



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2008-0090411  
 (43) 공개일자 2008년10월08일

(51) Int. Cl.  
*A61K 47/48* (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2008-7016530  
 (22) 출원일자 2008년07월07일  
 심사청구일자 없음  
 번역문제출일자 2008년07월07일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/046662  
 국제출원일자 2006년12월07일  
 (87) 국제공개번호 WO 2007/067681  
 국제공개일자 2007년06월14일  
 (30) 우선권주장  
 60/748,177 2005년12월08일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인  
 유니버시티 오브 루이빌 리서치 파운데이션, 인코포레이티드  
 미국 40202 켄터키주 루이빌 스위트 215 이. 제퍼슨 스트리트 201 메드센터 3  
 (72) 발명자  
 서반, 하발  
 미국 40245 켄터키주 루이빌 말렛 힐 드라이브 17018  
 엘벡, 쿠틀루, 지.  
 미국 40206 켄터키주 루이빌 로이어 코트 612  
 울쿠, 에스마, 에스.  
 미국 40245 켄터키주 루이빌 말렛 힐 드라이브 17018  
 (74) 대리인  
 양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 20 항

**(54) 번역자극 조성물 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 면역 보조자극 폴리펩티드 및 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 접합체를 제공한다. 접합체는 항원 또는 감염성 인자에 대해 면역 반응을 발생 또는 증진시키기 위해 유용하다. 본 발명은 또한 항원 또는 감염성 인자에 대한 면역 반응을 발생 또는 증진시키기 위해 유용한 접합체로 변형된 면역 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 면역 반응을 자극하기 위해 유용한 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 면역자극 잔기를 제공한다. 본 발명은 또한 면역요법 방법 및 감염을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

(30) 우선권주장

60/771,179 2006년02월06일 미국(US)

60/799,643 2006년05월12일 미국(US)

60/863,173 2006년10월27일 미국(US)

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

(a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체; 및

(b) (i) 첫 번째 항원을 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체

를 포함하는 조합물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 결합 쌍의 두 번째 요소가 비오틴을 포함하는 것인 조합물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 조합물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 첫 번째 항원이 감염성 인자와 관련된 항원 및 종양 관련 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 조합물.

**청구항 5**

(a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체; 및

(b) (i) 감염성 인자와 관련된 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체

를 포함하는 조합물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 감염성 인자가 세균, 바이러스 및 기생충으로부터 선택되는 것인 조합물.

**청구항 7**

(a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체, 및 (i) 첫 번째 종양-관련 항원을 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체; 또는

(b) 상기 첫 번째 및 두 번째 집합체로 시험관내에서 처리된 면역 세포

를, 종양을 갖고 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 첫 번째 종양-관련 항원을 발현하는 종양에 대한 면역 반응을 발생 또는 증진시키는 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 결합 쌍의 상기 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 결합 쌍의 상기 두 번째 요소가 비오틴을 포함하는 것인 방법.

**청구항 9**

제7항에 있어서, 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 10**

제7항에 있어서, 상기 환자가 말, 양, 염소, 소, 돼지, 조류, 개, 고양이 및 영장류 중으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 환자가 인간인 방법.

**청구항 12**

첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드에 대한 수용체를 발현하는 면역 세포를,

(a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체; 및

(b) (i) 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 또는 상기 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 두 번째 접합체와 접촉시키는 것을 포함하고,

상기 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드와 상기 수용체 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되고, 상기 두 번째 접합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되는 것인,

종양-관련 항원을 발현하는 종양 또는 감염성 인자에 대한 면역 반응을 발생 또는 증진시키기 위한 면역 세포의 변형 방법.

**청구항 13**

변형된 면역 세포가

(a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체; 및

(b) (i) 첫 번째 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체

를 포함하고, 상기 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드와 상기 수용체 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되고, 상기 두 번째 접합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되는 것인,

첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포.

**청구항 14**

(a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체; 및

(b) (i) 상기 감염성 인자와 관련된 첫 번째 항원을 포함하거나 또는 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체

를 감염성 인자로 감염되었거나 감염될 위험이 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 감염성 인자에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 환자가 말, 양, 염소, 소, 돼지, 조류, 개, 고양이 및 영장류 중으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 환자가 인간인 방법.

**청구항 17**

면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 집합체.

**청구항 18**

면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함한 집합체를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 면역자극 반응을 유도하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 동물에게 항원을 투여하는 것을 더욱 포함하는 방법.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 상기 동물이 말, 양, 염소, 소, 돼지, 조류, 개, 고양이 및 영장류 종으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

**명세서**

<1> **관련 출원과의 상호 참조**

<2> 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 하기 미국 임시 출원의 출원일의 특권을 청구한다: 60/748,177 (2005년 12월 8일 출원); 60/771,179 (2006년 2월 6일 출원); 60/799,643 (2006년 5월 12일 출원); 및 60/863,173 (2006년 10월 27일 출원). 상기 출원의 각각은 그 전체 내용이 참고문헌으로 포함된다.

**기술 분야**

<3> 본 발명은, 항원에 대한 면역 반응을 포함하여 면역 반응의 발생 또는 증진 방법, 방법의 실행을 위한 조성물, 및 이러한 방법에서 유용한 변형된 면역 세포에 관한 것이다.

**배경 기술**

<4> 면역의 결핍을 특징으로 하고 더욱 공격적인 면역 반응에 의해 해결될 수 있는 질병 및 상태를 다루기 위하여 숙주의 면역 반응을 증대시키기 위한 접근이 기재되어 있다. 이러한 접근법이 유리할 수도 있는 일례의 질병 또는 상태는 암, 인플루엔자 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV)를 포함한다.

<5> 수술, 화학요법 및 방사선요법을 포함한 암 치료가 일반적으로 사용되지만, 이러한 접근법은 종양 특이성이 부족하고 그 결과 해로운 부작용이 있고 만족스럽지 못한 임상 반응이 얻어진다. 따라서, 정상 세포에 대해 심각한 해로운 효과를 미치지 않으면서 표적 종양성 세포에 대해 반응하도록 특이적으로 지시함으로써 암에 대한 면역 반응을 증대시키는 방법이, 전통적인 암 치료법에 비해 뚜렷한 장점을 제공한다.

<6> 면역 감시가 종양의 예방 및 근절에서 역할을 하고, T 세포에 의해 매개되는 적응성 면역이 이 과정에서 역할을 하는 것으로 의견이 합의되었다. 예를 들어 문헌 [Pardoll, Nat.Rev.Immunol. 2002, 2:227-38]; [Rosenberg, Nature 2001, 411: 380-84]; [Finn, OJ.Nat.Rev.Immunol. 2003, 3:630-41] 참조. 또한, T 세포-매개 면역은 임상전 및 제한된 임상 환경에서 효율을 나타내는 다양한 면역요법 접근에서 역할을 한다. 예를 들어, [Pardoll, 상동; Finn, 상동; Antonia 등 Curr.Opin.Immunol. 2004, 16: 130-6] 참조. 종양은 종양 관련 항원 (TAA)을 발현하기 때문에 면역 체계에 의해 표적화되고, 이것은 돌연변이되거나 과다/이상적으로 발현된 자가-단백질 또는 발암성 바이러스로부터 유래된 단백질이다. 예를 들어 [Finn, 상동; Antonia 상동] 참조. 생리학 적 조건 하에서, 종양 항원은 수지상 세포(DC)에 의해 잡히고, 말초 림프 기관으로 운반되고, 효과기 세포( $T_{eff}$ )로 활성화 및 분화될 수 있도록 하는 면역원성 조건 하에서 비감작(naive) T 세포에 제시된다. 이어서, 이러한 세포가 종양 부위로 보내져서 종양 근절을 위한 항-종양 반응을 일으킨다. 예를 들어 [Spiotto 등, Immunity, 2002; 17: 737-47]; [Ochsenbein 등, Nature 2001, 411: 1058-64]; [Yu 등, Nat.Immunol. 2004; 5: 141-9] 참조.

<7> 생산성 T 세포 반응은 3개의 뚜렷한 시그널을 필요로 한다: 시그널 1, 2 및 3. 시그널 1은 전문적 항원 제시

세포(APC)의 표면 위에서 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시되는 명목 펩티드와 상호작용하는 T 세포 수용체 (TCR)에 의해 발생된다. 시그널 2는 일련의 보조자극 분자에 의해 매개되고 지속된 면역 반응에 결정적이다. 시그널 3은 활성화된 림프구 및 APC, 예컨대 대식세포 및 DC에 의해 만들어진 사이토카인을 통해 변환되고, 효과기 면역 반응의 유지에 중요하다.

