^5 종양 세포를 4°C 에서 2시간 동안 $1 \mu\text{l}$ 의 혈청과 함께 배양하였다. 1×10^5 세포를 $100 \mu\text{l}$ 의 PBS에서 2시간 동안 비면역화된 마우스(나이브), MSR 스캐폴드가 없는 백신 성분(볼루스) 또는 MICA-페리틴 백신(백신접종된)으로 면역화된 마우스로부터의 $1 \mu\text{l}$ 의 혈청으로 염색하였다. MICA의 알파1-알파2 도메인에 결합하는 상업적으로 이용가능한 단클론 항체 6D4를 양성 대조군($10 \mu\text{g}$)으로 사용하였다. PE 접합된 항마우스 IgG를 2차 항체로 사용하였다.

[0145] 실시예 2: 강력한 면역 반응의 유도를 위한 스캐폴드 백신

MIC $\alpha 3$ 도메인은 배클로바이러스 시스템에서 재조합 단백질로서 발현되었고; 단백질은 24개의 동일한 서브유닛을 갖는 철 저장 단백질인 *H. pylori* 페리틴 상에 다가 형태로 디스플레이되었다. 문헌[Kim et al Nat Biotechnol. 2015, 33, 64-72]에 최초로 기재된 메조다공성 실리카 막대(MSR)를 사용한 백신접종 접근법이 본원에 사용되었고, 이는 그 전체가 참고로 본원에 포함되어 있다(도 3 참고). 바늘로 피하 주사된 MSR은 생체내에서 거대다공성 구조로 자발적으로 조립되어 숙주 면역 세포에 3D 세포 미세환경을 제공한다. 이 시스템은 다수의 면역 세포를 모집하여, 이들을 관련 항원에 노출시키고, 또한 강력한 면역 반응의 유도를 위한 적절한 분자 신호를 제공한다. MIC $\alpha 3$ 도메인 단백질은 GM-CSF(수지상 세포의 모집을 위해) 및 CpG 올리고뉴클레오타이드(수지상 세포를 활성화시키는 보조제)와 함께 MSR에 흡수되었다. 이 백신접종 접근법은 MIC $\alpha 3$ 도메인에 특이적인 높은 역가 항체를 유도할 수 있었다. 이들 항체는 MIC를 발현하는 종양 세포를 염색하였고 종양 세포에 의한 MIC의 탈락을 억제하였다.

[0147] 이 백신의 항종양 활성을 시험하기 위해, 인간 MIC로 형질감염된 B16 흑색종 세포를 이용하였다. 이들 종양 세포가 비면역화된 마우스 내로 정맥내로 주사되면, 이들은 많은 폐 전이(~200 전이/마우스)를 형성한다. MSR 스캐폴드 백신은 이러한 전이의 파생물로부터의 강력한 예방을 제공하였다. 백신 성분이 MSR 스캐폴드 없이 볼루스로서 주사되었을 때, 부분적인 예방이 관찰되었지만, 생물학적 효과는 현저하게 약했다. 이 결과는 MSR 스캐폴드에 면역 세포를 국소적으로 모집하는 것이 이 백신의 활성을 크게 향상시킨다는 것을 보여준다(도 4 참고).

[0148] 실시예 3: MICA-페리틴 융합 단백질의 백신접종은 MICA 특이적 항체의 높은 역가를 유도한다

B16F10 마우스 흑색종 세포의 표면 상에 발현된 전장 MICA에 대한 면역화된 마우스의 혈청 내의 MICA $\alpha 3$ 특이적 항체의 결합을 유세포 분석에 의해 시험하였다. 간략하게, 1×10^5 세포를 2시간 동안 $100 \mu\text{l}$ 의 PBS에서 14, 28 및 42일부터 비면역화된 마우스(나이브), 대조군 백신(OVA-단백질) 또는 MICA-페리틴 백신(백신접종된)으로 면역화된 마우스의 $1 \mu\text{l}$ 의 혈청으로 염색하였다. MICA의 $\alpha 1 - \alpha 2$ 도메인에 결합하는 상업적으로 이용가능한 단클론 항체 6D4를 양성 대조군($10 \mu\text{g}$)으로 사용하였다. PE 접합된 항마우스 IgG를 2차 항체로 사용하였다. 백신접종된 마우스의 혈청 내의 MICA $\alpha 3$ 특이적 항체(히스토그램 - 녹색(d14), 청색(d28), 적색(d42))는 종양 세포 표면 상에 발현된 MICA에 대한 유의한 결합을 나타내었다(도 5a 및 5b). 이 분석의 결과는 T MICA-페리틴 융합 단백질 백신접종이 MICA 특이적 항체의 높은 역가를 유도한다는 것을 입증한다.

[0150] 실시예 4: MICA-페리틴 융합 단백질의 백신접종은 높은 수준의 IGG1, IGG2a 및 IGG3 MICA $\alpha 3$ 특이적 다클론 항체 반응을 생성한다

[0151] MICA-페리틴 면역화된 마우스의 혈청을 ELISA에서 시험하여 백신접종시 유도된 IgG의 상이한 서브클래스를 결정하였다. OVA-단백질로 면역화된 마우스(볼루스) 또는 비면역화된 마우스(나이브)로부터의 혈청을 대조군으로 사용하였다. 전장 MICA를 포획 항원으로 사용하였고, 1/1000의 혈청 희석액을 각 웰에서 사용하였다. HRP 접합된 항마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 IgG3을 검출에 사용하였다. MICA-페리틴을 이용한 면역화(백신접종됨)는 시험된 모든 IgG 서브클래스의 높은 수준을 유도하는 것으로 나타났다(도 6 참고).

[0152] 실시예 5: MICA-페리틴 백신에 대한 반응으로 생성된 다클론 항체는 MICA가 인간 전이성 흑색종 세포주의 표면으로부터 탈락되는 것을 방지한다

[0153] 자가 종양 백신(GVAX) 및 이필리무맙으로 처리된 흑색종 환자에서 MICA 항체의 유도는 감소된 혈청 가용성 MICA(sMICA) 수준과 상관관계가 있었다. MICA/B의 세포외 부분은 2개의 MHC 클래스 I-유사 도메인($\alpha 1$ 및 $\alpha 2$) 및 막-근접 면역글로불린 도메인($\alpha 3$)을 함유한다. 디설파이드 이소머라아제 ERp5는 MICA $\alpha 3$ 도메인 내의 구조적 디설파이드 결합을 절단하고, 생성된 이 도메인의 언폴딩은 ADAM 10, ADAM 17 및 MMP-14에 의한 단백분해 절단을 허용하는 것으로 나타났다. 이 분석의 목적은 MICA-페리틴 백신에 대한 반응으로 생성된 다클론 항체가 인간 흑색종 종양 세포주의 A375로부터의 MICA 탈락을 방지하는지 결정하는 것이었다.

[0154] 이러한 분석을 위해, 4×10^5 A375 악성 흑색종 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 배지를 갖는 96 웰 플레이트에 도말하였다. 세포를 나이브, OVA-단백질 면역화된 또는 MICA-페리틴 백신접종된 마우스(역삼각형을 갖는 도 7 막대)의 혈청과 함께 또는 혈청 없이 24시간 동안 배양하였다. 상층액 내의 sMICA를 포획 및 검출을 위해 MICA α1-α2 도메인 항체를 이용하는 MICA ELISA 키트를 사용하여 분석하였다. 나이브로부터의 혈청 없이 또는 혈청과 함께 배양된 세포(원 및 정사각형을 갖는 도 7 막대) 또는 OVA-단백질 면역화된 마우스(삼각형을 갖는 도 7 막대)와 비교하여 MICA-페리틴 백신접종된 마우스(역삼각형을 갖는 도 7 막대)의 혈청과 함께 배양된 세포의 상층액에서 sMICA의 더 낮은 수준이 검출되었고, 따라서 이는 MICA α3 특이적 항체가 종양 세포 표면으로부터 MICA의 탈락을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0155] 실시예 6: MICA-페리틴 백신의 치료 활성

[0156] MICA-페리틴 백신의 치료 활성을 매우 공격적인 B16F10 흑색종 종양 모델을 사용하여 시험하였다. B16F10 흑색종 종양 세포를 인간 MICA를 발현하도록 유전적으로 변형시켰다. MICA는 젖과 NKG2D 수용체와 결합하며, 이를 적합한 모델 시스템으로 만든다. MICA-페리틴 백신, OVA-단백질 백신(대조군 항원)으로 면역화된 C57BL/6 마우스 및 비면역화된 대조군 마우스(연령 및 성별 일치됨)에게 B16F10-MICA 종양 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 혈청을 7일 및 13일에, 종양 투여 전에 수집하였다. 마우스를 종양 투여 후 14일에 안락사시키고 폐 전이의 수를 정량하였다(도 8a 참고).

[0157] 이들 분석을 위해, 8주령 C57BL/6 암컷 마우스를 MICA 알파3-페리틴 또는 ova-단백질로 면역화시킨 다음, 28일에 부스트하였다. 3주 후, 마우스에게 5×10^5 MICA-발현 B16F10 흑색종 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 마우스를 종양 투여 후 14일에 안락사시키고, 폐 전이의 수를 정량화하였다. 혈청 내의 탈락된 MICA(sMICA) 수준을 ELISA에 의해 모니터링하였다. 이들 실험은 MICA-페리틴 백신접종된 마우스가 거의 종양이 없다는 것을 입증하였다. 반면, 비면역화된 연령 일치된 대조군(나이브) 및 대조군 항원-난백알부민으로 백신접종된 마우스는 다수의 폐 전이(평균 ~150 폐 전이/마우스)를 가지고 있었다(도 8a). 중요하게도, sMICA는 MICA-페리틴 백신으로 면역화된 마우스(삼각형)의 혈청에서는 검출되지 않은 반면, 난백알부민으로 면역화된 마우스(정사각형) 및 비면역화된 대조군(원)의 혈청에서는 종양 투여 후 2주 이내에 높은 수준의 sMICA가 검출되었다(도 8b).

[0158] 실시예 7: MICA-페리틴 백신의 유효 투여량 및 생체내 다클론 항체 반응의 동역학 결정

[0159] 이 연구를 위해, 마우스에게 종양 세포 투여 전에 2회의 백신 주사를 투여하였다. 그러나, 최대에 근접한 항체 수준은 초기 면역화 후 2주에 이미 달성된다. 상이한 용량에서 다클론 항체 반응의 최적 백신접종 투여량 및 동역학을 결정하기 위해, C57B1/6J 마우스를 MSR에 흡수된 상이한 용량의 MICA-페리틴 단백질($50-200 \mu\text{g}$)로 면역화시켰다. 마우스에게 17일에 부스트를 투여하였다. ELISA에 의해 MICA 항체 역가를 결정하기 위해 혈청을 후안와(retro-orbital) 출혈에 의해 매주 간격으로 수집하였다. 초기 면역화 후 25일에, 마우스에게 MICA 발현 B16F10 흑색종 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 혈청을 종양 투여 전에 그리고 매주 간격으로 수집하여 탈락된 MICA 수준을 분석하였다. 마우스를 종양 투여 후 14일에 안락사시키고; 폐를 수확하고, 10% 중성-완충 포르말린에 고정시키고, 폐 전이의 수를 정량화하였다.

[0160] 이들 연구를 위해, 8주령 C57BL/6 암컷 마우스를 상이한 용량($50 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$ 또는 $200 \mu\text{g}$)의 MICA 알파3-페리틴 백신으로 면역화시키고 17일에 부스트시켰다. 혈청을 연속적으로 희석시키고 ELISA에 의해 전장 MICA 단백질에 대한 결합을 시험함으로써 종점 항체 역가를 결정하였다. MICA-페리틴 면역화된 마우스는 시험된 모든 용량에서 14일에 높은 수준의 항체 역가(10^5 의 ELISA 종점 역가)를 유발하였고, 역가는 17일에 부스트 후 ~1000배로 증가하였다. 나이브, 처리되지 않은 연령 일치된 마우스를 대조군으로 사용하였다(도 9a 참고).

[0161] 초기 면역화 후 25일에, 마우스에게 0.5×10^6 MICA 발현 B16F10 흑색종 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 혈청을 종양 투여 전에 그리고 매주 간격으로 수집하여 탈락된 MICA 수준을 분석하였다. 마우스를 종양 투여 후 14일에 안락사시키고; 폐를 수확하고, 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키고, 폐 전이의 수를 정량화하였다. $100 \mu\text{g}$ 및 $200 \mu\text{g}$ 으로 면역화된 마우스는 $50 \mu\text{g}$ 의 백신으로 면역화된 마우스(~2-12 폐 전이)와 비교하여 종양이 거의 없었다. sMICA는 상이한 용량의 MICA-페리틴 백신($50 \mu\text{g}$ -정사각형, $100 \mu\text{g}$ - 상향 삼각형, $200 \mu\text{g}$ - 하향 삼각형)으로 면역화된 마우스의 혈청에서 검출되지 않은 반면, 비면역화된 대조군(흰색 원)의 혈청에서는 종양 투여 후 2주 이내에 높은 수준의 sMICA가 검출되었다(도 9b 및 9c 참고).