<8> 종양은 면역 감시를 피하기 위해 다양한 메커니즘을 발달시켰다. 이러한 메커니즘은 (i) 종양 세포에서 MHC/종양 항원 이분자 복합체의 비효율적 표시, 이러한 시그널의 변환에 있어서의 결함, 또는 NKG2 억제 수용체를 발현하는 천연 킬러(NK 세포)를 억제하는 MHC 상동체 (MIC)의 발현으로부터 발생하는, 시그널 1의 결핍; (ii) 종양 세포 위의 보조자극 분자의 결핍 또는 공동억제 분자의 발현으로부터 비롯된 시그널 2의 부재; (iii) 항-염증 분자의 분비, 종양-반응성 T 세포의 면역저하상태 유도, 세포고사를 통한 T<sub>eff</sub> 세포의 물리적 제거, 또는 자연 발생 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T 조절 (T<sub>reg</sub>)세포의 유도를 통하여 면역 반응의 종양-매개 억제, 및 (iv) 종양 스트로마에 의한 면역 조절을 포함한다. 축적된 증거는, 이러한 다수의 메커니즘이 큰 종양 부담을 가진 환자에서 동시에 작동할 수 있음을 제시한다.

<9> 표적 암으로부터의 항원을 포함하는 암 백신은, 암의 재발을 방지할 수 있는 면역 체계의 특이성, 안전성, 효율성 및 장기간 기억력의 보증때문에 특히 관심을 끌고 있다. 일단 면역 체계가 암에 대해 개체를 보호하는 중요한 역할을 하고 동물 모델에서 기존의 종양을 근절하기 위해 조절될 수 있음이 입증되었기 때문에, 치료 백신의 개발에 집중적인 노력을 바쳤다. 예를 들어 문헌 [Berzofsky 등, J.Clin.Invest 2004, 113: 1515-25]; [Platsoucas 등, Anticancer Res. 2003; 23, 1969-96]; [Finn, 상동] 참조. 현재의 백신 전략은 비특이적 또는 특이적 아주반트, 전체 종양 세포 용해물, 보조자극 분자를 발현하기 위해 유전적으로 변형된 종양 세포, 사이토카인, 및/또는 케모카인, 종양 항원으로 전달되거나 또는 종양 RNA 또는 DNA로 형질감염된 DC; 및 다양한 면역자극 분자를 코드화하는 범위의 벡터의 종양내 주사와 함께 특이적 TAA를 사용하는 것을 포함한다. 이러한 접근법의 제한된 효능은, 진행성 종양이 하나 또는 여러 개의 면역 회피 전략을 사용하여 면역 반응을 제어하는 능력으로부터 유래되거나, 또는 면역억제 메커니즘, TAA의 비효율적 제시, 또는 DC, T<sub>eff</sub> 세포 및 NK 세포의 강력한 활성화의 결여에 기인할 수도 있다.

<10> **발명의 요약**

<11> 본 발명은 면역자극 조성물 및 방법을 제공한다.

<12> 하나의 구현양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체; 및 (b) (i) 첫 번째 항원을 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함하는 두 번째 집합체를 포함한 조합을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 결합 쌍의 첫 번째 요소는 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함할 수도 있고 결합 쌍의 두 번째 요소는 비오틴을 포함할 수도 있다. 다른 구현양태에서, 첫 번째 집합체는 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함한 융합 폴리펩티드를 포함할 수도 있다. 하나의 특정한 구현양태에서, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드는 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택된다.

<13> 하나의 특정한 구현양태에서, 첫 번째 항원은 감염성 인자, 예컨대 인간 또는 조류 인플루엔자 또는 인간 면역 결핍 바이러스와 연관된다. 다른 특정한 구현양태에서, 첫 번째 항원은 종양 관련 항원이다.

<14> 하나의 구현양태에서, 조합은 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 두 번째 항원 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 세 번째 집합체를 포함한다. 이 구현양태에서, 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드는 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 또는 상이하고; 두 번째 항원은 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 세 번째 집합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소는 첫 번째 및 두 번째 집합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하다. 추가로, 첫 번째 집합체 요소는 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 집합체 요소에 결합될 수도 있다.

<15> 다른 구현양태에서, 조합의 두 번째 집합체는 (i) 감염성 인자를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한다.

<16> 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체, 및 (i) 첫 번째 종양-결합 항원을 포

합하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체; 또는 (b) 첫 번째 및 두 번째 집합체와 시험관내 처리된 면역 세포를 종양을 가진 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 첫 번째 종양-관련 항원을 발현하는 종양에 대하여 면역 반응을 발생 또는 증진시키는 방법이 제공된다.

- <17> 하나의 구현양태에서, 첫 번째 및 두 번째 집합체를 단일 조성물의 일부로서 포함하여 따로따로 또는 동시에 환자에게 투여한다.
- <18> 다른 구현양태에서, 첫 번째 및 두 번째 집합체로 시험관내 처리된 면역 세포를 환자에게 투여한다. 하나의 특정한 구현양태에서, 면역 세포는 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 포함하고, 면역 보조자극 폴리펩티드와 수용체 간의 결합을 통해 첫 번째 집합체를 면역 세포에 접합하고, 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 집합체를 면역 세포에 접합한다.
- <19> 하나의 구현양태에서, 방법은 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 두 번째 종양-관련 항원 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 세 번째 집합체를 투여하는 것을 더욱 포함한다. 이 구현양태에서, 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드는 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 두 번째 항원은 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 세 번째 집합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소는 첫 번째 및 두 번째 집합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하다. 추가로, 첫 번째 집합체 요소는 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 집합체 요소에 결합될 수도 있다.
- <20> 본 발명의 다른 측면에 따르면, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 면역 세포를 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체; 및 (b) (i) 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양-관련 항원 또는 감염성 인자를 발현하는 종양에 대한 면역 반응을 발생하거나 증진시키기 위해 면역 세포를 변형시키는 방법이 제공된다. 첫 번째 집합체는 면역 보조자극 폴리펩티드 및 수용체 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합될 수도 있고, 두 번째 집합체는 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합될 수도 있다.
- <21> 하나의 구현양태에서, 면역 세포는 T 세포, 예컨대 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포 또는 호중구, 천연 킬러 세포, 단핵구 또는 수지상 세포이다.
- <22> 다른 구현양태에서, 면역 세포는 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 포함하고, 방법은 면역 세포를 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 종양 또는 감염성 인자와 관련된 두 번째 항원 또는 감염성 인자 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 세 번째 집합체와 접촉시키는 것을 더욱 포함한다. 이러한 구현양태에서, 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드는 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 두 번째 항원은 존재한다면 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 세 번째 집합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소는 첫 번째 및 두 번째 집합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하다. 추가로, 첫 번째 집합체 요소는 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 집합체 요소에 결합될 수도 있다.
- <23> 본 발명의 다른 측면에 따르면, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포가 제공되며, 변형된 면역 세포는 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체 및 (b) (i) 첫 번째 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체로 변형되고, 여기에서 첫 번째 집합체는 면역 보조자극 폴리펩티드와 수용체 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합되고, 두 번째 집합체는 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합된다. 하나의 구현양태에서, 면역 세포는 T 세포, 예컨대 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포, 또는 호중구, 천연 킬러 세포, 단핵구 또는 수지상 세포이다.
- <24> 본 발명의 다른 측면에 따르면, 감염을 앓고 있거나 감염성 인자로 감염될 위험이 있는 환자에게 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체 및 (b) (i) 감염성 인자와 관련되거나 감염성 인자를 포함하는 첫 번째 항원 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 집합체 요소를 투여하는 것을 포함하는 감염성 인자에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 방법이 제공된다. 하나의 구현양태에 따르면, 첫 번째 및 두 번째



접합체의 적어도 하나가 감염 부위에서 직접적인 주사에 의해 투여된다.

- <25> 하나의 특정한 구현양태에서, 감염은 인간 또는 조류 인플루엔자이고 첫 번째 항원은 H, N, M1, M2e, NS1, NS2 (NEP), NP, PA, PB1 및 PB2로 구성된 군에서 선택된다. 다른 특정한 구현양태에서, 감염은 HIV이고 첫 번째 항원은 Gag 단백질, Pol, Vif, Vpr, Rev, Vpu, 외피 에피토프, Tat 및 Nef로 구성된 HIV 항원의 군에서 선택된다.
- <26> 하나의 구현양태에서, 방법은 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 감염 또는 감염성 인자와 관련된 두 번째 항원 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 세 번째 접합체를 투여하는 것을 더욱 포함하고, 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드는 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 존재한다면 두 번째 항원은 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 세 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소는 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하고, 첫 번째 접합체 요소는 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체 요소에 결합된다.
- <27> 본 발명의 다른 측면에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하는 접합체가 제공된다.
- <28> 본 발명의 다른 측면에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함한 접합체를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 면역자극 반응을 유도하는 방법이 제공된다. 일부 구현양태에서, 방법은 동물에게 항원을 투여하는 것을 더욱 포함한다.

**발명의 상세한 설명**

- <56> 본 발명은, 항원, 예컨대 TAA 또는 인간 및 조류 인플루엔자 또는 HIV와 같은 감염성 인자와 관련된 항원에 대한 면역 반응을 포함하여, 면역 반응을 발생 또는 증진하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 항원에 대한 면역 반응을 발생 또는 증진시키기 위해 유용한 변형된 면역 세포를 제공한다. 본 발명은 종양 크기를 감소시키는 방법 및 종양 세포의 성장을 억제하는 방법 및 감염을 치료 또는 예방하는 방법과 같이 암 면역요법 방법을 포함한 면역요법 방법을 제공한다.
- <57> 생산 적응성 면역 반응은 2차 림프 기관의 조직화된 구조 내에서 비감작 T 효과기 ("Teff") 세포와 APC 간의 통합되고 적시의 상호작용을 필요로 한다. 이러한 상호작용은 Teff 세포와 APC의 상호간 활성화를 촉진하고, 이것은 다양한 세포 표면 리간드와 수용체뿐만 아니라 반응의 개시, 유지 및 장기간 기억을 위해 중요한 가용성 단백질의 발현을 이끈다. 상기 언급된 바와 같이, 적어도 3개의 시그널 (시그널 1, 2 및 3)이 비감작 T 세포의 초기 활성화에 관련된다. 몇 가지 면역 보조자극 분자가 하나 이상의 시그널을 자극하는데 관련되어 왔다.
- <58> 본 발명은, 종양 또는 감염성 인자에 대한 효과적인 면역 반응이 유도되도록 면역 세포에 대해 항원을 제시하는 방법에서 종양 또는 감염성 인자와 연관된 하나 이상의 면역 보조자극 폴리펩티드 및 하나 이상의 항원의 사용에 관한 것이다. 대안적으로, 감염성 인자가 그와 관련된 항원 대신에 사용될 수 있다. 어떠한 이론에 의해서도 구속되길 원하지 않지만, 본 발명은 항원 제시를 촉진하고 면역 반응을 활성화함으로써 유리한 결과를 달성한다. 다른 대안적인 구현양태에서, 본 발명은 면역 반응을 자극하기 위해 유용한 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 면역자극 잔기를 제공한다.
- <59> 본 출원의 목적을 위하여, 하기 용어들은 다음과 같은 정의를 갖는다:
- <60> 여기에서 사용된 단수 표면은, 단지 하나를 의미하는 것으로 구체적으로 표시되지 않은 이상 하나 이상을 의미한다.
- <61> 여기에서 사용된 "투여"는 환자에게 물질을 제공하기 위해 적절한 모든 수단을 포함한다. 일반적인 경로는 경구, 설하, 경점막, 경피, 직장, 질내, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 척수강내, 카테터를 통한 것, 이식물을 통한 것 등등을 포함한다. 일부 구현양태에서, 종양 내로 직접 주사 또는 예컨대 종양이 혈액의 종양일 때 혈액 내에 주사하는 것에 의하여, 조성물을 종양 근처에 또는 종양에 직접적으로 투여한다.
- <62> "항원"은 제한없이 사용된다. 항원은 단백질, 지질, 당, 핵산, 화학 잔기 및 면역 반응을 유도하는 다른 잔기를 포함한다. 항원은 글리코실화 또는 메틸화에 의해 변형되거나 변형되지 않을 수도 있는 단백질을 포함하고, 이것은 예를 들어 고리화되거나 지질에 결합된다. 감염성 인자 또는 질병과 연관된 항원은 감염성 인자의 일부인 항원, 예컨대 외피 단백질, 캡시드 단백질, 표면 단백질, 독소, 세포벽, 항원성 지질 등을 포함



한다. 다른 항원은 숙주의 존재 하에서 유일하게 발현될 수도 있다. 다른 적절한 항원은 일부 구현양태에서 감염 또는 질병의 마커로서 유도되거나 변형되거나 또는 달리 과다발현되는 것을 포함하여 숙주의 항원을 포함할 수도 있다. 감염성 인자, 감염, 상태 또는 질병으로부터 유래되거나 이와 관련된 이러한 모든 항원은 본 발명에서 사용하기 위해 적절하다. 본 발명에 따르면, 전체-길이 단백질의 항원성 부분을 포함한 펩티드, 예컨대 면역 반응을 유도하는 단백질의 일부, 예컨대 면역원성 에피토프를 포함하는 펩티드가 "항원"으로서 사용하기 위해 적절하다. 예를 들어, 적절한 항원은 면역 반응을 유도하는 합성 펩티드를 포함할 수도 있다.

- <63> "결합 쌍"이란 예를 들어 이온, 공유, 소수성, 반 데르 바스 및 수소 결합을 포함한 각종 분자 힘을 통해 서로 상호작용하는 2개의 분자를 가리키고, 따라서 쌍은 서로에 특이적으로 결합하는 성질을 갖는다. 특이적 결합은, 다른 분자에 결합하지 않는 조건 하에서 결합 쌍 요소가 서로에 대한 결합을 나타냄을 의미한다. 결합 쌍의 예는 비오틴-아비딘, 호르몬-수용체, 수용체-리간드, 효소-기질, IgG-단백질 A, 항원-항체 등이다.
- <64> "면역 보조자극 폴리펩티드"는 병원체 (감염성 인자 포함) 또는 종양에 대해 개체의 면역 반응을 증가시키는 폴리펩티드를 의미한다.
- <65> 여기에서 사용된 "면역 세포"는 후천성 또는 선천성 면역 체계의 발생, 조절 또는 효과에 관련된 세포를 포함한다. 면역 세포는 T 세포, 예컨대 CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 다양한 기타 T 세포 소집합, B 세포, 천연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구 및 수지상 세포 및 호중구를 포함한다.
- <66> 여기에서 사용된 "환자"는 말, 양, 염소, 소, 돼지, 조류, 개, 고양이 및 영장류 종을 포함한 척추동물을 포함한다. 하나의 구현양태에서, 환자는 인간이다. 당업자라면, 하나의 종을 참조하여 언급된 특정한 면역 보조자극 분자, 시그널전달 분자, 세포 마커, 세포 유형, 감염성 인자 등이 상이한 종에서 상응하는 유사체를 가질 수도 있고, 이러한 유사체 및 상응하고 관련된 종에서 그들의 사용이 본 발명에 의해 포함된다는 것을 이해할 것이다.
- <67> 여기에서 사용된 "종양"은 고형 및 비 고형 종양 (예컨대 백혈병); 및 전구-암성 병변 및 양성 종양으로부터 암성, 악성 및 전이성 종양으로 종양이 발생하는 상이한 단계를 포함한다.
- <68> 일반적인 용어에서, 본 발명은 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체, 및 (b) (i) 첫 번째 항원을 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 두 번째 접합체를 포함하는 두 번째 접합체를 사용하여 첫 번째 항원에 대한 면역 반응을 발생시키거나 증진시키는 방법을 제공한다. 항원은 TAA 또는 감염성 인자와 관련된 항원 또는 감염성 인자 자체일 수도 있다. 접합체는 항원 또는 감염성 인자를 포함한 환자에게 직접적으로 투여될 수 있거나, 또는 면역 세포를 치료하기 위해 사용되어 환자에게 투여될 수도 있다. 본 발명은 또한 접합체를 포함하는 조성물, 접합체로 처리된 면역 세포, 및 처리된 면역 세포의 형성 방법을 제공한다.
- <69> 본 발명은 또한 면역 보조자극 폴리펩티드, 예컨대 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하는 접합체 또는 융합 단백질을 포함하는 면역자극 잔기를 제공한다. 본 발명은 동물에게 면역자극 잔기를 투여하는 것을 포함하는 동물에서의 면역자극 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 일부 구현양태에서, 항원이 동물에게 투여된다. 잔기를 포함한 조성물이 또한 제공된다.
- <70> 본 발명의 하나의 측면에 따르면, 항원 또는 감염성 인자가, 하나 이상의 면역 세포 유형을 선택적으로 표적으로 하는 면역 보조자극 폴리펩티드, 예컨대 하기 기재된 면역 보조자극 폴리펩티드의 어느 것을 포함한 접합체의 일부로서 면역 세포에 제시된다. 따라서, 하나의 구현양태에 따르면, 본 발명은 면역 보조자극 폴리펩티드 및 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 또는 감염성 인자를 포함한 접합체를 제공한다. 항원 또는 감염성 인자가 공유 결합을 포함한 임의의 수단에 의하여 직접적으로 또는 링커를 통해, 또는 결합 쌍 요소를 통해 면역 보조자극 폴리펩티드에 접합될 수 있다.
- <71> 하나의 구현양태에서, 항원 또는 감염성 인자가 결합 쌍의 결합 상호작용을 통하여 면역 보조자극 폴리펩티드에 접합된다. 이러한 구현양태에 따르면, 각각의 항원 (또는 감염성 인자) 및 면역 보조자극 폴리펩티드가 결합 쌍의 요소에 접합되고, 결합 쌍 요소의 결합 상호작용이 접합체, 예컨대 면역 보조자극 폴리펩티드-첫 번째 결합 쌍 요소 :: 두 번째 결합 쌍 요소 - 항원 (또는 감염성 인자) 접합체에서 항원 (또는 감염성 인자) 및 면역 보조자극 폴리펩티드를 연결한다.
- <72> 이러한 구현양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체, 및 (b) (i) 종양 또는 감염성

인자와 관련된 첫 번째 항원 (또는 그의 감염성 인자)를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 조합을 제공한다.