[0162] 실시예 8: MICAA3 백신 단독은 MICA 특이적 항체의 높은 역가를 유도한다

- [0163] MICA 특이적 단클론 항체 반응을 생성하는데 있어서 MICA α 3 백신 단독(페리틴 없음)의 효과를 결정하기 위해, 8개의 잠재적인 N-당화 부위 중 7개를 Asp 또는 Gln으로 돌연변이시켜 MICA α 3 유전자의 탈당화된 형태를 생성하였다. 방법 섹션에 기재된 바와 같이 단백질 생산 및 정제 후, 5mg의 MSR에 1 μ g GM-CSF, 100 μ g CpG-ODN 및 150 μ g의 탈당화된 MICA α 3 단백질(MICA α 3 백신으로 약칭됨)을 로딩하여 MICA α 3 백신을 제조하였다. 이후, 입자를 동결건조시키고, 차가운 PBS(150 μ l)에 재현탁시키고, 암컷 C57B1/6J 마우스의 옆구리로 피하주사하였다. MSR 스캐폴드가 없는 모든 백신 성분(볼루스)으로 면역화된 마우스 및 처리되지 않은, 연령 일치된 마우스를 대조군으로 사용하였다. 혈청을 후안와 출혈에 의해 매주 간격으로 수집하였다. 마우스에게 초기 면역화 후 28일에 부스트를 투여하였다.
- [0164] 이를 연구를 위해, 1×10^5 MICA009 발현 B16F10 흑색종 세포를 2시간 동안 100 μ l의 PBS에서 비면역화된 마우스(나이브), MSR이 없는 MICA α 3(볼루스) 또는 MICA α 3 백신(백신접종된)으로 면역화된 마우스의 1 μ l의 혈청으로 염색하였다. MICA의 α 1- α 2 도메인에 결합하는 상업적으로 이용가능한 단클론 항체 6D4를 양성 대조군(10 μ g)으로 사용하였다. PE 접합된 항마우스 IgG를 2차 항체로 사용하였다. 백신접종된 마우스 및 볼루스 그룹의 혈청에서 MICA α 3 특이적 항체는 종양 세포 표면에 발현된 MICA에 대한 유의한 결합을 나타내었고, 수준은 부스트 후 양성 대조군과 유사하였다(도 10a 참고).
- [0165] MICA α 3 면역화된 마우스의 혈청을 ELISA에서 시험하여 백신접종시 유도된 IgG의 상이한 서브클래스를 결정하였다. 비면역화된 마우스의 혈청을 대조군으로 사용하였다. 전장 MICA를 포획 항원으로 사용하였고, 1/1000의 혈청 희석액을 각 웰에서 사용하였다. HRP 접합된 항마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 IgG3을 검출에 사용하였다. MICA α 3 백신 및 볼루스 백신을 이용한 면역화는 MICA-페리틴 백신보다 더 높은 IgG1 수준으로 시험된 모든 IgG 서브클래스의 생산을 유도하는 것으로 나타났다(도 10b 참고).
- [0166] **실시예 8: MICA α 3 백신 단독(페리틴 융합 없음)은 생체내에서 유의한 치료 이점을 나타낸다**
- [0167] 이를 연구를 위해, 8주령 C57B1/6J 암컷 마우스를 MICA α 3 백신 또는 MSR 스캐폴드가 없는 모든 백신 성분으로 구성되는 볼루스로 면역화시켰다. 처리되지 않은, 연령 일치된 C57B1/6J 암컷 마우스를 대조군으로 사용하였다. 부스트 3주 후, 마우스에게 0.5×10^6 MICA 발현 B16F10 흑색종 세포의 정맥내 주사를 투여하였다. 마우스를 종양 투여 후 14일에 안락사시키고; 폐를 수확하고, 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키고, 폐 전이의 수를 정량화하였다. MICA α 3 백신접종된 마우스는 처리되지 않은, 연령 일치된 대조군과 비교하여 종양이 거의 없었다. 폐 전이의 수는 비면역화된 그룹(~200-250)과 비교하여 볼루스 그룹(~100-125)에서 유의하게 더 낮았다(도 11a 참고).
- [0168] sMICA는 MICA α 3 백신으로 면역화된 마우스(삼각형)의 혈청에서 검출되지 않은 반면, 종양 투여 후 2주 이내에 처리되지 않은 대조군(circle)에서는 sMICA의 상승된 수준이 발견되었다. 볼루스 그룹은 대조군과 비교하여 혈청에서 상대적으로 더 낮은 수준의 sMICA(정사각형)를 가지고 있었다(도 11b 참고). 백신접종된 그룹과 비교하여 MICA α 3 볼루스로 면역화된 마우스에서 폐 전이의 증가된 수 및 sMICA 수준은 백신접종된 그룹과 비교하여 초기 면역화 후 62일까지 MICA 특이적 항체 역가의 감소의 관찰된 수준 때문일 가능성이 높다(데이터는 나타내지 않음).
- [0169] **실시예 9: 백신 효능에 필요한 세포독성 림프구 집단의 결정**
- [0170] mAb를 이용하여 CD8 T 세포 또는 NK 세포를 고갈시킴으로써, CD8 T 세포 및 NK 세포 모두가 백신의 치료 효과에 기여한다는 것이 밝혀졌다(도 13a-13b 및 14a-14b).
- [0171] **실시예 10: MIC 항체의 정량화를 위한 ELISA 분석**
- [0172] 백신에 의해 유도된 MIC 항체의 정량화를 위한 ELISA 분석을 사용한다(도 6).
- [0173] **실시예 11: 향후 연구**
- [0174] 다음은 백신 성능을 추가로 평가하기 위해 수행되는 향후 연구이다.
- [0175] 1. 백신 제제는 항원의 최적량을 시험하고, 2개의 보조제인 CpG 올리고뉴클레오타이드 및 폴리(I:C)를 비교함으로써 최적화될 것이다.
- [0176] 2. 백신의 효능은 다수의 종양 모델, 구체적으로 B16-MIC 흑색종 모델(피하 및 전이 모델) 및 전립선 암의 동소(orthotopic) TRAMP-MIC 모델에서 시험될 것이다. 이 연구는 혈청에서 종양 성장의 억제 및 탈락된 MIC의 감소

를 평가함으로써 백신 효능을 측정하는 것을 포함한다.

- [0177] 3. 유도된 MIC-특이적 항체가 백신에 의해 제공되는 예방에 충분한지 조사하기 위해, 혈청은 면역화된 마우스로부터 비면역화된 수여자에게 전달될 것이다.
- [0178] 4. 백신이 다른 종양 항원에 대한 CD8 T 세포 반응의 유도로 인해 MIC 발현이 결여된 종양 세포에 의한 2차 공격에 대한 예방을 제공하는지의 결정. B16-MIC 전이 모델에서 생존한 마우스에게 MIC를 발현하거나 발현하지 않는 B16 종양 세포의 고용량의 정맥내 주사가 투여될 것이다.
- [0179] 유도된 항체의 기계적 활성을 반영하는 바이오마커의 추가 조사가 수행될 것이다. 이들은 하기 접근법을 포함할 것이다.
- [0180] 1. 혈청 내의 탈락된 MIC에 대한 ELISA 분석; 분석은 이용가능하며 진행암 환자의 혈청 샘플을 사용하여 엄격하게 시험될 것이다.
- [0181] 2. 유도된 MIC α3 도메인 항체의 기능적 활성의 시험. 어떤 인간 종양 세포주가 MIC 탈락의 항체 매개 억제를 평가하는 분석(세포주의 패널이 이용가능함)에 대해 최적인지 연구될 것이다.
- [0182] 3. 말초 혈액 및 종양 생검에서 면역 세포의 유세포 분석. CD8 T 세포 및 NK 세포에 의한 표면 NKG2D 수준의 정량이 특히 중요하며; 항체는 이용가능하고 패널은 최적화될 것이다.
- [0183] 실시예 12: 폐리틴(*H. Pylori*)에 융합된 MICA002 알파 3의 배클로바이러스 발현
- [0184] 목적: 폐리틴 나노입자에 융합된 MICA(002) 알파 3의 곤충 세포 발현
- [0185] 일반적인 설계:
- [0186] 신호 웹타이드, 6 히스 태그, 링커, N-말단 HA 웹타이드, MICA 알파 3 도메인(*002:01),
- [0187] GSG 링커, *H. pylori* 폐리틴, 정지 코돈

```

1      MVPCTLLLLL AAALAPQTR AHHHHHHHSKS YPYDVPDYAR 신호웹타이드, 6HIS,
링커, HA
41      TVPPPMVNTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG MICA 알파 3
81      VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT YQTWVATRIS QGEEQRFTCY
121     MEHSGGNHSTH PVPSGKVVLV L QSHWQTFHGS QDIIKLLNEQ 링커, 폐리틴
161     VNKEMQSSNL YMSMSSWCYT HSLDGAGLFL FDHAAEYEH
201     AKKLIIFLNE NNVPVQLTSI SAPEHKFEGL TQIFQKAYEH
241     EQHISESINN IVDHAIKSKD HATFNFLQWY VAEQHEEEVL
281     FKDILDKIEL IGNENHGLYL ADQYVKGIAK SRKS* (서열 목록 5)

```

- [0188] [0189] 전략: SmaI 및 BamHI 부위 사이에서 pacDB3 벡터 내로 클로닝
- [0190] 전략: pacDB3 벡터 내로 클로닝
- [0191] DNAMAN18(1-945)의 번역
- [0192] 유니버설 코드
- [0193] 총 아미노산 수: 314, MW=35668

[0194]

Max ORF: 1-942, 314 AA, MW=35668

```

1      ATGGTCCCTGTACCTGCTGCTGCTGGCTGCTGCACGGCACCTACTCAGACTCGG
1      M V P C T L L L A A A L A P T Q T R

61      GCCCACCATCATCACCATCACTCAAAAAGTTACCCCTACGATGTCCCCGACTACGCCAGG
21      A H H H H H H S K S Y P Y D V P D Y A R

121     ACCGTGCCCTATGGTGAACGTCACACGCTCAGAAGCTAGCGAGGGCAATATCACCGTG
41     T V P P M V N V T R S E A S E G N I T V

181     ACATGCCGAGCATCTGGTTCTATCCTTGGAACATTACACTGAGTTGGAGGCAGGACGGG
61     T C R A S G F Y P W N I T L S W R Q D G

241     GTGTCCCTGTCTACGATACTCAGCAGTGGGGCGACGTGCTGCCAGATGGCAATGGGACC
81     V S L S H D T Q Q W G D V L P D G N G T

301     TACCAGACATGGTGGCTACTCGGATCTCCCAGGGGGAGGAACAGAGATTCACCTGCTAT
101    Y Q T W V A T R I S Q G E E Q R F T C Y

361     ATGGAGCATAGTGGAAACCACTCAACACATCCTGTGCCATCTGGCAAGGTGCTGGTCTG
121    M E H S G N H S T H P V P S G K V L V L

421     CAGAGTCACTGGCAGACATTCATGGATCAGCGATATCATTAAGCTGCTGAACGAACAG
141    Q S H W Q T F H S S G D I I K L L N E Q

481     GTGAACAAGGAGATGCAGTCTAGTAACCTGTACATGAGCATGTCAGCTGGTGTATAC
161    V N K E M Q S S N L Y M S M S S W C Y T

541     CACTCCCTGGACGGAGCCGGCTGTTGATCACGCCGTGAGGAATACGAACAT
181    H S L D G A G L F L F D H A A E E Y E H

601     GCTAAGAAACTGATCATTTCCTGAATGAGAACAAATGTGCCAGTCCAGTGAATGACTAC
201    A K K L I I F L N E N N V P V Q L T S I

661     TCCGCACCCGAACACAAGTTCGAGGGCTGACCCAGATCTTCAGAAAGCTACGAACAC
221    S A P E H K F E G L T Q I F Q K A Y E H

721     GAGCAGCATATCTCTGAAAGTATCAACAAACATCGTGGACCACGCAATCAAGAGCAAAGAT
241    E Q H I S E S I N N I V D H A I K S K D

781     CATGCCACCTTCAACTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAGCAGCACGAGGAAGAGGTCTG
261    H A T F N F L Q W Y V A E Q H E E E V L

841     TTTAAGGACATTCTGGATAAAATCGAACTGATTGGCAATGAGAATCACGGCTGTACCTG
281    F K D I L D K I E L I G N E N H G L Y L

901     GCAGATCAGTATGTCAAGGGCATCGAAAGTCAAGGAAATCATGA (서열번호 6)
301     A D Q Y V K G I A K S R K S * (서열번호 7)

```

[0195]

[0196]

SEQ DNAMAN: 945 bp;

[0197]

조성 254 A; 252 C; 241 G; 198 T; 0 기타

[0198]

백분율: 26.9% A; 26.7% C; 25.5% G; 21.0% T; 0.0% 기타

[0199]

분자량 (kDa): ssDNA: 291.81 dsDNA: 582.6

[0200]

기원

```

1      ATGGTCCCCT GTACCCCTGCT GCTGCTGCTG GCTGCTGCAC TGGCACCTAC
TCAGACTCGG
61     GCCCACCATC ATCACCATCA CTCAAAAAGT TACCCCTACG ATGTCCCCGA
CTACGCCAGG
121    ACCGTGCCCT CTATGGTGAA CGTCACACGC TCAGAAGCTA GCGAGGGCAA
TATCACCGTG
181    ACATGCCGAG CATCTGGTT CTATCCTTGG AACATTACAC TGAGTTGGAG
GCAGGACGGG
241    GTGTCCCTGT CTCACGATAC TCAGCAGTGG GGCGACGTGC TGCCAGATGG
CAATGGGACC
301    TACCAAGACAT GGGTGGCTAC TCGGATCTCC CAGGGGGAGG AACAGAGATT
CACCTGCTAT
361    ATGGAGCATA GTGGAAACCA CTCAACACAT CCTGTGCCAT CTGGCAAGGT
GCTGGTCCTG
421    CAGAGTCACT GCCAGACATT TCATGGATCA GGCGATATCA TTAAGCTGCT
GAACGAACAG
481    GTGAACAAGG AGATGCAGTC TAGTAACCTG TACATGAGCA TGTCAAGCTG
GTGTATAC
541    CACTCCCTGG ACGGAGCCGG CCTGTTCCCTG TTTGATCACG CCGCTGAGGA
ATACGAACAT
601    GCTAAGAAAC TGATCATTTC CCTGAATGAG AACAAATGTGC CAGTCCAGCT
GACTAGCATT
661    TCCGCACCCG AACACAAGTT CGAGGGCCTG ACCCAGATCT TTCAGAAAGC
CTACGAACAC
721    GAGCAGCATA TCTCTGAAAG TATCAACAAAC ATCGTGGACC ACGCAATCAA
GAGCAAAGAT
781    CATGCCACCT TCAACTTCT GCAGTGGTAC GTGGCCGAGC AGCACGAGGA
AGAGGTCCCTG
841    TTTAAGGACA TTCTGGATAA AATCGAACTG ATTGGCAATG AGAATCACGG
GCTGTACCTG
901    GCAGATCAGT ATGTCAAGGG CATCGAAAG TCAAGGAAAT CATGA (서열번호 8)

```

[0201]

단계 1. 프라이머를 사용하여 C1347 구조물로부터 PCR 1을 위한 주형(신호 웹타이드, 6 히스, 링커, HA, MICA 알파3)을 증폭한다

[0202]

정방향 프라이머# ferritin_baculo_SmaIfor

5' **AAAAAAACCCGGGATGGTCCCCTGTACCCCTGCTGCTGCTGC** 3' (서열번호 9)

[0204]

내부 역방향 프라이머: # ferritin_baculo_IRev

[0206]

5' GTTCGTTCAGCAGCTTAATGATATCGCCTGATCCATGAAATGTCTGCCAG 3'(서열번호 10)

[0207]

단계 2. 하기를 사용하여 C1347로부터 PCR 2를 위한 주형(페리틴)을 증폭한다:

[0208]

내부 정방향 프라이머: # ferritin_baculo_IF

[0209]

5' CTGGCAGACATTCATGGATCAGCGATATCATTAAAGCTGCTGAACGAAC 3'(서열번호 11)

[0210]

역방향 프라이머: # ferritin_baculo_BamHIVRev

5' **AAAAAAAGGATCCTCATGATTTCCCTTGACTTGCATGCCCTTG** 3' (서열번호 12)

[0211]

단계 3: 프라이머를 사용한 융합 PCR

[0213]

ferritin_baculo_SmaIfor

[0214]

및

[0215]

ferritin_baculo_BamHIVRev

[0216]

DNAMAN18에 대한 제한 분석

[0217]

메틸화: dam-No dcm-No

[0218] 117 효소를 이용하여 스크리닝됨, 18 부위가 확인됨

ApaI	1	GGGCC/C
	63	
BclI	2	T/GATCA
	573	611
BglII	1	A/GATCT
	695	
BsiI	2	C/TCGTG
	718	823
Bsp1407I	1	T/GTACA
	509	
BspHI	1	T/CATGA
	940	
BspMI	1	ACCTGCNNNN/ (서열번호 13)
	361	
Eam1105I	1	GACNNN/NNGTC (서열번호 14)
	240	
Eco56I	1	G/CCGGC
	556	
EcoNI	1	CCTNN/NNNAGG (서열번호 15)
	841	
EcoRV	1	GAT/ATC
	456	
NaeI	1	GCC/GGC
	558	
NheI	1	G/CTAGC
	157	
PstI	2	CTGCA/G
	422	803
PvuII	1	CAG/CTG
	648	