<73> 다른 구현양태에서, 조합은 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 종양 또는 감염성 인자와 관련된 두 번째 항원 (또는 그의 감염성 인자 자체)를 포함하는 접합체 요소를 포함한 세 번째 접합체를 포함하고, 여기에서 세 번째 접합체의 면역 보조자극 폴리펩티드는 첫 번째 접합체의 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고, 두 번째 항원은 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하다. 본 구현양태의 특정한 측면에서, 면역 보조자극 폴리펩티드 및 세 번째 접합체의 두 번째 항원이, 각각의 면역 보조자극 폴리펩티드와 관련된 결합 쌍 요소 및 두 번째 항원 간의 결합을 통해 함께 결합된다. 본 구현양태에 따르면, 세 번째 접합체의 결합 쌍 요소는 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이할 수도 있다.

<74> 첫 번째, 두 번째 및 임의의 세 번째 접합체가 별개의 구성물에 제공될 수도 있다. 대안적으로, 첫 번째 및 두 번째 접합체가 단일 구성물에 제공될 수도 있고 세 번째 접합체가 별개의 구성물에 제공될 수도 있다. 또 다른 대안에서, 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 접합체가 단일 구성물에 제공된다. 다른 대안에서, 첫 번째 접합체가 하나의 구성물에 제공되고 두 번째 및 세 번째 접합체가 다른 구성물에 제공된다.

<75> 각각의 구성물은 제약학적으로 허용가능한 담체를 임의로 포함할 수도 있다. 제약학적으로 허용가능한 담체는 재료가 불활성이거나 또는 의학적으로 허용가능할 뿐만 아니라 투여 상황에서 활성 약제(들)와 상용성이기 때문에, 구성물을 위한 부형제로서 사용될 수 있는 재료이다. 제약학적으로 허용가능한 담체는 당 기술분야에 공지된 통상적인 제약학적 첨가제를 함유할 수도 있다.

<76> **면역 보조자극 폴리펩티드**

<77> 면역 보조자극 분자가 비감작 T 세포와 항원 제시 세포 간의 자연적인 상호작용에 연관되며, 그 결과 상호 활성화가 얻어지고, 다양한 세포 표면 리간드 및 수용체, 및 면역 반응의 개시, 유지 및 장기간 기억에 기여하는 가용성 단백질의 발현을 촉진한다. 상기 언급된 바와 같이, 비감작 T 세포의 초기 활성화를 위하여 적어도 3개의 시그널이 요구된다. 시그널 1은 T 세포 수용체(TCR)와 전문적 APC, 예컨대 수지상 세포(DC)의 표면 상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 의해 제시되는 명목 펩티드 간의 상호작용에 의해 발생된다. 시그널 2는 여러 개의 상이한 분자에 의해 매개될 수 있고 지속된 면역 반응에 중요하다. 시그널 3은 활성화된 T 세포와 APC에 의해 만들어진 사이토카인을 통해 변환되고 효과기 면역 반응의 유지에 중요하다.

<78> 다수의 면역 보조자극 분자가 동정되었다. 본 발명에 따라 유용한 일례의 면역 보조자극 분자 (폴리펩티드)는 제한없이 LIGHT, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), ICOS, ICOSL (B7h, B7-H2, B7RP-1, GL-50 및 LICOS 포함), CD94 (KP43), CD40L (CD154), ICAM-1 (CD54), ICAM-2, ICAM-3, SLAM (CD150), HAS (CD24), 4-1BB (CDw137), 4-1BBL (CDw137L), OX40L, CD28, CD40 (BP50), CD25 (IL-2R $\alpha$ ), 림포톡신 (LT $\alpha$  또는 LT $\beta$ ), TNF, Fas-L, GITR (활성화-유도성 TNRF), GITR 리간드, CD11a ( $\alpha_L$  인테그린), CD11b ( $\alpha_M$  인테그린), L-셀렉틴 (CD62L), CD69 (매우 초기 활성화 항원), CD70 (CD27L), PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, 4-1BBL, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF 및 APRIL을 포함한다. 예를 들어 [Watts & DeBenedette, 1999, Curr.Opin.Immunol., 11: 286-93] 참조.

<79> 여기에서 "전체-길이"로 규정되지 않는 한, 면역 보조자극 폴리펩티드에 관한 언급은 전체-길이 폴리펩티드뿐만 아니라 하기 구체적으로 확인된 단편 및 일부에 한정되지 않지만 이를 포함하여 면역 보조자극 기능을 나타내는 그의 단편 또는 일부를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 4-1 BBL 폴리펩티드에 관한 언급은 면역 보조자극 기능을 나타내는 전체-길이 4-1 BBL의 단편 또는 일부를 포함한 폴리펩티드, 예컨대 4-1 BBL의 세포외 도메인 또는 전체-길이 4-1 BBL 단백질을 내포한다. 하나의 구현양태에서, 면역 보조자극 폴리펩티드는 면역 보조자극 분자의 막횡단 도메인을 포함하지 않는다. 하나의 구현양태에서, 면역 보조자극 폴리펩티드는 면역 보조자극 분자의 세포외 도메인 또는 그의 수용체 결합 단편을 포함한다.

<80> 대표적인 핵산 서열 및 코드화된 면역 보조자극 폴리펩티드의 예는 진뱅크 수탁 번호 AB029155 (생쥐 LIGHT); NM\_172014 (인간 TNFSF14 mRNA 전사 변형체 2); NM\_003807 (인간 TNFSF14 mRNA 전사 변형체 1); NM\_005191 (인간 CD80 mRNA); NM\_009855 (생쥐 CD80 mRNA); NM\_214087 Sus scrofa CD80 mRNA); NM\_009404 (생쥐 Tnfsf9 mRNA); NM\_003811 (인간 TNFSF9 mRNA); NM\_181384 (라투스 노르베기쿠스 (Rattus norvegicus) Tnfsf9 mRNA); BAA88559 (생쥐 LIGHT 단백질); Q9QYH9 (생쥐 TNFSF 14 막 결합 단백질 및 가용성 단백질); AAH 18058 (인간 TNFSF14 단백질); NP\_005182 (인간 CD80 단백질); NP\_033985 (생쥐 CD80 단백질); NP\_037058 (라투스 노르베기쿠스 CD80 단백질); NP\_003802 (인간 TNFSF9 단백질); NP\_033430 (생쥐 TNFSF9 단백질); NP\_852049 (라투스 노

르베기쿠스 TNFSF9 단백질); NM\_012967 (라투스 노르베기쿠스 ICAM-1 mRNA); X69711 (인간 ICAM-1 mRNA); X52264 (생쥐 ICAM-1 mRNA); X69819 (인간 ICAM-3 mRNA); AF296283 (생쥐 ICAM-4 mRNA); NM\_021181 (인간 SLAMF7 mRNA); NM\_033438 (인간 SLAMF9 mRNA); NM\_029612 (생쥐 SLAMF9 mRNA); NM\_144539 (생쥐 SLAMF7 mRNA); L13944 (생쥐 CD18 유전자); X53586 (인간 인테그린  $\alpha 6$  mRNA); X68742 (인간 인테그린  $\alpha$  mRNA); J04145 (인간 호중구 부착 수용체 알파-M 소단위 mRNA); AJ246000 (인간 백혈구 부착 수용체, L-셀렉틴 mRNA); AY367061 (인간 L-셀렉틴 mRNA, 부분 cds); Y13636 (생쥐 CD70 mRNA); NM\_001252 (인간 TNFSF7 mRNA); BC000725 (인간 TNFSF7 mRNA (cDNA 클론 MGC: 1597 IMAGE: 3506629), 완전한 cds); X69397 (인간 CD24 유전자 및 완전한 CDS); NM\_013230 (인간 CD24 mRNA); NM\_012752 (라투스 노르베기쿠스 CD24 mRNA); Y00137 (생쥐 종양 괴사 인자-베타 (림포톡신) 유전자); X02911 (인간 종양 괴사 인자-베타 (림포톡신) 유전자); D00102 (인간 림포톡신 mRNA, 완전한 CDS); X01393 (인간 림포톡신 mRNA); 및 A06316 (인간 림포톡신 mRNA)을 포함한다. 동일하거나 다른 면역 보조자극 폴리펩티드 및/또는 보조자극 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코드화하는 기타 핵산 서열은 예를 들어 공적으로 입수가 가능한 진뱅크 데이터베이스를 조사함으로써 찾아볼 수 있다 (예를 들어 월드 와이드 웹 상의 ncbi.nlm.nih.gov에서 입수가 가능함).

<81> CD28와 CD80/CD86 간의 상호작용은 시그널 2의 변환에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 예를 들어 문헌 [Harding & Allison, J.Exp.Med. 1993, 177: 1791-96; Ramarathinam 등, J.Exp.Med. 1994, 179: 1205-14; Townsend & Allison, Science 1993, 259: 368-70; Gause 등, J.Immunol. 1997, 159: 1055-58] 참조. CD80은 휴면 B 세포에서 보통 발현되지 않고 말초 혈액 단핵구 및 DC에서 낮은 수준으로 발현된다; 그러나, 이러한 세포 양쪽 모두 뿐만 아니라 대식세포 및 기타 APC는 활성화 후에 CD80의 발현을 상향조절한다. 예를 들어, 문헌 [Lenschow 등, Ann.Rev.Immunol. 1996, 14: 233-58; Freeman 등, J.Immunol. 1989, 143:2714-22] 참조. 반대로, CD86은 말초 혈액 단핵구 및 DC에서 구조적으로 발현되고 B 세포에서 더욱 빠르게 상향조절된다. 예를 들어 [Lenschow 등, 상동, Inaba 등, J.Exp.Med. 1994, 180: 1849-60] 참조. APC 상에서 MHC/펩티드 복합체와의 TCR 상호작용은 CD80/86 분자와 CD28의 동시적인 맞물림을 가능하게 하고, 지질 키나아제 포스포디틸이노시톨 3-키나아제의 티로신 포스포틸화를 유도하고, 이것은 다시 IL-2 유전자 발현, 세포 증식 및 효과기 기능으로의 분화를 유도하는 일련의 복잡한 세포내 사건을 개시시킨다. 예를 들어 [Slavik 등, Immunol.Res. 1999, 19: 1-24; Azuma 등, Nature 1993, 366: 76-79; Allison & Krummel, Science 1995, 270: 932-33] 참조.

<82> 시그널 2는 Bcl-xL와 같은 항-세포고사 유전자의 조절을 통해 세포 사멸을 방지함으로써 생성 면역 반응을 더욱 증대시킬 수 있다. 예를 들어 [Radvanyi 등, J.Immunol. 1996, 156: 1788-98; Boise 등, Immunity 1995, 3: 87-98; Boise & Thompson, Science 1996, 274: 67-68] 참조. 면역 활성화의 초기 단계 후에, 다수의 추가의 수용체-리간드 쌍이 T 세포 및 APC의 표면에서 상향조절된다. 이러한 "2차" 수용체/리간드 쌍, 예컨대 4-1BBL/4-1BB는 초기 활성화 사건 후의 유지, 면역 항상성 및 면역학적 기억의 발생에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어 [Yu 등, Nat.Immunol. 2004, 5: 141-49; Armitage 등, Nature 1992, 357: 80-82; Zhai 등, J.Clin.Invest. 1998, 102: 1142-51; Bourgeois 등, Science 2002, 297: 2060-63; Kikuchi 등, Nat.Med. 2000, 6: 1154-59] 참조.

<83> **1. 4-1BBL**

<84> 본 발명의 하나의 특정한 구현양태에서, 면역 보조자극 폴리펩티드는 4-1BBL 폴리펩티드이다. 4-1BBL (또한 4-BB-L, 4-BB-리간드, TNFSF9, ILA 리간드)는 활성화 후 2 내지 3일에 활성화 B 세포, 대식세포 및 DC에서 발현된 유형 II 단백질이다. 예를 들어 [Alderson 등, Eur.J.Immunol. 1994, 24: 2219-27; Goodwin 등, Eur.J.Immunol. 1993, 23: 2631-41; Pollok 등, Eur.J.Immunol. 1994, 24: 367-74; DeBenedette 등, J.Immunol. 1997, 158: 551-59] 참조. 그의 수용체 4-1BB (CD137)은 천연 킬러 세포, 단핵구 및 휴면 DC 상에서 활성화된 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 표면 위에서 발현된다. 예를 들어 [Pollock, 상동; Wilcox 등, J.Immunol. 2002, 169: 4230-36; Futagawa 등, Int.Immunol. 2002, 14: 275-86; Pollok 등, J.Immunol. 1993, 150: 771-81] 참조.

<85> 4-1BB/4-1BBL 상호작용은 CD28-독립적 방식으로 CD8<sup>+</sup> T 세포에 시그널 2를 변환시켜 이들이 사이토카인을 생성하고 확장하고 효과기 기능을 획득하도록 자극시킨다. 예를 들어 문헌 [Cannons 등, J.Immunol. 2001, 167: 1313-24; Hurtado 등, J.Immunol. 1995, 155: 3360-67. Kim & Broxmeyer, J.Hematother. Stem Cell Res. 2001, 10: 441-49; Saoulli 등, J.Exp.Med. 1998, 187: 1849-62; Shuford 등, J.Exp.Med. 1997, 186: 47-55; Tan 등, J.Immunol. 1999, 163: 4859-68; Vinay & Kwon, Semin, Immunol. 1998, 10: 481-89] 참조. 4-1BB/4-1 BBL 상호작용은 단핵구 및 DC의 활성화, 사이토카인의 합성 및 NK 세포와의 소통을 위해 중요하다. 예를 들

어, 문헌 [Futagawa 등, 상동; Wilcox 등, J.Clin.Invest. 2002, 109: 651-9] 참조. 유사하게, 사이클린 D2 및 E의 상향조절 및 사이클린-의존성 키나아제 억제제 p27kip1의 하향조절을 통해 항원-특이적 T 세포의 팽창을 촉진함에 있어서의 역할에 추가로, 4-1BB 시그널전달은 항-세포고사 Bcl-xL 및 Bcl-2의 상향조절 및 장기간 면역학적 기억의 확립을 통해 활성화-유도 세포 사멸을 방지하기 때문에 T 세포 생존에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어 문헌 [Takahashi 등, J.Immunol. 1999, 162:5037-40; Hurtado 등, J.Immunol. 1997, 158: 2600-09; Kim 등, Eur.J.Immunol. 1998, 28: 881-90] 참조. 4-1BB/4-1BBL 상호작용은 IL-2, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 와 같은 유형 1 사이토카인을 선택적으로 촉진하는 것으로 밝혀졌으며, 이것은 4-1BB가 종양 근절에서 중요한 역할을 하는 유형 1 효과기 T 세포에 특이적인 보조자극 분자일 수도 있음을 제시한다.

<86> 최근들어, T<sub>reg</sub> 세포가 4-1BB 수용체를 구조적으로 발현하고 4-1BB 수용체를 통한 시그널 변환이 이러한 세포의 억제 기능을 저해한다는 것을 밝혀내었다. 예를 들어 [Choi 등, 상동; Morris 등, 상동] 및 하기 실시예 참조. 이것은 T<sub>reg</sub> 세포가 면역 체계의 종양 회피에서 의미있는 역할을 하기 때문에 중요하다. 몇몇 임상 연구는 T<sub>reg</sub> 세포의 수와 종양 진행 간에 직접적인 상관관계가 존재함을 증명한다. 문헌 [Curiel 등, Nat.Med.2004, 10: 942-49]. 사실상, 동물 모델에서 T<sub>reg</sub> 세포의 근절은 큰 종양의 근절을 가져오고 이것은 종양 진행에서 그들이 지배적인 역할을 한다는 직접적인 증거를 제공한다. 문헌 [Yu 등, J.Exp.Med. 2005, 201: 779-91]. 유사하게, HIV와 같은 감염성 인자가 면역 회피를 위해 T<sub>reg</sub> 세포를 사용할 수도 있다.