[0219]

부위 순서별 목록

63	ApaI	456	EcoRV	611	BclI	803
PstI						
157	NheI	509	Bsp1407I	648	PvuII	823
BsiI						
240	Eam1105I	556	Eco56I	695	BglII	841
EcoNI						
361	BspMI	558	NaeI	718	BsiI	940
BspHI						
422	PstI	573	BclI			

[0221]

[0222]

비절단 효소

AatII	Acc65I	AccIII	AclI	AflII	AgeI
AhaIII	Alw44I	AlwNI	ApaBI	ApaLI	AsCI
Asp718I	AsuII	AvrII	BalI	BamHI	BbeI
BbvII	BglI	Bpu102I	Bsc91I	BsmI	BspMII
BssHII	BstD102I	BstEII	BstXI	Bsu36I	ClaI
Csp45I	CspI	CvnI	DraI	DraIII	DrdI
EagI	Ecl136II	Eco31I	Eco47III	Eco52I	Eco57I
Eco72I	EcoICRI	EcoRI	EheI	EspI	FseI
HindIII	HpaI	I-PpoI	KpnI	MfeI	Mlu113I
MluI	MscI	MstI	MstII	NarI	NcoI
NdeI	NotI	NruI	NsiI	PacI	PflMI
PinAI	PmaCI	PmeI	PvuI	RleAI	SacI
SacII	SalI	SapI	SauI	Scal	SciI
SfiI	SgrAI	SmaI	SnaBI	SpeI	SphI
SpI	SpoI	SrfI	SspI	SstI	SstII
StuI	SunI	Swal	Tth111I	VspI	XbaI
XcmI	XhoI	XmaI	XmaIII	XmnI	XorII

[0223]

[0224]

H. Pylori의 폐리틴

MLSKDI₁KLNEQVNKEM₂SSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIF
 LNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFL
 QWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKIGAKSRKS 181 (서열번호 16)

[0225]

[0226]

위치 N19는 Q로 변화하였고(N-연결 당화 부위를 제거하기 위해), 위치 5(밑줄쳐 있음)에서 시작한다

ferritin [Helicobacter pylori]
 NCBI Reference Sequence: WP_000949190.1
 FASTA Graphics
 Go to:
 LOCUS WP_000949190 167 aa linear BCT
 16-MAY-2013
 DEFINITION ferritin [Helicobacter pylori].
 ACCESSION WP_000949190
 VERSION WP_000949190.1 GI:446871934
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Helicobacter pylori
 ORGANISM Helicobacter pylori
 Bacteria; Proteobacteria; Epsilonproteobacteria;
 Campylobacterales;
 Helicobacteraceae; Helicobacter.
 COMMENT REFSEQ: This record represents a single, non-redundant,
 protein sequence which may be annotated on many different RefSeq
 genomes from the same, or different, species.
 COMPLETENESS: full length.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..167
 /organism="Helicobacter pylori"
 /db_xref="taxon:210"
 Protein 1..167
 /product="ferritin"
 /calculated_mol_wt=19183
 Region 3..158
 /region_name="Nonheme_Ferritin"
 /note="nonheme-containing ferritins; cd01055"
 /db_xref="CDD:153113"
 Region 7..144
 /region_name="Ferritin"
 /note="Ferritin-like domain; pfam00210"
 /db_xref="CDD:249681"
 Site order(17,49..50,53,94,126,129..130)
 /site_type="other"
 /note="ferroxidase diiron center [ion binding]"
 /db_xref="CDD:153113"
 ORIGIN
 1 mlskdi₁ll neqvnkemns snlymsmssw cythsldgag lflfdhaaee
 yehakkiif
 61 lnennvpvql tsisapehkf egltgifqka yeheqhises innivdhaik
 skdhatfnl
 121 qwyvaeqhee evlfkdildk ielignenhg lyladqyvkg iaksrks (SEQ ID
 NO: 17)

[0227]

- [0228] 실시예 11: 곤충 세포에서 탈당화된 MICA 002 단백질 발현
- [0229] 목적: 탈당화된 MICA 알파 3(*002:01)의 배콜로바이러스 발현
- [0230] 일반적인 설계:
- [0231] 신호 펩타이드, N-말단 HA 펩타이드, MICA 알파 3 도메인 (*002:01), 정지 코돈
- 1 MVPCTLLLLL AAALAPQTQTR ASKSYPYDVP DYARTVPPMV QVTRSEASEG QITVTCRASG 신호
펩타이드, HA
61 FYPWNINLSW RQDGVSLSHD TQQWGDVLPD GNGTYQTWVA TRISQGEQR FTCYMEHSGQ MICA
알파 3
121 HSTHPVPSGK VLVLQSHWQT FH* stop (서열번호 25)
- [0232]
- [0233] 전략: pAcDB3 BglII-EcoRI 부위 내로 클로닝
- [0234] SEQ DNAMAN1: 432 bp;
- [0235] 조성 96 A; 125 C; 122 G; 89 T; 0 기타
- [0236] 백분율: 22.2% A; 28.9% C; 28.2% G; 20.6% T; 0.0% 기타
- [0237] 분자량 (kDa): ssDNA: 133.37 dsDNA: 266.4
- [0238] 기원
- 1 ATGGTCCCCT GTACCCTGCT GCTGCTGCTG GCTGCTGCAC TGGCACCTAC TCAGACTCGG
61 GCCTAAAAAA GTTACCCCTA CGATGTCACAC GACTACGCCA GGACCGTGCC CCCTATGGTG
121 CAGGTACAC GCTCAGAACG TAGCGAGGGC CAAATCACCG TGACATGCCG AGCATCTGGG
181 TTCTATCCTT GGAACATTAA CCTGAGTTGG AGGCAGGACG GGGTGCCCT GTCTCACGAT
241 ACTCAGCAGT GGGGCGACGT GCTGCCAGAT GGCAATGGGA CCTACCCAGAC ATGGGTGGCT
301 ACTCGGATCT CCCAGGGGGA GGAACAGAGA TTCACCTGCT ATATGGAGCA TAGTGGACAG
361 CACTAACAC ATCCTGTGCC ATCTGGCAAG GTGCTGGTCC TGCAGAGTCAGA CTGGCAGACAG
421 TTTCATATTGA (서열번호 18)
- [0239]
- [0240] DNAMAN1(1-432)의 번역
- [0241] 유니버설 코드
- [0242] 총 아미노산 수: 143, MW=15928
- [0243] 최대 ORF: 1-429, 143 AA, MW=15928
- 1 ATGGTCCCCTGTACCCTGCTGCTGCTGGCTGCTGCAC TGGCACCTACTCAGACTCGG
1 M V P C T L L L L A A A L A P T Q T R
61 GCCTCAAAAAGTTACCCCTACGATGTCACCGACTACGCCAGGACCGTGCCCCCTATGGTG
21 A S K S Y P Y D V P D Y A R T V P P M V
121 CAGGTACAC GCTCAGAACG TAGCGAGGGCAAATCACCGTGACATGCCGAGCATCTGGG
41 Q V T R S E A S E G Q I T V T C R A S G
181 TTCTATCCTTGGAACATTAAACCTGAGTTGGAGGCAGGACGGGTGTCCCTGTCTCACGAT
61 F Y P W N I N L S W R Q D G V S L S H D
241 ACTCAGCAGTGGGCGACGTGCTGCCAGATGGCAATGGCACCTACCAAGACATGGGTGGCT
81 T Q Q W G D V L P D G N G T Y Q T W V A
301 ACTCGGATCTCCCAGGGGAGGAACAGAGATTCACCTGCTATATGGAGCATAGTGGACAG
101 T R I S Q G E E Q R F T C Y M E H S G Q
361 CACTAACACATCCTGTGCCATCTGGCAAGGTGCTGGCCTGCAGAGTCACTGGCAGACA
121 H S T H P V P S G K V L V L Q S H W Q T
421 TTTCATATTGA (서열번호 19)
141 F H * (서열번호 20)
- [0244]
- [0245] DNAMAN1에 대한 제한 분석

[0246] 메틸화: dam-No dcm-No

[0247] 117 효소를 이용하여 스크리닝됨, 5 부위가 확인됨

BspMI 2 ACCTGCNNN/ (서열번호 21)
343 111

Eam1105I 1 GACNNN/NNGTC (서열번호 22)

222

NheI 1 G/CTAGC
139

PstI 1 CTGCA/G
404

[0248]

부위 순서별 목록

111	BspMI	222	Eam1105I	343	BspMI	404	PstI
139	NheI						

[0250]

비절단 효소

AatII	Acc65I	AccIII	AclI	AflII	AgeI
AhaIII	Alw44I	AlwNI	ApaBI	ApaI	ApaLI
AscI	Asp718I	AsuII	AvrII	BalI	BamHI
BbeI	BbvII	BclI	BglI	BglII	Bpu1102I
Bsc91I	BsiI	BsmI	Bsp1407I	BspHI	BspMII
BssHII	BstD102I	BstEII	BstXI	Bsu36I	ClaI
Csp45I	CspI	CvnI	DraI	DraIII	DrdI
EagI	Ecl136II	Eco31I	Eco47III	Eco52I	Eco56I
Eco57I	Eco72I	EcoICRI	EcoNI	EcoRI	EcoRV
EheI	EspI	FseI	HindIII	HpaI	I-PpoI
KpnI	MfeI	Mlu113I	MluI	MscI	MstI
MstII	NaeI	NarI	NcoI	NdeI	NotI
NruI	NsiI	PacI	PflMI	PinAI	PmaCI
PmeI	PvuI	PvuII	RleAI	SacI	SacII
SaiI	SapI	SauI	Scal	Scal	SfiI
SgrAI	SmaI	SnaBI	SpeI	SphI	SplI
SpoI	SrfI	SspI	SstI	SstII	StuI
SunI	SwaI	Tth111I	VspI	XbaI	XcmI
XbaI	XmaI	XmaIII	XmnI	XorII	

4099: MICA002_baculo_BglIIfor

5' AAAAAGATCTATGGTCCCTGTACCCTGCTGCTGC 3' (서열번호 23)

4100: MICA002_baculo_EcoRIRev

5' AAAAAGAATTCTCAATGAAATGTCTGCCAGTGACTCTGC 3' (서열번호 24)

[0252]

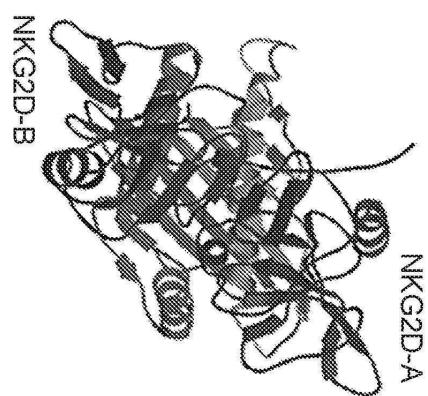
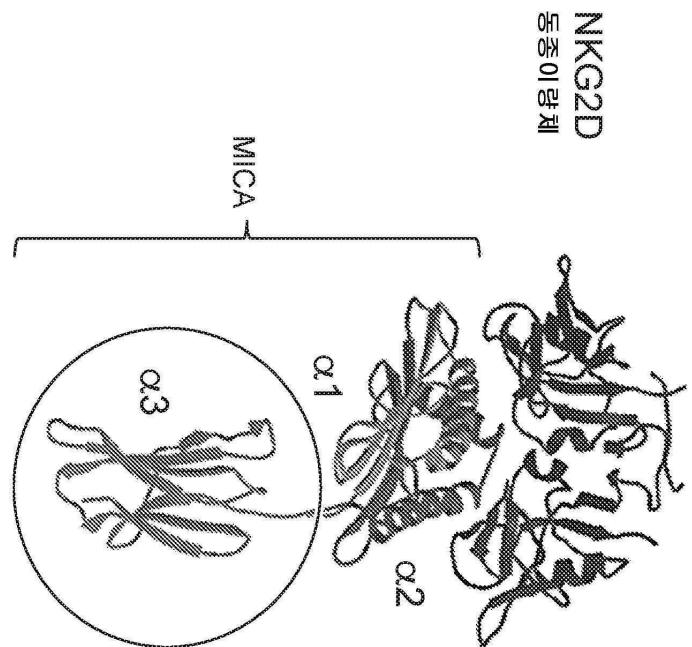
다른 구현예

[0253]

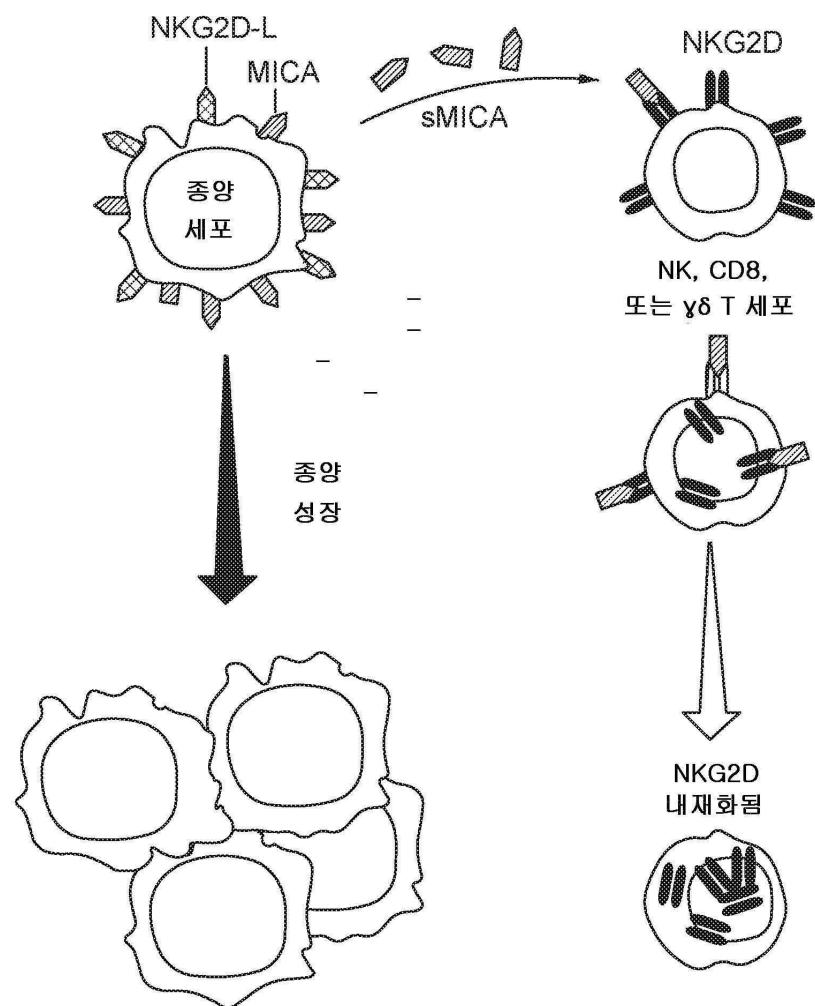
본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 전술한 설명은 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의된다. 다른 양태, 이점 및 변형은 하기 청구범위의 범위에 속한다.

도면

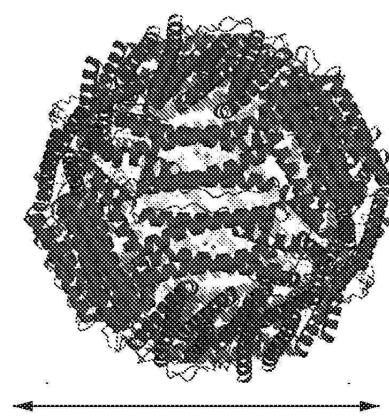
도면 1a



도면1b

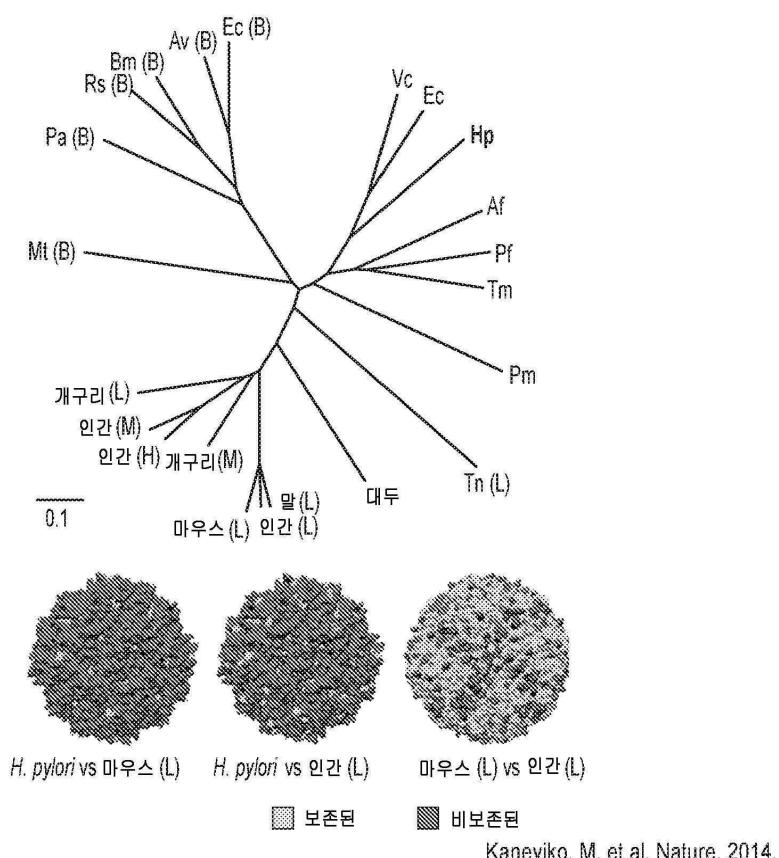


도면1c



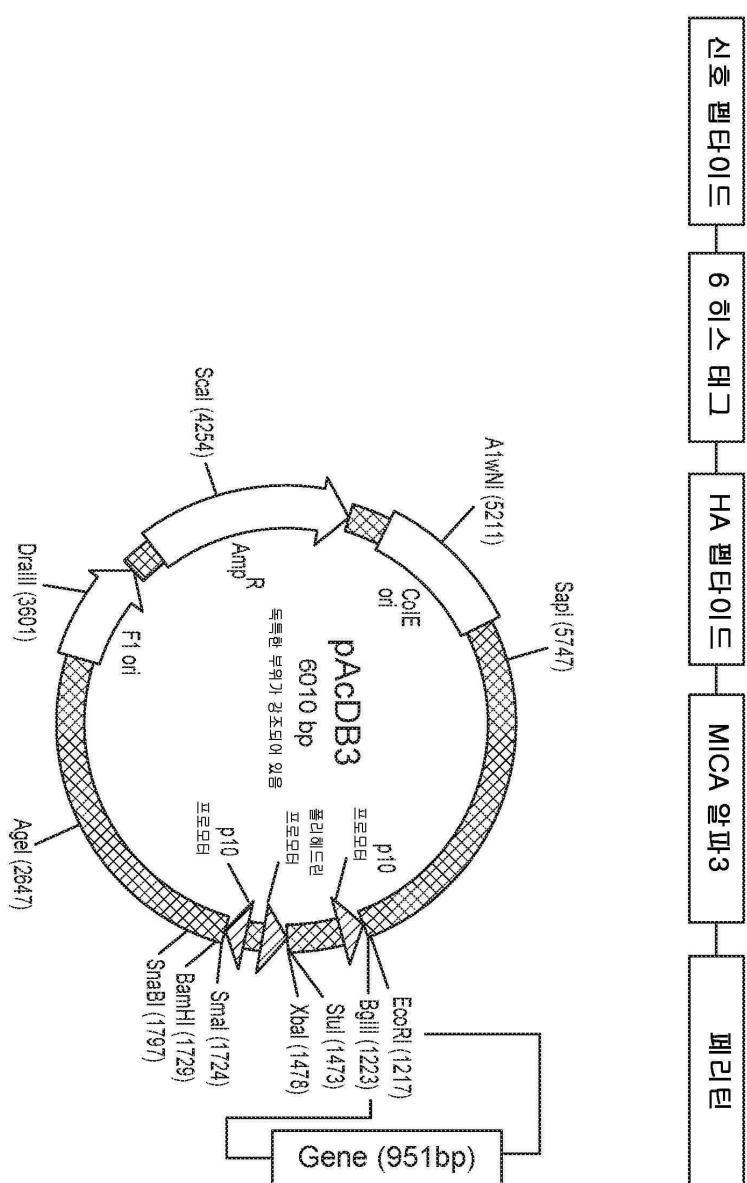
Kaneyiko, M. et al. Nature, 2014.

도면 1d

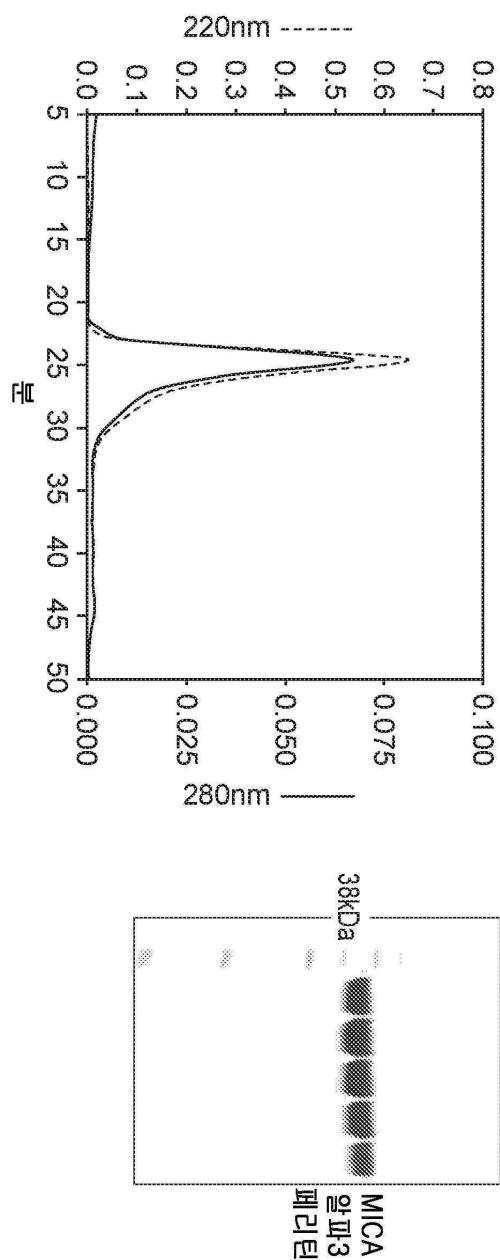


도면2a

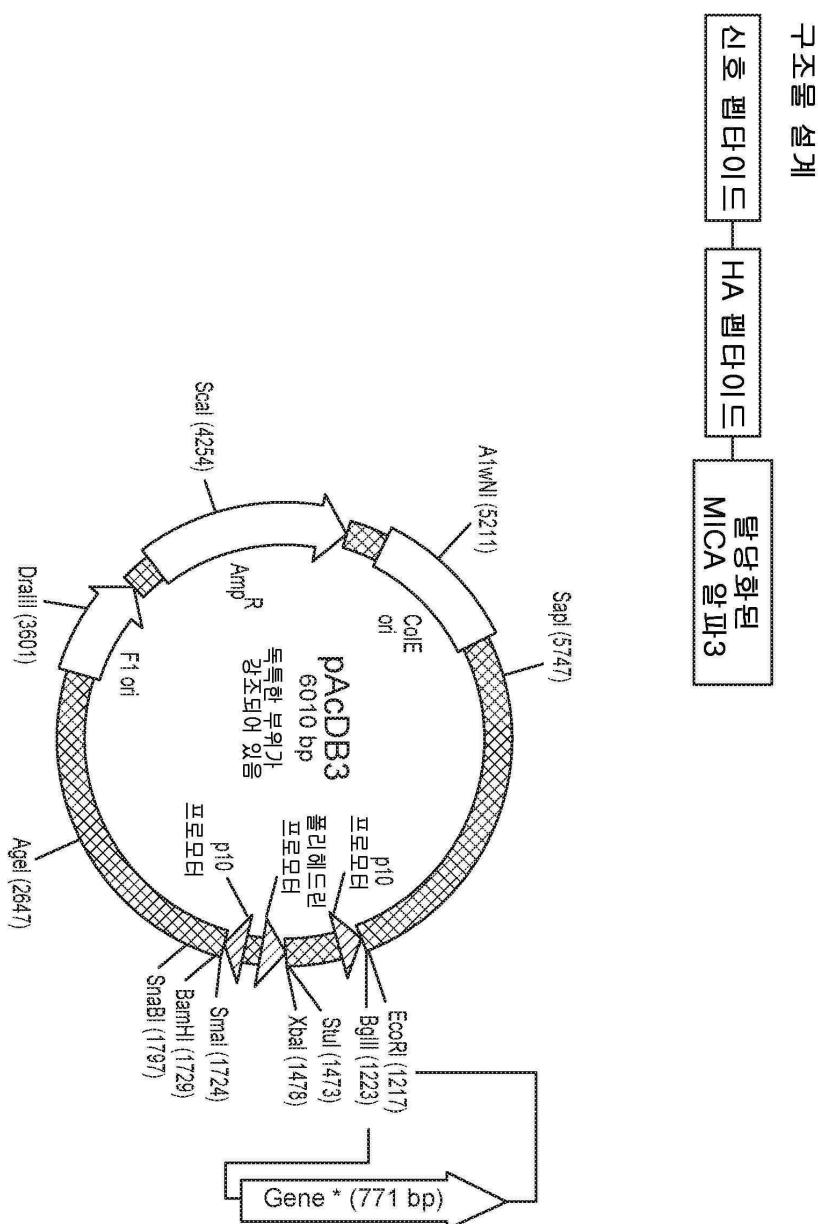
구조물 설계



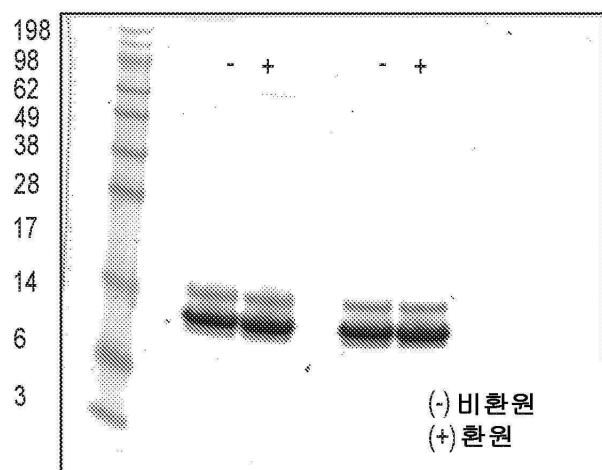
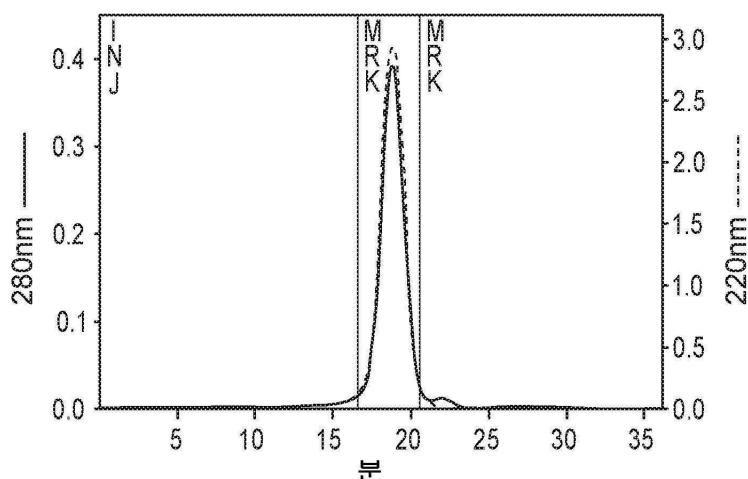
도면2b