<87> 어떠한 이론에 의해 구속되기를 원하지 않지만, 본 발명에 따른 면역 보조자극 폴리펩티드로서 4-1BBL의 사용은 T 세포 위에서 4-1BB 동족 수용체를 활성화시킬 수도 있고, 그 결과 몇가지 중요한 면역-자극 효과를 가져온다. 한가지 효과는 CD28-비의존성 방식으로 CD8<sup>+</sup> T 세포로 시그널 2의 변환일 수도 있고, 이것은 T 세포가 사이토카인을 생성하고 확장하고 효과기 기능을 획득하도록 T 세포를 자극한다. 4-1BB/4-1BBL 상호작용의 다른 효과는 사이토카인의 합성 및 방출을 가져오는 단핵구 및 DC의 활성화일 수도 있다. 4-1BB 시그널전달의 다른 효과는 활성화-유도된 세포 사멸(AICD)을 방지함으로써 T 세포 생존을 촉진하고 장기간 면역학적 기억을 확립하는 것일 수도 있다. 4-1BB/4-1BBL 상호작용의 다른 효과는 T 세포, DC 및 대식세포로부터 유형 1 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 선택적 생성일 수도 있고, 이것은 종양 근절에 중요한 유형 1 효과기 T 세포에 작용한다. 또한, 상기 설명된 바와 같이, 4-1BB/4-1BBL 상호작용은 T<sub>reg</sub> 세포의 억제인자 기능을 억제할 수도 있다. 따라서, 예를 들어 4-1BBL-항원 접합체가 4-1BB 수용체를 발현하는 DC에 특이적으로 결합하고 항원 제시를 촉진하고, 일차 T 세포 반응의 발생을 위해 DC를 활성화하고, 활성화된 T 세포 (T<sub>eff</sub> 세포 포함) 및 NK 세포에 직접적으로 작용하여 항원에 대한 반응을 상승시키고, T<sub>reg</sub> 세포의 억제 기능을 저해할 수도 있다.

<88> 4-1BBL은 254개 아미노산 (26624 Da)을 함유한다. 문헌 [Alderson 등, Eur. J. Immunol. 1994, Sep; 24 (9): 2219-27] 참조. 인간 4-1BBL의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁 번호 P41273로 발견될 수 있다. 4-1BBL은 잠재적인 세포질 도메인을 형성하는 잔기 1-28을 가진 유형 II 당단백질, 단일 예측 막횡단 도메인을 형성하는 잔기 29-49, 잠재적인 세포외 도메인을 형성하는 잔기 50-254, 및 폴리-Leu 신장을 나타내는 잔기 35-41을 가진 유형 II 당단백질이다. 4-1BBL을 코드화하는 인간에서의 뉴클레오티드 서열은 인뱅크 수탁 번호 NM\_003811로 발견될 수 있다.

<89> 상기 언급된 바와 같이, 4-1 BBL은 활성화 후 2 내지 3일에 활성화된 B 세포, 대식세포 및 DC를 포함한 활성화된 항원 제시 세포에 의해 발현된다. 4-1BBL을 위한 수용체인 4-1BB는 활성화된 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 표면 위에서, 천연 킬러 세포, 단핵구 및 휴면 DC 상에서 발현된다. 동족 수용체 4-1BB에 결합할 수 있는 4-1BBL 또는 그의 단편의 잔기 50-254는 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 쌍 요소에 연결될 수 있거나 또는 결합 쌍과의 융합으로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 도 3A 및 B는 CSA-생쥐-4-1BBL 융합 단백질 (SEQ ID NO 5 및 6)의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 나타낸다. 도 4A 및 B는 인간 4-1BBL의 세포외 도메인 및 코어 스트렙타비딘의 세포외 도메인을 포함하는 융합 단백질의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 나타낸다 (SEQ ID NO 7 및 8).

<90> **2. CD80 & CD86**

<91> CD80 (또한, B7.1, CD28LG, LAB7로 공지됨) 및 CD86 (또한, B7.2, CD28LG2, LAB72로 공지됨)은 일례의 보조자극 폴리펩티드이고, 양쪽 모두 T 세포에 의해 발현되는 CD28/CTLA4 공동-수용체에 결합한다. CD80은 288개 아미노산 (33048 Da)을 함유한다. 문헌 [Freeman 등, J.Immunol. 143 (8), 2714-2722 (1989)] 참조. 인간 CD80의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁 번호 P33681로 발견될 수 있다. CD80은 분비 시그널을 형성하는 잔기 1-34, 잠재적인 세포외 도메인을 형성하는 잔기 35-242, 잠재적인 막횡단 도메인을 형성



성하는 잔기 243-263, 및 잠재적인 세포질 도메인을 형성하는 잔기 264-288을 가진 유형 I 당단백질이다. 따라서, 그의 분비 시그널 서열을 갖지 않은 성숙한 CD80 분자는 아미노산 35-288을 나타낸다. CD80을 코드화하는 인간에서 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM\_005191로 발견될 수 있다.

<92> 동족 수용체 CD28에 결합할 수 있는 CD80의 잔기 35-242 또는 그의 단편은 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 쌍 요소에 연결될 수 있거나 결합 쌍 요소와의 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 도 2A 및 2B는 인간 CD80 (B7.1) 및 코어 스트렙타비딘의 세포의 도메인을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 (SEQ ID NO:3) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4)를 나타낸다.

<93> CD86 (B7.2)는 329개 아미노산을 함유한다 (37696Da). 문헌 [Freeman 등, Science 262 (5135), 909-911 (1993)] 참조. 인간 CD86의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁번호 P42081로 발견될 수 있다. CD86은 분비 시그널을 형성하는 잔기 1-23, 잠재적인 세포의 도메인을 형성하는 잔기 24-247, 잠재적인 막횡단 도메인을 형성하는 잔기 248-268, 및 잠재적인 세포질 도메인을 형성하는 잔기 269-329을 가진 유형 I 당단백질이다. 따라서, 그의 분비 시그널 서열을 갖지 않은 성숙한 CD86 분자는 아미노산 24-329을 나타낸다. CD86을 코드화하는 인간에서 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM\_175862로 발견될 수 있다.

<94> 동족 수용체 CD28에 결합할 수 있는 CD86의 잔기 24-247 또는 그의 단편은 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 쌍 요소에 연결될 수 있거나 결합 쌍 요소와의 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 도 5A 및 5B는 인간 CD86 (B7.2) 및 코어 스트렙타비딘의 세포의 도메인을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 (SEQ ID NO:9) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:10)를 나타낸다.

<95> CD86은 보통 휴면 B 세포에서 발현되지 않고 말초 혈액 단핵구(PBC) 및 DC에서 낮은 수준으로 발현된다. 그러나, 그의 발현은 활성화 후에 B 세포 및 다른 APC, 예컨대 대식세포 및 DC에서 상향조절된다. 반대로, CD86은 PBC 및 DC에서 구조적으로 발현되고 B 세포에서 더욱 빠르게 상향조절된다. APC 위에서 MHC/펩티드 복합체와 T 세포 수용체(TCR)의 상호작용은 T 세포 위에서 CD80/86과 CD28의 동시적인 맞물림을 가능하게 하고, 이것은 지질 키나아제 포스포디틸이노시톨 3-키나아제의 티로신 포스포릴화를 유도하고, 이것은 다시 IL-2 유전자 발현, 세포 증식 및 효과기 기능으로의 분화를 유도하는 일련의 복잡한 세포내 사건을 개시시킨다. 시그널 2는 항-세포고사 유전자, 예컨대 Bcl-xL의 조절을 통해 세포 사멸을 방지함으로써 생성 면역 반응을 더욱 증대시킬 수도 있다.

<96> **3. LIGHT**

<97> 면역 활성화의 초기 단계 후에, 4-1BBL/4-1BB (상기 언급됨) 및 LIGHT/HVEM과 같은 "2차" 수용체/리간드 쌍이 T 세포 및 APC의 표면 위에서 상향조절된다. 이러한 수용체/리간드 쌍은 초기 활성화 사건 후의 유지, 면역 항상성 및 면역학적 기억의 발생에 관련된다.

<98> LIGHT 폴리펩티드 (또한 TNFS14, HVEM-L, LTg, TR2)가 림포톡신에 상동성인 TNF 상과 요소이다. 문헌[Mauri 등, Immunity 8(1), 21-30 (1998)] 참조. 인간 LIGHT의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁 번호 043557로 발견될 수 있다. LIGHT는 240개 아미노산 (26351 Da)을 함유하고 잠재적인 세포질 도메인을 형성하는 잔기 1-37, 단일 예측된 막횡단 도메인을 형성하는 잔기 38-58, 및 잠재적인 세포의 도메인을 형성하는 잔기 59-240을 가진 유형 II 당단백질이다. 절단 부위는 잔기 82-83을 포함한다. LIGHT를 코드화하는 인간에서 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM\_172014로 발견될 수 있다.

<99> 그의 동족 수용체 HVEM, LTβR 또는 TR6에 결합할 수 있는 LIGHT 또는 그의 단편의 잔기 59-240은 본 발명에 따라 사용하기 위해 결합 쌍 요소와 연결될 수 있거나 또는 결합 쌍 요소와의 융합으로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 도 1A 및 1B는 코어 스트렙타비딘 및 생쥐 LIGHT의 세포의 도메인을 포함하는 융합의 뉴클레오티드 (SEQ ID NO:1) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:2)를 나타낸다.