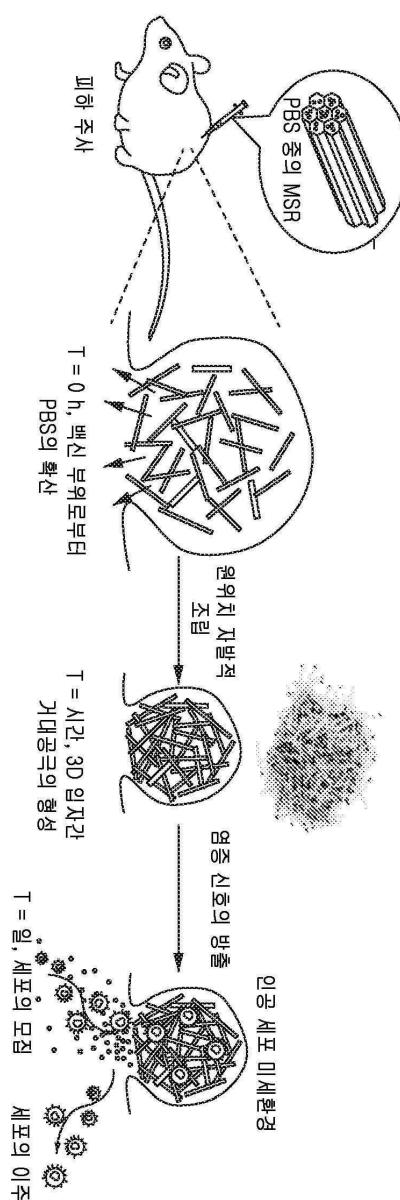
도면2c



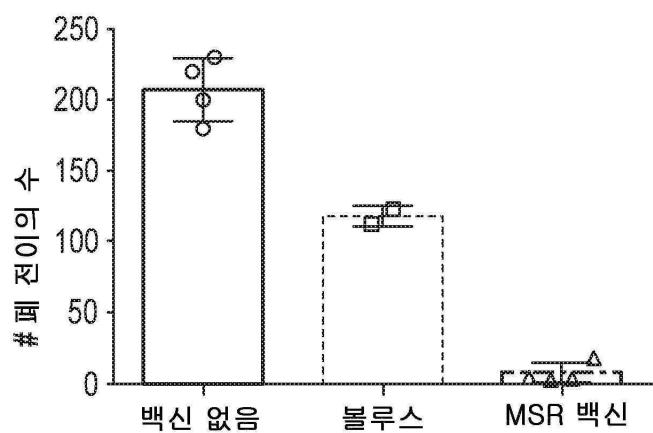
도면2d



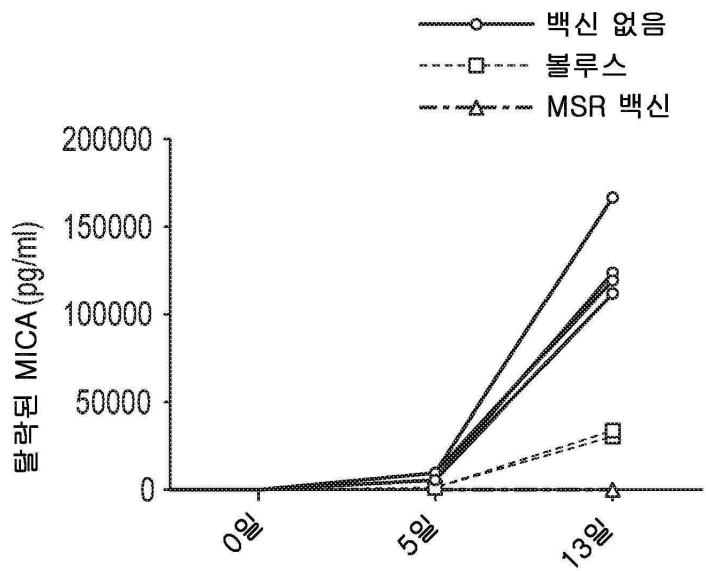
도면3



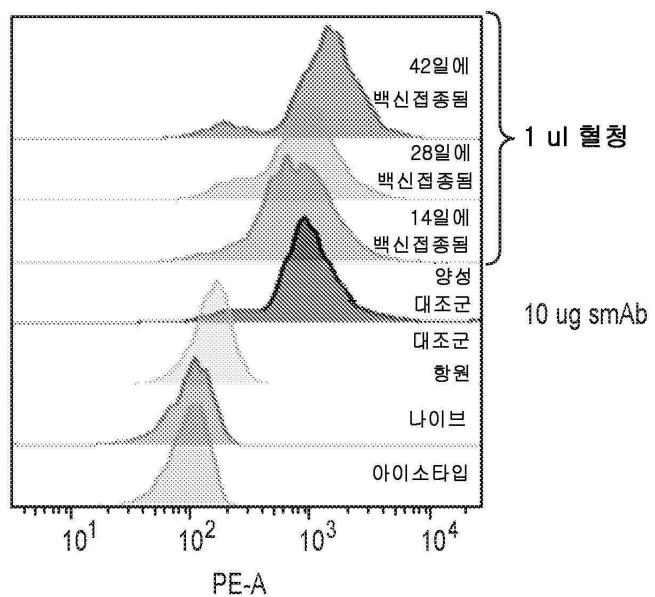
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

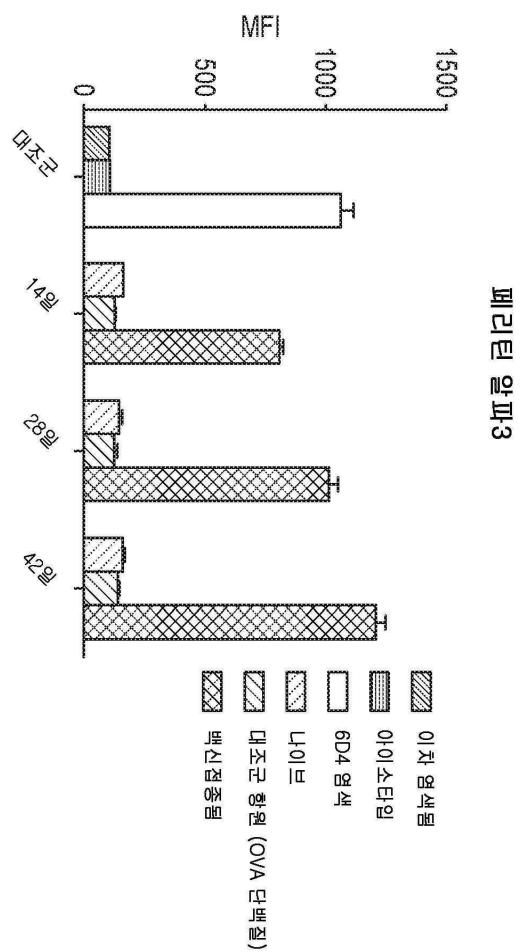
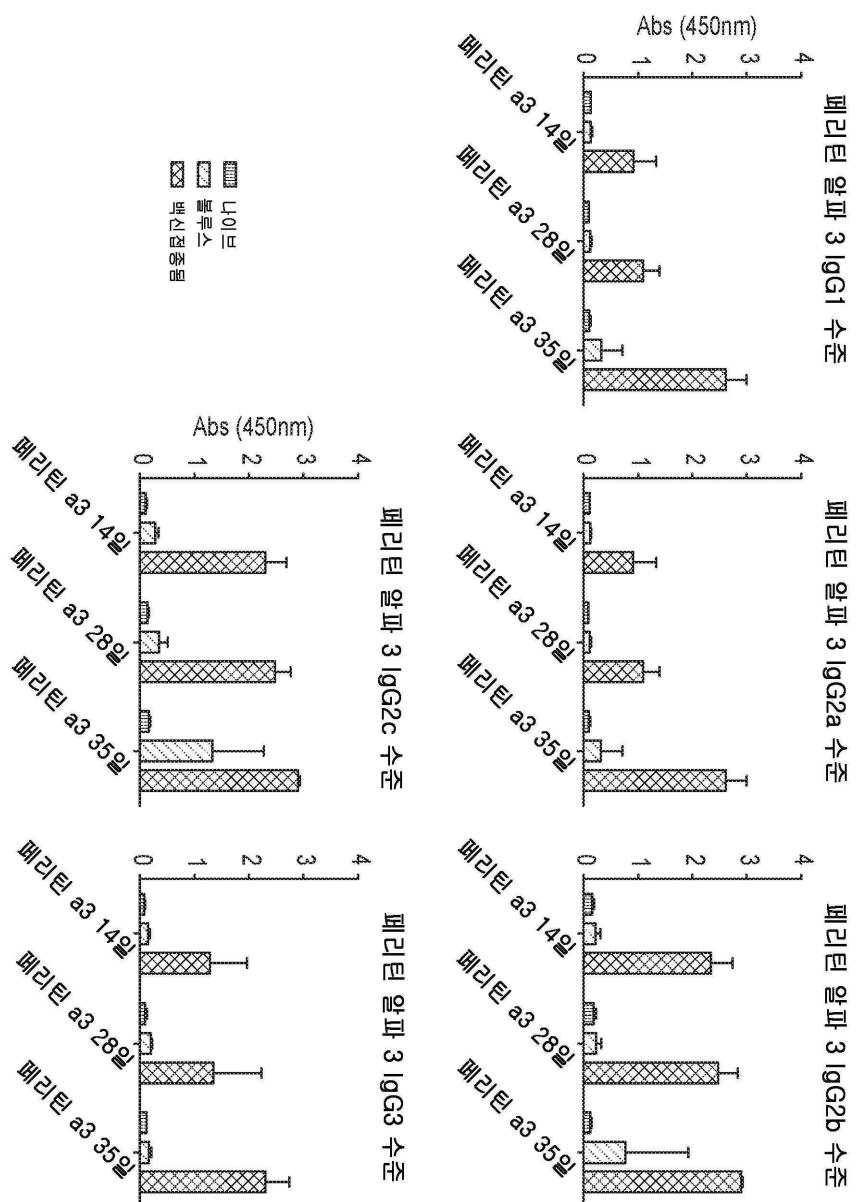
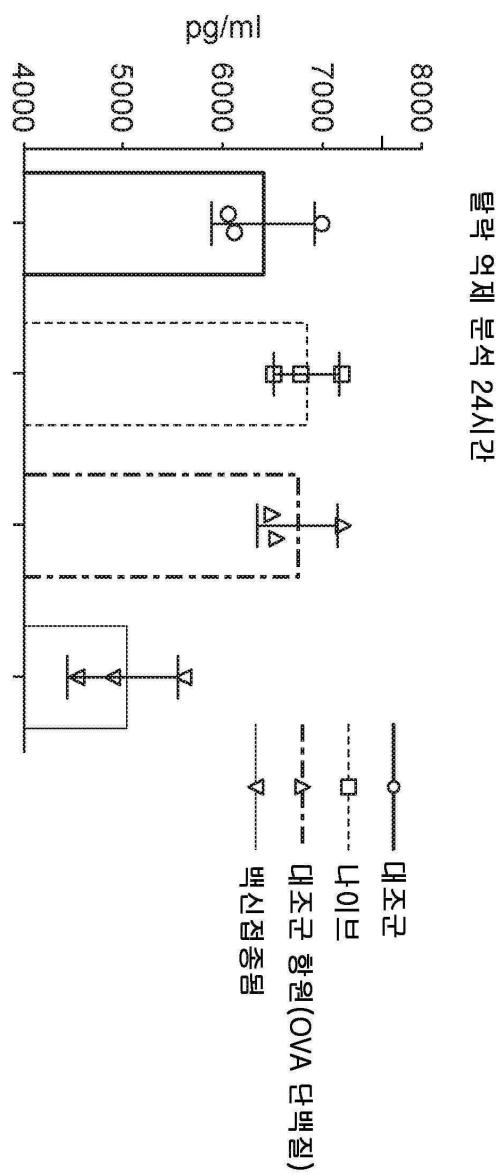


표 3

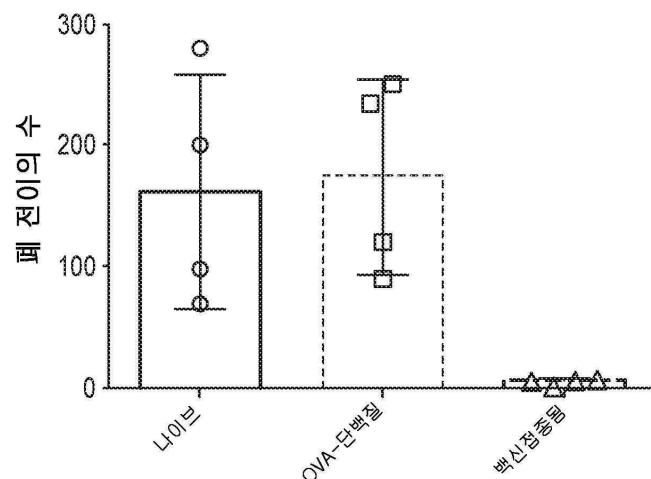
도면6



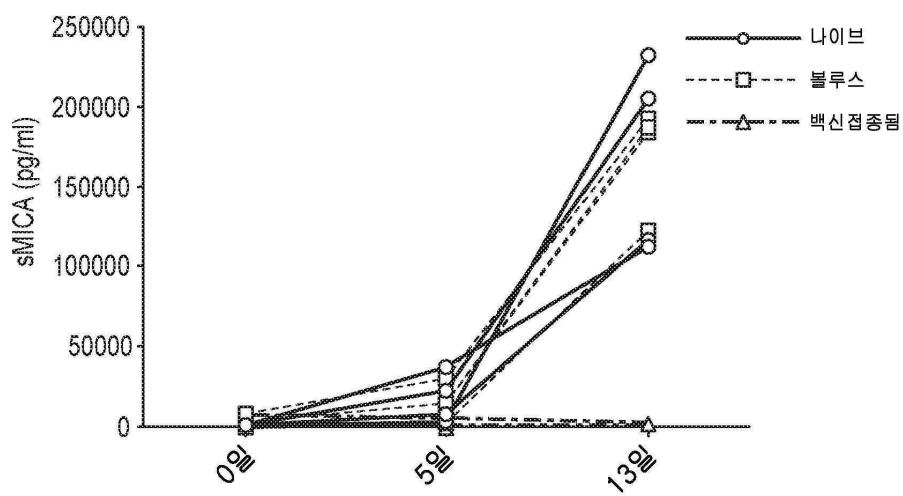
도면7



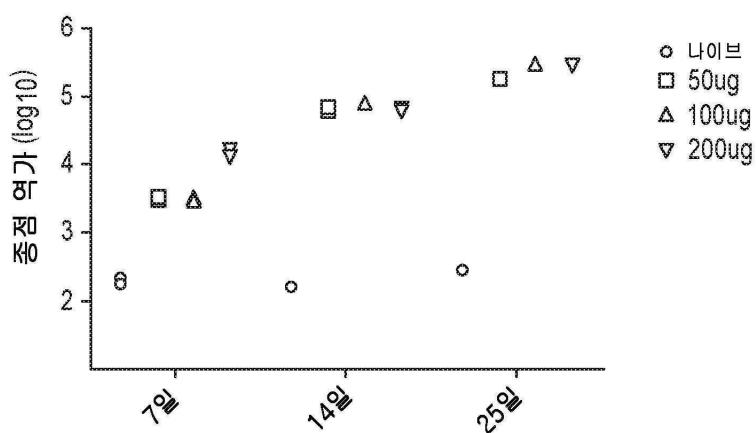
도면8a



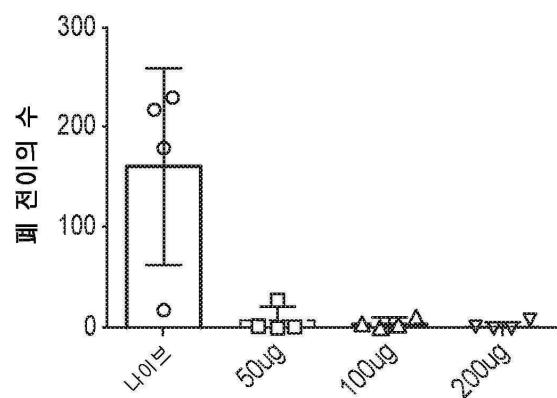
도면8b



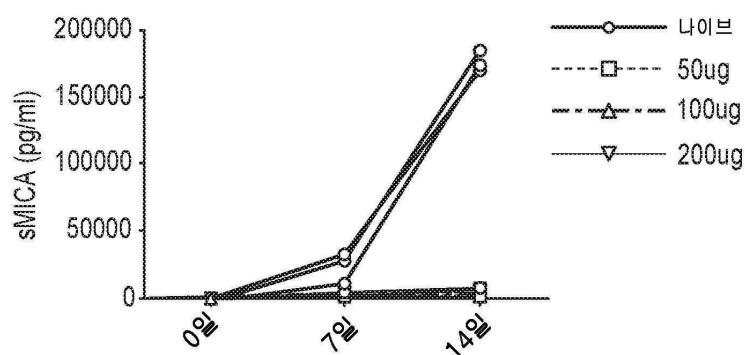
도면9a



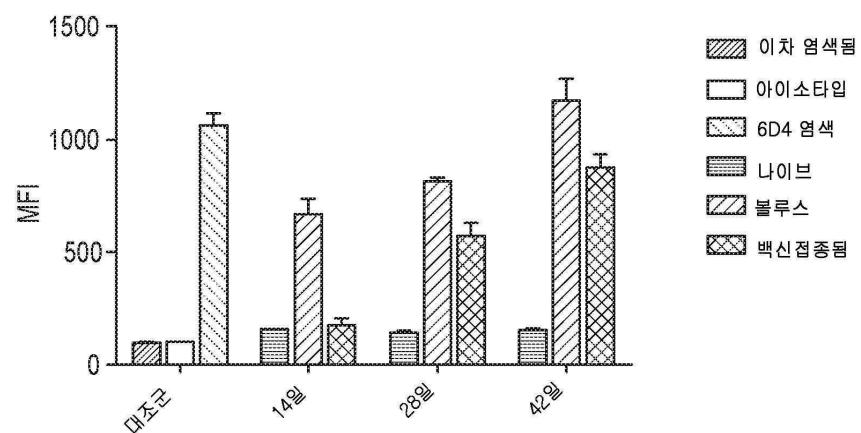
도면9b



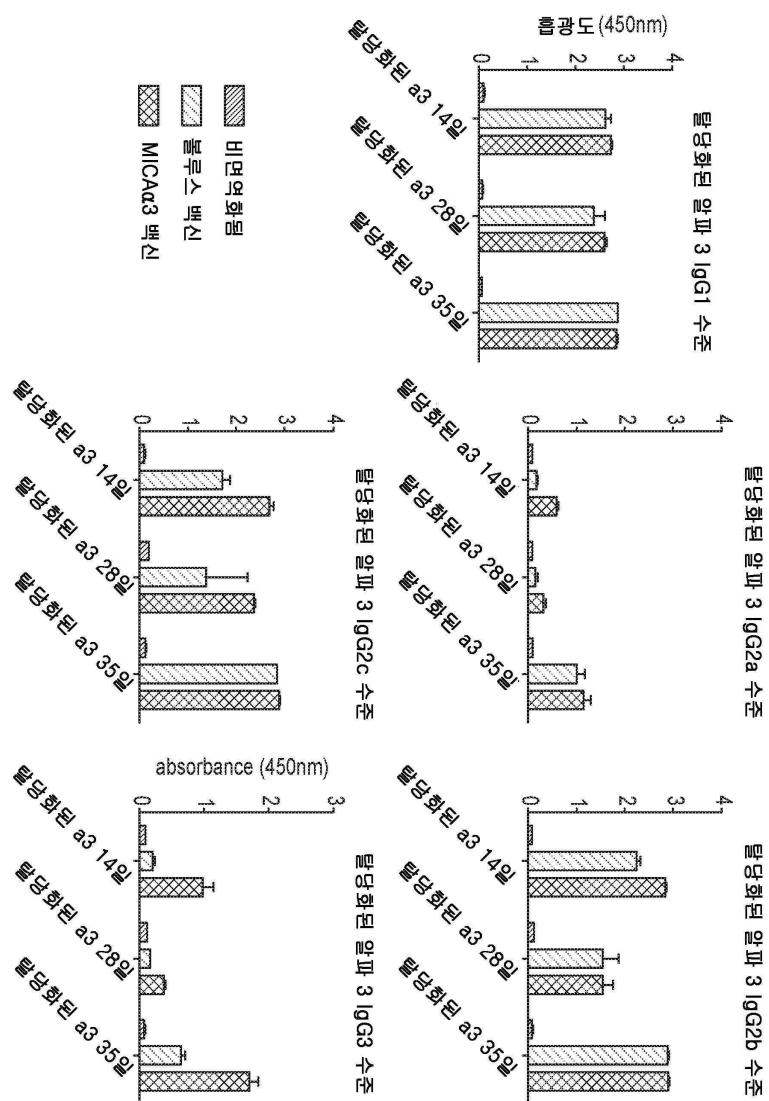
도면9c



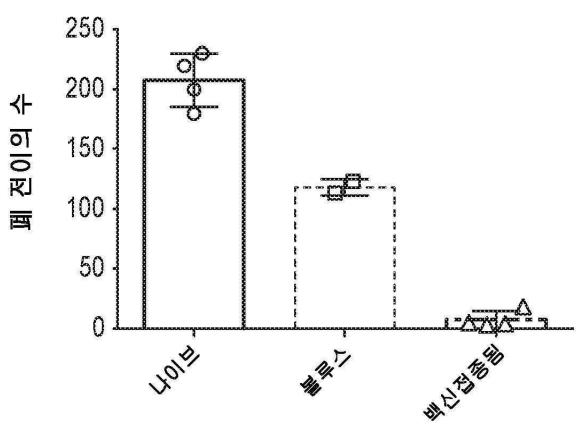
도면10a



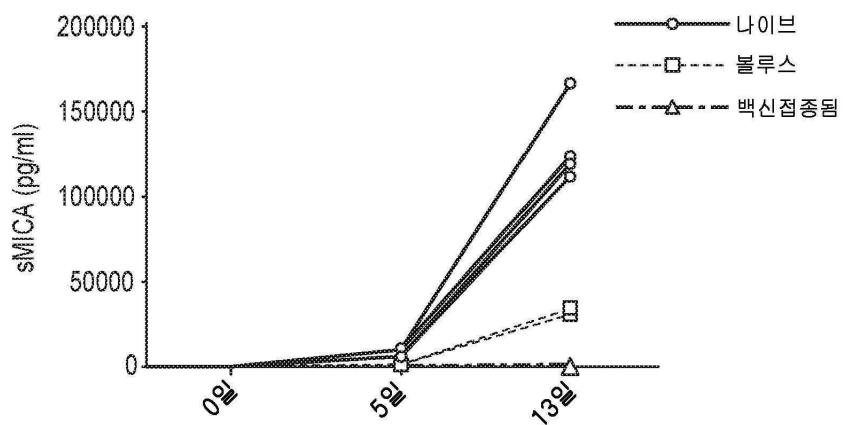
도면10b



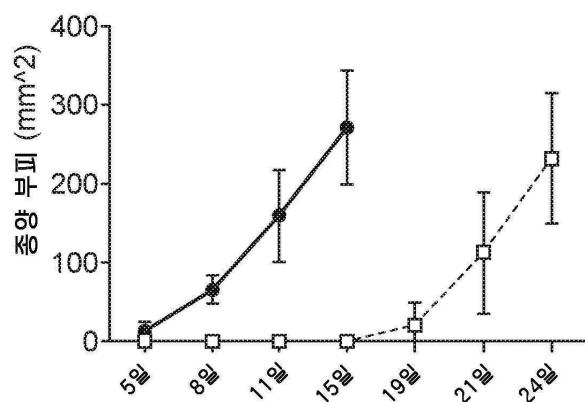
도면11a



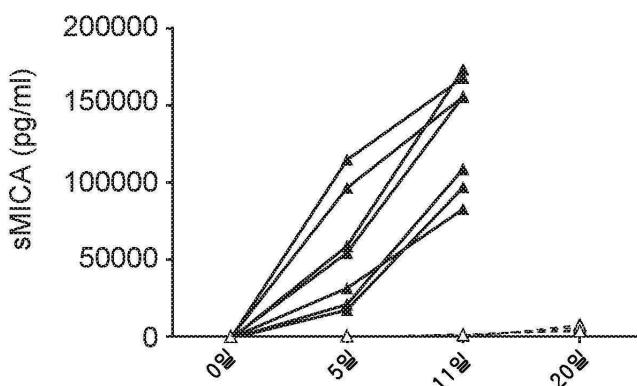
도면11b



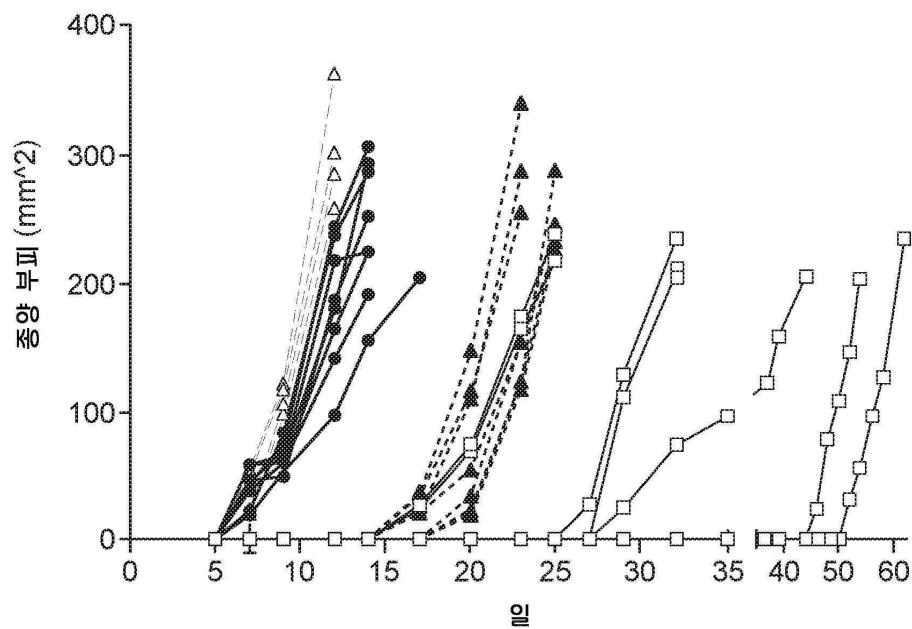
도면12a



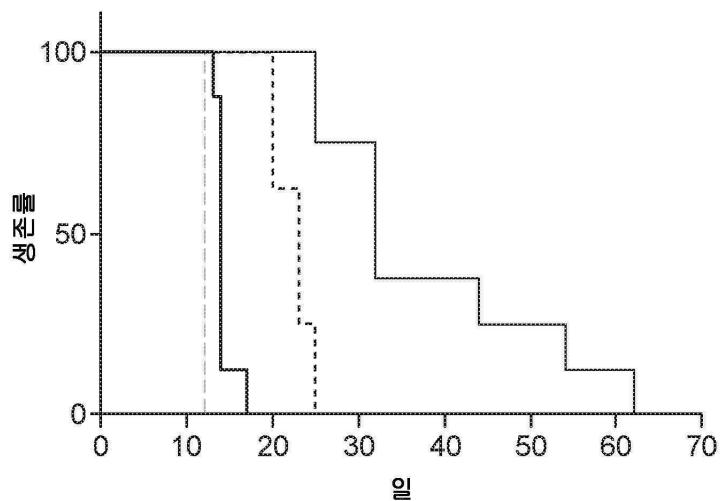
도면12b



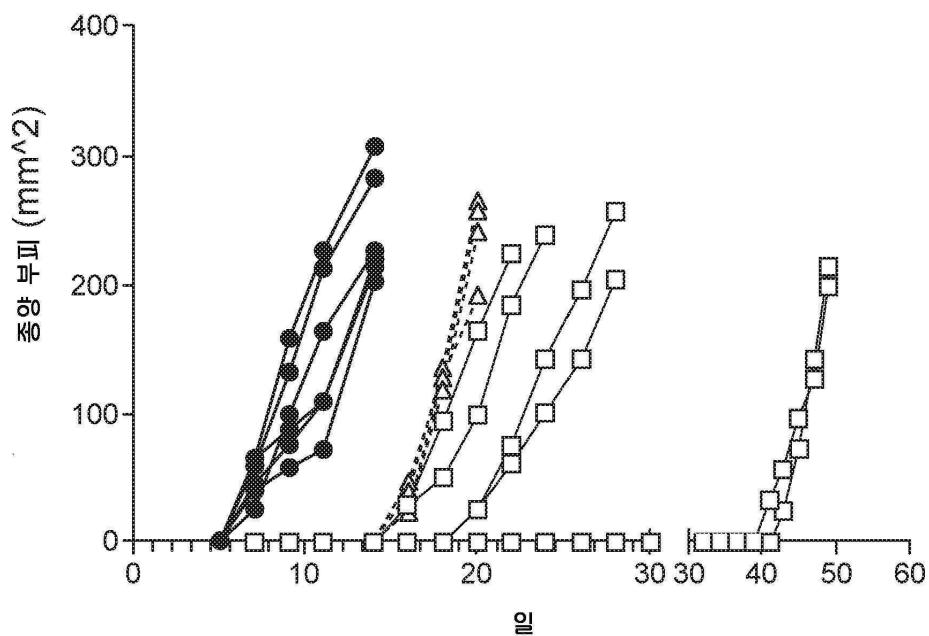
도면13a



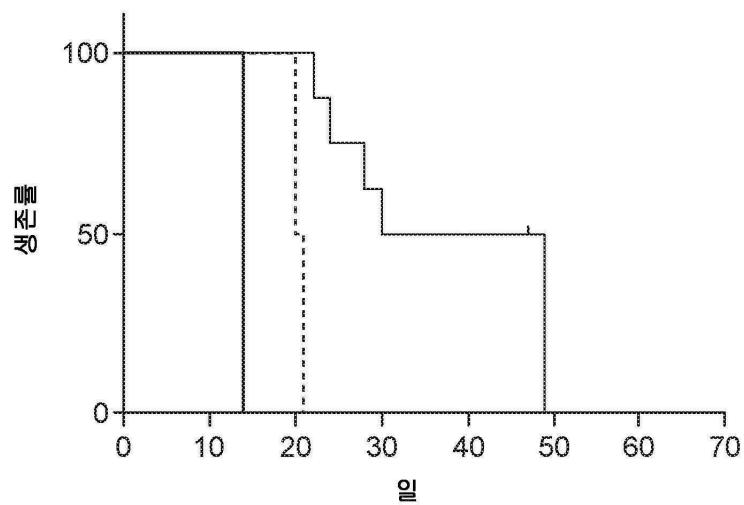
도면13b



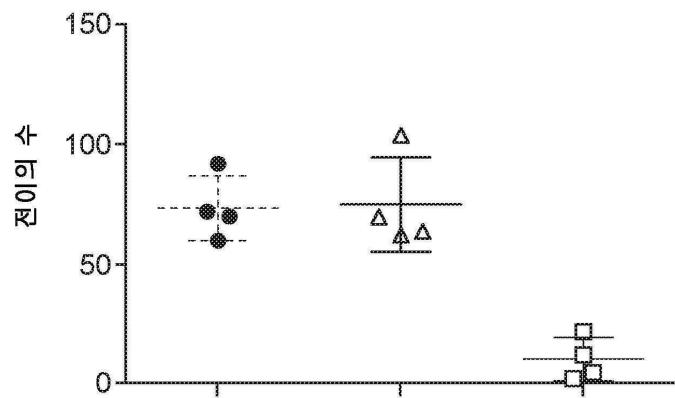
도면14a



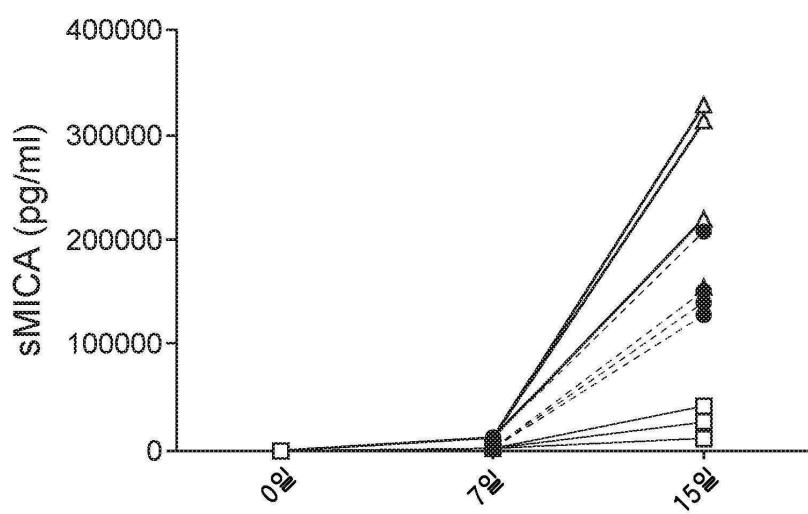
도면14b



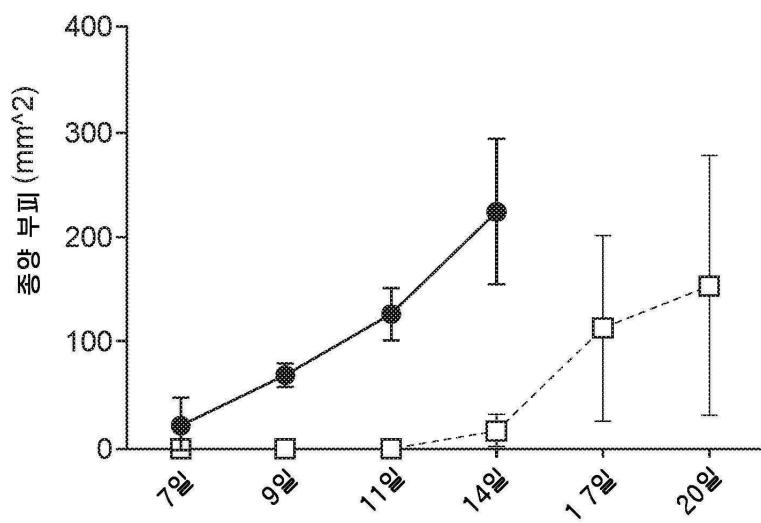
도면15a



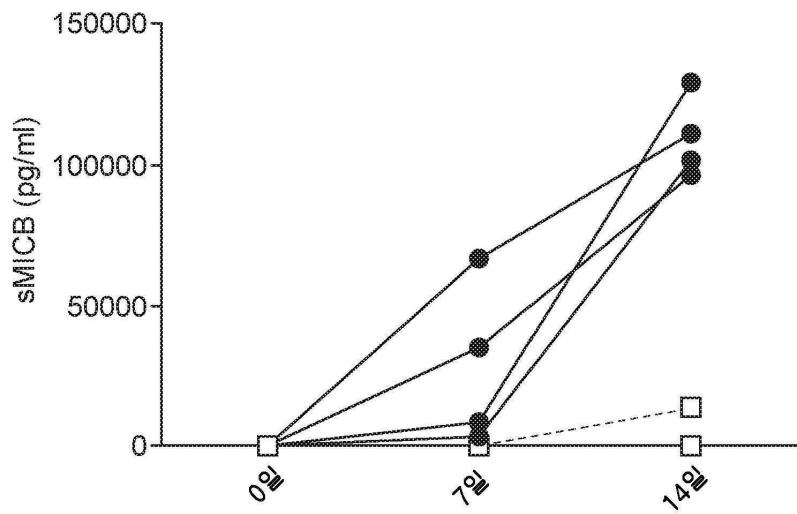
도면15b



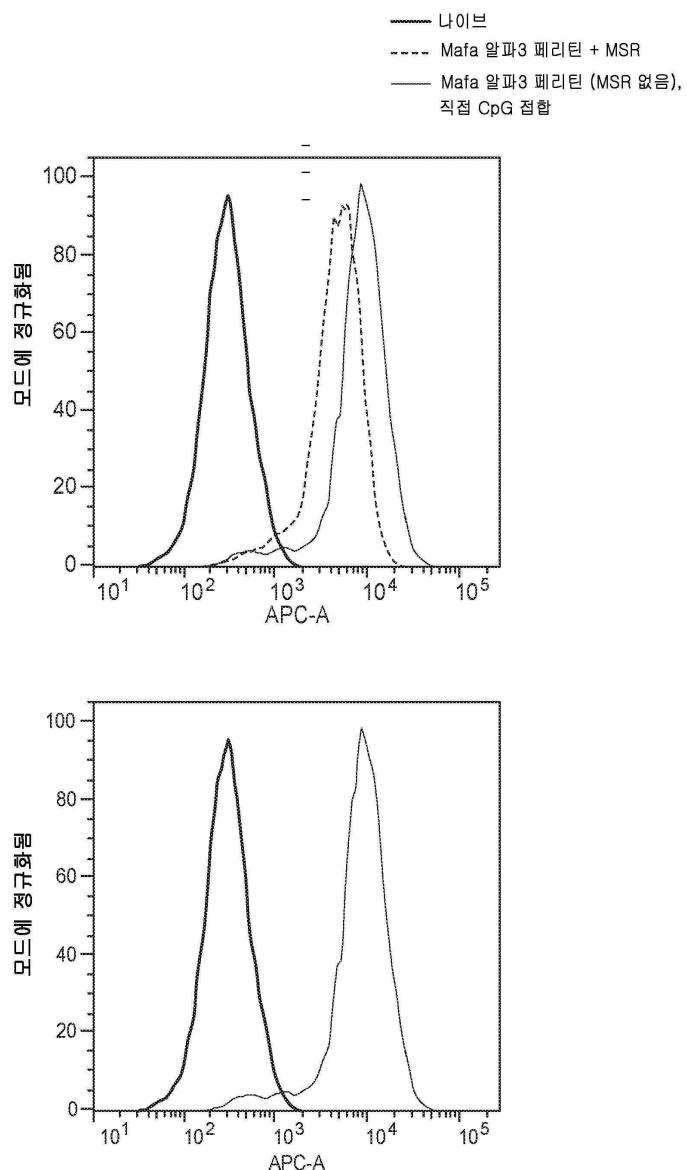
도면16a