<100> LIGHT는 활성화된 T 세포, NK 세포 및 미성숙 수지상 세포에서 주로 발현되고 면역 반응의 다양한 측면을 조절하는 역할을 한다. LIGHT는 막-결합 단백질로서 합성되지만, 그의 세포-표면 발현이 몇몇 번역후 메카니즘에 의해 조절된다. LIGHT는 그의 발현 후 수 분 내에 기질 메탈로프로테이나제에 의하여 세포 표면으로부터 절단되고 가용성 분자로서 축적된다 (동종형 1; 대략 잔기 83-240을 나타낸다; 스위스-프로트 043557-1). 세포 표면 세포질 단편은 동종형 2를 나타낸다 (스위스-프로트 043557-2). 추가로, 다양한 세포 유형은 소포체에 LIGHT를 저장하고 다양한 생리학적 자극에 의하여 활성화 시에 그것을 분비한다. LIGHT의 가용성 형태의 역할이 특징화되지 않았으나, 이것은 HVEM 및 LTβR에 대해 경쟁함으로써 막-결합 형태의 기능을 억제하기 위한 음성 피드백 루프로서 역할을 할 수도 있다.

- <101> LIGHT는 3개의 상이한 수용체와 상호작용한다: (1) T 세포 위의 헤르페스바이러스 도입 매개인자 (HVEM), (2) 상피 및 간질 세포 위에서 주로 발견되는 LT $\beta$ R, 및 (3) 다양한 세포 위에서 수용성 유인 수용체 3. 이러한 상호작용은 LIGHT에 상이한 기능을 부여한다. 간질 세포 위에서 LT $\beta$ R와의 상호작용은 다양한 사이토카인/케모카인, 림프절(LN) 기관발생, 및 2차 림프 구조물의 회복과 연관된다. 다른 한편, 림프구 위에서 LIGHT와 HVEM 수용체의 상호작용은 IFN- $\gamma$  및 GM-CSF에 의해 좌우되는 사이토카인의 활성화 및 생성을 가져온다. 이 문헌에서, LIGHT/HVEM 축은 중앙 근절에서 중요한 역할을 하는 Th1 유형 반응의 활성화와 연관된 보조자극 시그널을 전달하는 것으로 보인다.
- <102> LIGHT는 림프 기관발생 및 Th1 유형 반응의 발생에서 역할을 한다. 예를 들어 문헌 [Yang 등, 2002, J.Biol.Regul.Homeost.Agents, 16: 206-10; Schneider 등, 2004, Immunol. Rev., 202: 49-66] 참조.
- <103> LIGHT의 효과가 시험관내 및 생체내 양쪽 모두에서 상이한 중앙 모델에서 밝혀졌다. LIGHT를 발현하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 암플리콘에 의해 형질도입된 만성 림프성 백혈병 세포는 혼합된 림프구 반응에서 T 세포 증식을 증진시키는 것으로 보고되었다. MDA-MB-231 인간 유방 암 세포 상에서 LIGHT의 과다-발현은 중앙 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 상이한 암 세포 주 내로 LIGHT의 형질감염은 이러한 세포에서 ICAM-1 발현을 자극한다. ICAM-1의 존재는 중앙 세포에서 항중앙 활성을 생성하기 위해 효과적인 시그널을 일으킬 수 있기 때문에 유리한 것으로 생각된다. LIGHT의 다른 중요한 기능은, T 세포 활성화 이외에도, LT $\beta$ R을 통해 시그널을 변환할 수 있는 능력이며, 이것은 케모카인 발현의 유도뿐만 아니라 간질 세포에서 부착 분자를 통해 매개된 2차 림프 구조물을 발생시키는데 중요한 역할을 한다. 간질 세포 위에서 LIGHT와 LT $\beta$ R과의 상호작용은 CCL21의 발현을 조절하고, 이것은 림프 조직으로 비감작 T 세포의 귀환을 제어한다.
- <104> 면역 보조자극 폴리펩티드가 LIGHT인 본 발명의 구현형태의 한가지 장점은, 림프 기관발생을 자극하고 Th1 유형 반응의 발생을 뒷받침하는 LIGHT의 능력이다. 다른 장점은 중앙에 대한 면역 반응을 자극하고 이러한 반응을 증대시키기 위해 중앙 간질을 활성화하는 LIGHT의 능력이다.
- <105> 간질은 중앙 부위 내로의 림프구 침윤을 막기 위해 물리적 장벽으로서 역할을 한다. 또한, 간질은 중앙 미세환경 내에서 림프구 활성화를 억제한다. 이것은 T 세포 활성화를 위해 요구되는 보조자극 시그널의 결여 및/또는 다양한 면역억제 가용성 매개인자, 예컨대 TGF- $\beta$  및 IL-10의 존재에 기인할 수도 있고, 이들은 간질 섬유모세포 및 중앙 세포 양쪽 모두에 의해 합성되고 분비된다. 간질은 중앙 세포를 중앙 부위에 제한함으로써 면역학적 무지를 촉진하고, 이에 의해 국소적 림프 절에 이들이 돌아다니는 것을 막는다.
- <106> 중앙 간질 세포는 다양한 면역학적 수용체, 예컨대 LT $\beta$ R을 발현할 수 있고, 이것은 본 발명에 따라 항-중앙 면역의 증진을 위해 이용될 수 있다.
- <107> **4. OX40L**
- <108> OX40L은 수지상 세포 및 기타 APC에 의해 발현되고, 활성화된 T 세포 위에 존재하는 OX40에 결합한다. OX40L은 183개 아미노산 (21950 Da)을 함유한다. 문헌 [Miura 등, Mol.Cell.Biol. 11: 1313-1325 (1991)] 참조. OX40L의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁 번호 P23510으로 발견될 수 있다. OX40L은 잔기 1-23에서 세포질 도메인, 잔기 24-50에서 막횡단 도메인 및 잔기 51-183에서 세포외 도메인을 가진 유형 II 당단백질이다. OX40L의 뉴클레오티드 서열은 3510 bp이고, 코드화 서열이 157-708이다 (진뱅크 수탁 번호 NM\_003326.2 참조). 동족 수용체 OX40에 결합할 수 있는 OX40L의 잔기 51-813 또는 그의 단편은 본 발명에 따라 사용하기 위해 결합 쌍 요소와 연결될 수 있거나 결합 쌍 요소에 C-말단 융합으로서 발현될 수 있다.
- <109> **5. CD40L**
- <110> 활성화 T 세포에 의해 CD40L이 발현되고 이것은 또한 단백질분해 공정에 의해 막 형태로부터 유래된 세포의 가용성 형태로서 존재한다. CD40L (a.k.a. TNFSF5)는 261개 아미노산 (29350 Da)을 함유한다. 문헌 [Villinger 등, Immunogenetics 53: 315-328 (2001)] 참조. CD40L의 전체 아미노산 서열은 수탁 번호 Q9BDN3로 발견될 수 있다. CD40L은 잔기 1-22에서 세포질 도메인, 잔기 23-43에서 막횡단 도메인 및 잔기 44-261에서 세포외 도메인을 가진 유형 II 당단백질이다. CD40L의 뉴클레오티드 서열은 1834 bp이고, 코드화 서열은 73-858이다 (진뱅크 수탁 번호 NM\_000074 참조). 동족 수용체 CD40에 결합할 수 있는 CD40L의 잔기 44-261 또는 그의 단편은 본 발명에 따라 사용하기 위해 결합 쌍 요소와 연결될 수 있거나 결합 쌍 요소에 N-말단 융합으로서 발현될 수 있다.
- <111> **6. PD-L1**



<112> PD-L1은 활성화 T 및 B 세포, 수지상 세포, 각질세포 및 단핵구 상에서 발현된다. PD-L1 (a.k.a. B7-H; B7H1; PDL1; PDCD1L1)은 290개 아미노산 (33275 Da)을 함유한다. 문헌 [Dong 등, Nat.Med. 5: 1365-1369 (1999)] 참조. PD-L1의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁 번호 Q9NZQ7로 발견될 수 있다. PD-L1은 N 말단의 18개 아미노산이 시그널 서열을 나타내는 290개 아미노산을 함유한다. 세포외 도메인은 아미노산 19-238에 위치하고, 막횡단 도메인은 잔기 239-259에 위치하고 세포질 도메인은 잔기 260-290에 위치한다. PD-L1의 뉴클레오티드 서열 (1553 bp)은 공개 데이터베이스로 입수가 가능하다 (진뱅크 수탁 번호 NM\_014143) (코드화 서열은 53-925이다). PD-L1의 동종형은 대안적인 스플라이싱에 의해 존재한다. 동족 수용체 PDCD1에 결합할 수 있는 PD-L1의 세포외 도메인 또는 그의 단편은 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 쌍 요소에 연결되거나 결합 쌍 요소에 대한 N-말단 융합으로서 발현될 수 있다.