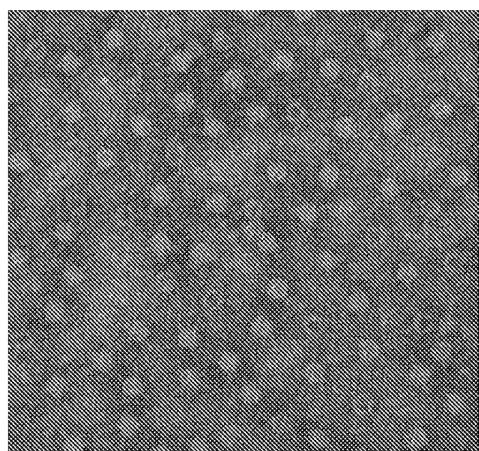
도면16b



도면17

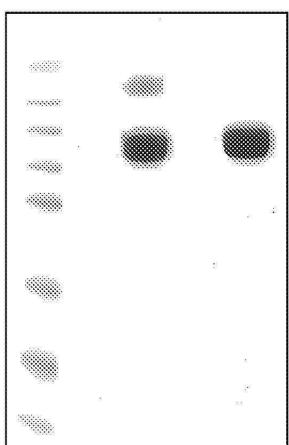


도면18a



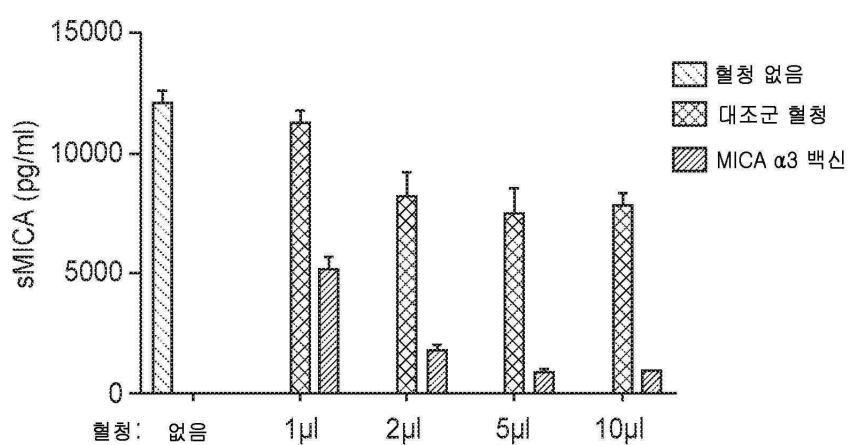
MICA-페리틴 입자의 EM

도면18b

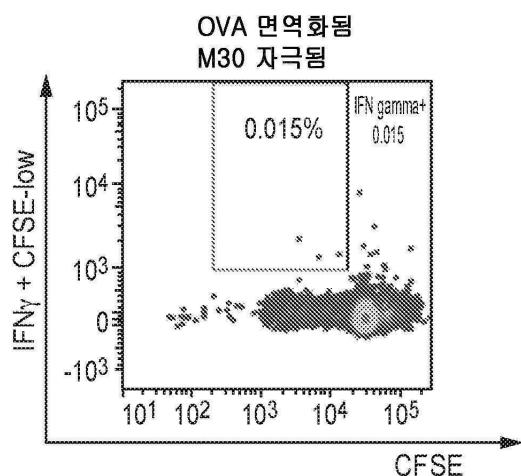


SDS-PAGE

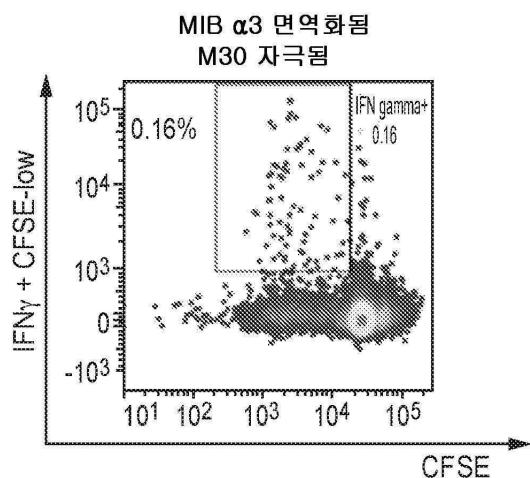
도면19



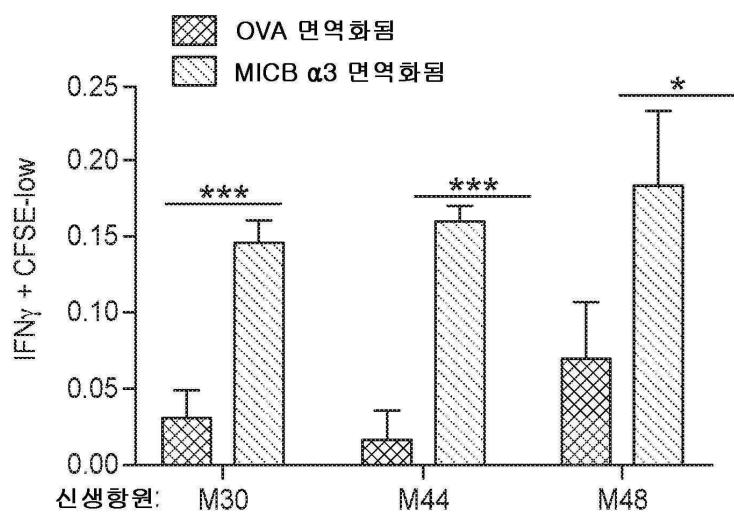
도면20a



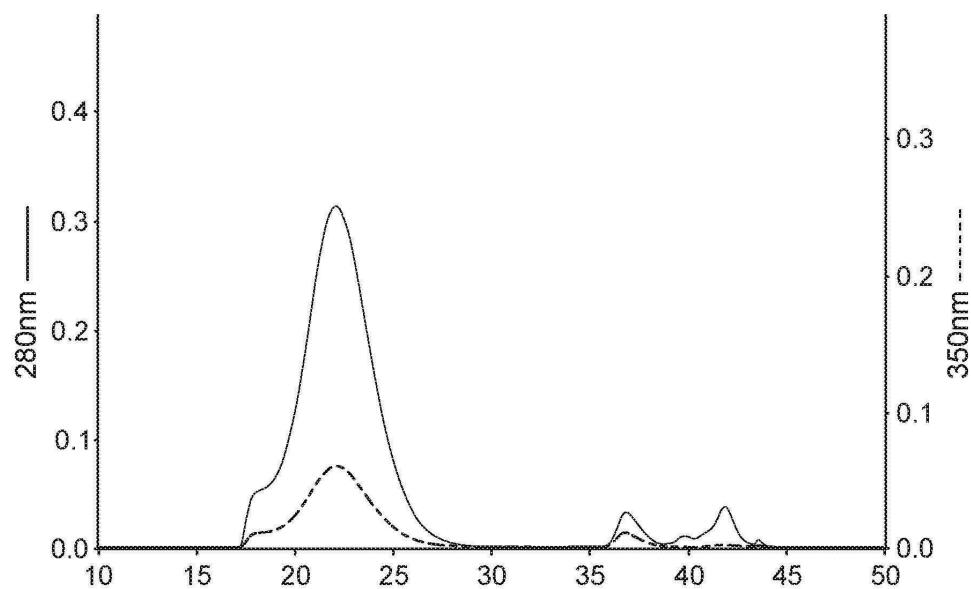
도면20b



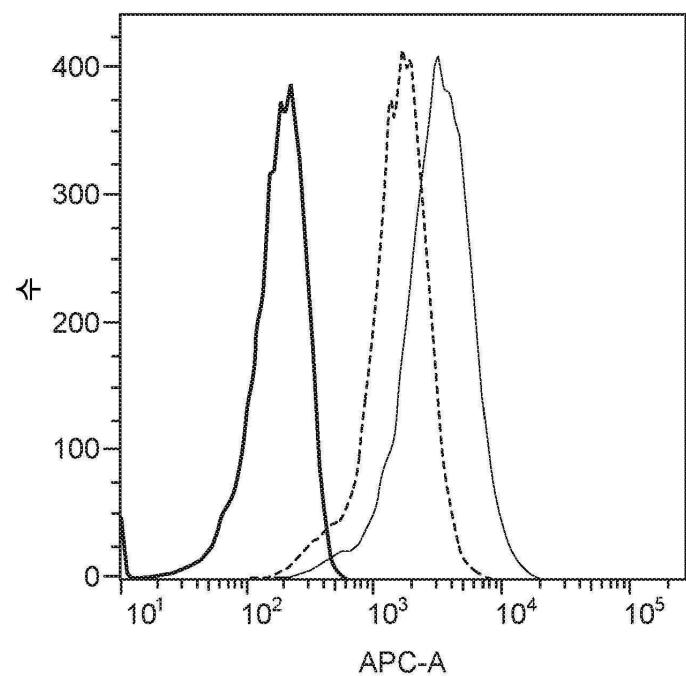
도면20c



도면21a



도면21b



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

<120> VACCINATION WITH MICA/B ALPHA 3 DOMAIN FOR THE TREATMENT OF
CANCER

<130> DFCI-126/001WO

<150> US 62/263,377

<151> 2015-12-04

<150> US 62/422,454

<151> 2016-11-15

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu

20	25	30
----	----	----

Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala

35	40	45
----	----	----

Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu

50	55	60
----	----	----

Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Lys Glu Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile

85	90	95
----	----	----

His Glu Asp Asn Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Val Glu Thr Glu Glu Trp Thr Val Pro

115	120	125
-----	-----	-----

Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu

130	135	140
-----	-----	-----

Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Ser Val Val Leu

165	170	175
Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser		
180	185	190
Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr Pro Arg		
195	200	205
Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp		
210	215	220
Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln		
225	230	235
240		
Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr		
245	250	255
Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser		
260	265	270
Gly Lys Val Leu Val Leu Gln Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser		
275	280	285
Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Ile Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr		
290	295	300
Val Arg Cys Cys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu		
305	310	315
320		
Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His Pro Val Gly Thr Ser Asp His		
325	330	335
Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln Pro Leu Met Ser Ala Leu Gly		
340	345	350
Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala		
355	360	
<210> 2		
<211> 358		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser		
1	5	10

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe

20	25	30
----	----	----

Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp

35	40	45
----	----	----

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp

50	55	60
----	----	----

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu

85	90	95
----	----	----

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe

130	135	140
-----	-----	-----

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Ala

165	170	175
-----	-----	-----

Ile Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Cys Ser Glu Val

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr Pro

195	200	205
-----	-----	-----

Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His

210	215	220
-----	-----	-----

Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Gly Thr Tyr Gln

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr

245	250	255
-----	-----	-----

Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr His Pro Val Pro Ser

260	265	270
Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr Asp Phe Pro Tyr Val		
275	280	285
Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile Ile Leu Cys Val Pro		
290	295	300
Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser		
305	310	315
Leu Gln Val Leu Asp Gln His Pro Val Gly Thr Gly Asp His Arg Asp		
325	330	335
Ala Ala Gln Leu Gly Phe Gln Pro Leu Met Ser Ala Thr Gly Ser Thr		
340	345	350
Gly Ser Thr Glu Gly Ala		
355		
<210> 3		
<211> 109		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Artificial polypeptide		
<400> 3		
Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu		
1	5	10
Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn		
20	25	30
Ile Thr Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr		
35	40	45
Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr		
50	55	60
Trp Val Ala Thr Arg Ile Ser Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys		
65	70	75
Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly		
85	90	95
Lys Val Leu Val Leu Gln Ser His Trp Gln Thr Phe His		

100 105

<210>

4

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polypeptide

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Gln Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn

20 25 30

Ile Asn Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr

35 40 45

Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr

50 55 60

Trp Val Ala Thr Arg Ile Ser Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 5

<211> 314

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial polypeptide

<400> 5

Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro

1 5 10 15

Thr Gln Thr Arg Ala His His His His His Ser Lys Ser Tyr Pro

20 25 30

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val

35 40 45

Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala

50 55 60

Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Ser Gln Gly

100 105 110

Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser

115 120 125

Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln Ser His Trp

130 135 140

Gln Thr Phe His Gly Ser Gly Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asn Glu Gln

145 150 155 160

Val Asn Lys Glu Met Gln Ser Ser Asn Leu Tyr Met Ser Met Ser Ser

165 170 175

Trp Cys Tyr Thr His Ser Leu Asp Gly Ala Gly Leu Phe Leu Phe Asp

180 185 190

His Ala Ala Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Leu Ile Ile Phe Leu

195 200 205

Asn Glu Asn Asn Val Pro Val Gln Leu Thr Ser Ile Ser Ala Pro Glu

210 215 220

His Lys Phe Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe Gln Lys Ala Tyr Glu His

225 230 235 240

Glu Gln His Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn Ile Val Asp His Ala Ile

245 250 255

Lys Ser Lys Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala

260 265 270

Glu Gln His Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile

275 280 285

Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr

290 295 300

Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser

305 310

<210> 6

<211> 945

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<400> 6

atggtccct gtaccctgct gctgctgtc gctgctgcac tggcacctac tcagactcg	60
gccaccatc atcaccatca ctcaaaaagt tacccctacg atgtccccga ctacgccagg	120
accgtcccc ctaggtgaa cgtcacacgc tcagaagcta gcgaggcca tatcaccgtg	180
acatgccgag catctgggtt ctatccttgg aacattacac tgagttggag gcaggacggg	240
gtgtccctgt ctacgatac tcagcagtgg ggcgacgtgc tgccagatgg caatgggacc	300
taccagacat gggtggtac tcggatctcc cagggggagg aacagagatt cactgttat	360

atggagcata gtggaaacca ctaaacat cctgtccat ctggcaaggt gctggtcctg	420
cagagtcact ggcagacatt tcatggatca ggcatatca ttaagctgct gaacgaacag	480
gtgaacaagg agatgcagtc tagtaacctg tacatgagca tgtcaagctg gtgttataca	540
cactccctgg acggagccgg cctgtccctg ttgatcacg ccgctgagga atacgaacat	600
gctaagaac tcatcatttt cctgaatgag aacaatgtgc cagtcagct gactagcatt	660
tccgcacccg aacacaagtt cgagggcctg acccagatct ttcaagaaagc ctacgaacac	720
gagcagcata tctctgaaag tatcaacaac atcgtggacc acgcaatcaa gagcaaagat	780

catgccacct tcaactttct gcagtggta cgtggccgagc agcacgagga agaggcctg	840
ttaaggaca ttctggataa aatcgaactg attggcaatg agaatcacgg gctgtacctg	900
gcagatcagt atgtcaaggg catcgaaag tcaaggaaat catga	945

<210> 7

<211> 314

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polypeptide

<400> 7

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

245	250	255
Lys Ser Lys Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala		
260	265	270
Glu Gln His Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile		
275	280	285
Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr		
290	295	300
Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser		
305	310	
<210> 8		
<211> 945		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Artificial polynucleotide		
<400> 8		
atggtccct gtaccctgct gctgctgctg gctgctgcac tggcacctac tcagactcg 60		
gcccaccatc atcaccatca ctcaaaaagt taccctacg atgtccccga ctacgccagg 120		
accgtgcccc ctatggtaa cgtcacacgc tcagaagcta gcgaggcaa tatcaccgt 180		
acatgccgag catctgggtt ctatccttgg aacattacac tgagttggag gcaggacggg 240		
gtgtccctgt ctcacgatac tcagcagtgg ggcgacgtgc tgccagatgg caatgggacc 300		
taccagacat gggtggtac tcggatctcc cagggggagg aacagagatt cacctgctat 360		
atggagcata gtggaaacca ctcaacacat cctgtccat ctggcaaggt gctggtcctg 420		
cagagtcact ggcagacatt tcatggatca ggcgatatac ttaagctgct gaacgaacag 480		
gtgaacaagg agatgcagtc tagtaacctg tacatgagca tgtcaagctg gtgttataca 540		
cactccctgg acggagccgg cctgttcctg tttgatcacg ccgctgagga atacgaacat 600		
gctaagaaac tgcattttt cctgaatgag aacaatgtgc cagtcagct gactagcatt 660		
tccgcacccg aacacaagtt cgagggcctg acccagatct ttccagaaagc ctacgaacac 720		
gagcagcata tctctgaaag tatcaacaac atcgtggacc acgcaatcaa gagcaaagat 780		
catgccacct tcaactttct gcagtggtac gtggccgagc agcacgagga agaggtcctg 840		
tttaaggaca ttctggataa aatcgaactg attggcaatg agaatcacgg gctgtacctg 900		
gcagatcagt atgtcaaggg catcgaaag tcaaggaaat catga 945		

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial polynucleotide
<400> 9
aaaaaaacccg ggatggtccc ctgtaccctg ctgctgctgc 40
<210> 10
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial polynucleotide
<400> 10
gttcgttcag cagcttaatg atatgcctg atccatgaaa tgtctgccag 50
<210> 11
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial polynucleotide
<400> 11
ctggcagaca tttcatggat caggcgatat cattaagctg ctgaacgaac 50

<210> 12
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial polynucleotide
<400> 12
aaaaaaaggat cctcatgatt tccttgactt tgcgatgcc 43
<210> 13
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial polynucleotide
<220><221> misc_feature

<222> (7)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 13

acctgcnnnn 10

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 14

gacnnnnnngt c 11

<210> 15

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 15

cctnnnnnag g 11

<210> 16

<211> 167

<212> PRT

<213>

Helicobacter pylori

<400> 16

Met Leu Ser Lys Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asn Glu Gln Val Asn Lys

1 5 10 15

Glu Met Gln Ser Ser Asn Leu Tyr Met Ser Met Ser Trp Cys Tyr

20 25 30

Thr His Ser Leu Asp Gly Ala Gly Leu Phe Leu Phe Asp His Ala Ala

35 40 45

Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Leu Ile Ile Phe Leu Asn Glu Asn

50 55 60

Asn Val Pro Val Gln Leu Thr Ser Ile Ser Ala Pro Glu His Lys Phe

65 70 75 80

Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe Gln Lys Ala Tyr Glu His Gln His

85 90 95

Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn Ile Val Asp His Ala Ile Lys Ser Lys

100 105 110

Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala Glu Gln His

115 120 125

Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile Glu Leu Ile

130 135 140

Gly Asn Glu Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr Val Lys Gly

145 150 155 160

Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser

165

<210> 17

<211> 167

<212> PRT

<213> Helicobacter pylori

<400> 17

Met Leu Ser Lys Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asn Glu Gln Val Asn Lys

1 5 10 15

Glu Met Asn Ser Ser Asn Leu Tyr Met Ser Met Ser Trp Cys Tyr

20 25 30

Thr His Ser Leu Asp Gly Ala Gly Leu Phe Leu Phe Asp His Ala Ala

35 40 45

Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Leu Ile Ile Phe Leu Asn Glu Asn

50 55 60

Asn Val Pro Val Gln Leu Thr Ser Ile Ser Ala Pro Glu His Lys Phe

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe Gln Lys Ala Tyr Glu His Gln His

85	90	95
----	----	----

Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn Ile Val Asp His Ala Ile Lys Ser Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala Glu Gln His

115	120	125
-----	-----	-----

Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile Glu Leu Ile

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Asn Glu Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr Val Lys Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser

165

<210> 18

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<400> 18

atggtccctt gtaccctgct gctgctgctg gctgctgcac tggcacctac tcagactcg	60
gcctcaaaaa gttacccta cgtatgtcccc gactacgcca ggaccgtgcc ccctatgg	120
caggtcacac gctcagaagc tagcgaggc caaatcaccg tgacatgccg agcatctgg	180

ttctatcctt ggaacattaa cctgagttgg aggcaaggacg gggtgtccct gtctcacgat	240
--	-----

actcagcagt gggcgacgt gtcgcagat ggcaatggga cttaccagac atgggtggct	300
---	-----

actcgatct cccaggggga ggaacagaga ttcacctgct atatggagca tagtggacag	360
--	-----

cactcaacac atcctgtgcc atctggcaag gtgctggtcc tgcagagtca ctggcagaca	420
---	-----

tttcattga	429
-----------	-----

<210> 19

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<400> 19

atggtccctt gtaccctgct gctgctgctg gctgctgcac tggcacctac tcagactcg 60

gcctcaaaaa	gttaccccta	cgtatgtccc	gactacgcc	ggaccgtgcc	ccctatgg	120
caggcacac	gctcagaagc	tagcgagggc	caaattcac	tgacatgccc	agcatctgg	180
ttctatcctt	ggaacattaa	cctgagttgg	aggcaggacg	gggtgtcc	gtctcacat	240
actcagcagt	ggggcgacgt	gctgccagat	ggcaatgg	cctaccagac	atgggtgg	300
actcgatct	cccaggggga	ggaacagaga	ttcacctgct	atatggagca	tagtggacag	360
cactcaacac	atcctgtgcc	atctggcaag	gtgctggtcc	tgcagagtca	ctggcagaca	420
tttcatiga						429

<210> 20

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polypeptide

<400> 20

Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro

1 5 10 15

Thr Gln Thr Arg Ala Ser Lys Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Glu Gly Gln Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp

50 55 60

Asn Ile Asn Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp

65 70 75 80

Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln

85 90 95

Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Ser Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr

100 105 110

Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Gln His Ser Thr His Pro Val Pro Ser

115 120 125

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

130 135 140

<210> 21

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 21

acctgcnnnn 10

<210> 22

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 22

gacnnnnnngt c 11

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<400> 23

aaaaaaagat ctatggtccc ctgtaccctg ctgctgctgc 40

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<400> 24

aaaaaaagaat tctcaatgaa atgtctgcc a gtgactctgc 40

<210> 25

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polypeptide

<400> 25

Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Gln Thr Arg Ala Ser Lys Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Glu Gly Gln Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp

50	55	60
----	----	----

Asn Ile Asn Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp

65	70	75	80
----	----	----	----

Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln

85	90	95
----	----	----

Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Ser Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Gln His Ser Thr His Pro Val Pro Ser

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

<210> 26

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polypeptide

<400> 26

Met Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe

35 40 45

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser

85 90 95

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys

100 105 110

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

115 120 125

<210> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polypeptide

<400> 27

Met Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe Ser Phe Lys

35 40 45

Lys Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu Gln Gly Leu

50 55 60

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

65	70	75	80
Tyr Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp Cys Glu Thr			
85	90	95	
Gln Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys Thr Phe Leu			
100	105	110	
Thr Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln Lys			
115	120	125	

<210> 28

<211> 781

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

acacagagag aaaggctaaa gttctctgga ggatgtggct gcagagccctg ctgccttgg	60
gcactgtggc ctgcagcatc tctgcacccg cccgctcgcc cagccccagc acgcagccct	120
gggagcatgt gaatgccatc caggaggccc ggcgtctcct gaacctgagt agagacactg	180
ctgctgagat gaatgaaaca gtagaagtca tctcagaaat gtttgacctc caggagccga	240
cctgcctaca gacccgcctg gagctgtaca agcaggccct gcggggcage ctcaccaagc	300
tcaaggccc cttgaccatg atggccagcc actacaagca gcactgcct ccaacccgg	360

aaacttcctg tgcaacccag attatcacct ttgaaagttt caaagagaac ctgaaggact	420
ttctgcttgt catcccttt gactgctggg agccagtcca ggagtgagac cggccagatg	480
aggctggcca agccggggag ctgctctc atgaaacaag agctagaaac tcaggatggt	540
catcttggag ggaccaaggg gtggccaca gccatggtgg gagtggcctg gacctgcct	600
ggcccacact gaccctgata caggcatggc agaagaatgg gaatattta tactgacaga	660
aatcagtaat atttatatat ttatatttt aaaatattta ttattttatt tatttaagtt	720
catattccat atttattcaa gatgtttac cgtaataatt attttaaaa atatgctct	780

a	781
---	-----

<210> 29

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

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

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe			
50	55	60	
Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys			
65	70	75	80
Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met			
85	90	95	
Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser			
100	105	110	

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys			
115	120	125	
Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu			
130	135	140	

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial polynucleotide

<400> 30

tccatgacgt tcctgacgtt 20