<113> 7. GL50

<114> GL50 동종형 1은 널리 발현되고 (뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 췌장, 태반, 골격근, 골수, 결장, 난소, 전립선, 고환, 림프절, 림프구, 비장, 가슴샘 및 편도); GL50 동종형 2 (스위스 프로트 075144)는 림프절, 림프구 및 비장 및 활성화된 단핵구 및 수지상 세포에서 발현된다. GL50 (a.k.a. B7-H2; B7H2; B7RP-1; B7RP1; ICOS-L; ICOSLG; KIAA0653; 및 LICOS)는 290개 아미노산을 함유한다 (33275 Da). 문헌 [Wang 등, Blood, 96: 2808-2813 (2000)]. GL50의 전체 아미노산 서열은 스위스-프로트 데이터베이스에서 수탁 번호 075144로 발견될 수 있다. GL50은 302개 아미노산을 함유하고 N 말단에서의 18개 아미노산이 시그널 서열을 나타낸다. 세포외 도메인은 아미노산 19-256에 위치하고, 막횡단 도메인은 잔기 257-277에 위치하고, 세포질 도메인은 잔기 278-302에 위치한다. GL50의 뉴클레오티드 서열 (3239 bp)은 공개 데이터베이스로 입수가 가능하다 (진뱅크 수탁 번호 NM\_015259) (코드화 영역은 135-1043을 나타낸다). GL50의 동종형은 대안적인 스플라이싱에 의해 존재한다. 동족 수용체 ICOS에 결합할 수 있는 GL50의 세포외 도메인 또는 그의 단편은 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 쌍 요소에 연결되거나 결합 쌍 요소에 대한 N-말단 융합으로서 발현된다.

<115> 표 1은 다양한 일레의 보조자극 분자 및 그의 수용체를 요약하고 공동수용체 리간드 쌍 집합체의 구현양태를 포함한다.

표 1

구축물 명칭 및 배향	수용체	수용체 발현
CD80-CSA	CD28	거의 모든 인간 CD4T 세포 및 대략 50%의 CD8 T 세포에서 구성적
GL50-CSA	ICOS	휴면 T 세포에서 검출가능함 활성화 CD4 <sup>+</sup> T 및 CD8 <sup>+</sup> T 세포 및 NK 세포에서 상향조절됨
PD-L1-CSA	PD-1	CD4 <sup>+</sup> 및 CD8 <sup>+</sup> T 세포, B 세포 및 단핵구에서 유도성 NK-T 세포에서 낮은 수준
CSA-CD40L	CD40	B 세포, 단핵구, DC, 내피 세포 및 상피 세포에서 구성적
CSA-4-1BBL	CD137	활성화 T 세포 (피크 48h, 하강 96h)뿐만 아니라 사이토카인-처리 NK 세포에서 유도성 DC (저), 인간 단핵구, 난포 DC, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 조절 T 세포의 소집합에서 구성적
CSA-OX40L	OX40	활성화 CD4 (우선적) 및 CD8 (강한 항원 반응) T 세포 (피크 48h, 하강 96h)에서 유도성
CSA-LIGHT	HVEM	휴면 T 세포, 단핵구 및 미성숙 DC에서 구성적 T 세포 활성화 및 DC 성숙화에 대해 하향조절

<117> 본 발명에 따르면 다른 면역 보조자극 폴리펩티드가 사용될 수 있다. 예를 들어, US 2003/0219419 (그의 전체 내용이 여기에서 참고문헌으로 포함된다)는 본 발명에서 유용한 IL-2-CSA 융합 단백질 및 CSA-CD40L 융합 단백질을 기재한다. 요약하면, 본 발명에 따라 유용한 일레의 면역 보조자극 폴리펩티드는 다음을 포함한다.

**표 2**

B7 및 CD28 계통 요소

리간드	수용체
CD80 (B7.1)	CD28, CTLA-4 (CD152)
CD86 (B7.2)	CD28, CTLA-4
ICOSL (B7h, B7-H2, B7RP-1, GL50, LICOS)	ICOS (AILIM)
PD-L1 (B7-H1)	PD-1
PD-L2 (B7-DC)	PD-1
B7-H3	알려지지 않음
B7-H4 (B7x; B7S1)	알려지지 않음 (BTLA?)
알려지지 않음 (HVEM*)	BTLA

\* 이것은 TNF 요소이다.

<118>

**표 3**

TNF 계통 요소

리간드	수용체
OX40L	OX40 (CD134)
4-1BBL	4-1BB (CD137)
CD40L (CD154)	CD40
CD27L (CD70)	CD27
CD30L	CD30
LIGHT	HVEM, LTβR, DcR3
GITRL	GITR
BAFF (BLyS) **	BAFF-R, TACI, BCMA
APRIL **	TACI, BCMA

\*\* 이것은 B 세포 관련이다.

<119>

**표 4A**

B7 계통 요소의 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열을 위한 참고문헌

리간드 (인간)	참고문헌
<b>CD80 (B7.1)</b>	Freeman et al., J. Immunol. 143: 2714-2722(1989).
<b>CD86 (B7.2)</b>	Freeman et al., Science 262: 909-911(1993).
<b>ICOSL</b>	Wang et al., Blood 96: 2808-2813(2000). Yoshinaga et al., Int. Immunol. 12: 1439-1447(2000).
<b>PD-L1</b>	Dong et al., Nat. Med. 5: 1365-1369(1999). Freeman et al., J. Exp. Med. 192: 1027-1034(2000).
<b>PD-L2</b>	Tseng et al., J. Exp. Med. 193: 839-846(2001). Latchman et al., Nat. Immunol. 2: 261-268(2001).
<b>B7-H3</b>	Steinberger et al., Submitted (SEP-2003) to EMBL/GenBank/DDBJ databases. Mingyi et al., J. Immunol 168: 6294-6297(2002).
<b>B7-H4 (B7x; B7S1)</b>	Zang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 10388-92(2003). Sica et al., Submitted (APR-2003) to EMBL/GenBank/DDBJ databases.

<120>

**표 4B**

TNF 계통 요소의 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열을 위한 참고문헌

리간드	참고문헌
<b>OX40L</b>	Baum et al., <i>Circ. Shock</i> 44: 30-34(1994). Miura et al., <i>Mol. Cell. Biol.</i> 11: 1313-1325(1991). Godfrey et al., <i>J. Exp. Med.</i> 180: 757-762(1994).
<b>4-1BBL</b>	Alderson et al., <i>Eur. J. Immunol.</i> 24: 2219-2227(1994).
<b>CD40L</b>	Graf et al., <i>Eur. J. Immunol.</i> 22: 3191-3194(1992). Hollenbaugh et al., <i>EMBO J.</i> 11: 4313-4321(1992).
<b>CD27L (CD70)</b>	Goodwin et al., <i>Cell</i> 73: 447-456(1993).
<b>CD30L</b>	Smith et al., <i>Cell</i> 73: 1349-1360(1993).
<b>LIGHT</b>	Mauri et al., <i>Immunity</i> 8: 21-30(1998).
<b>GITRL</b>	Gurney et al., <i>Curr. Biol.</i> 9: 215-218(1999).
<b>BLyS</b>	Moore et al., <i>Science</i> 285: 260-263(1999).
<b>APRIL</b>	Hahne et al., <i>J. Exp. Med.</i> 188: 1185-1190(1998).

<121>

<122> **항원 및 감염성 인자**

<123> 본 발명의 방법 및 조성물은 TAA, 감염성 인자와 관련된 항원 및 감염성 인자 자체를 포함하여 항원 또는 감염성 인자에 대한 면역 반응을 발생하거나 증진시키기 위해 유용하다. 본 발명에 따르면, 표적 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 (또는 감염성 인자 자체)이 면역 세포에 제시되고 이에 의해 면역 반응을 발생하거나 증진시킨다.

<124> **1. TAAs**

<125> 하나의 구현양태에서, 항원은 TAA이고, 본 발명은 종양에 대한 환자의 면역 반응을 발생하거나 증진시키기 위해 효과적인 암 면역요법을 제공한다. 본 구현양태에 따르면, 본 발명은 종양 크기를 감소시키는 방법 및 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

<126> 본 발명이 유용하게 적용되는 대표적인 종양 세포는 제한 없이 폐, 간, 유방, 방광, 위, 결장, 췌장, 피부 등을 포함한 각종 신체 기관으로부터 유래될 수도 있는 암종을 포함한다. 암종은 기관 또는 샘에서 발생하는 샘암종 및 편평상피에서 유래된 편평세포 암종을 포함할 수도 있다. 처리될 수 있는 다른 암은 육종, 예컨대 골육종 또는 뼈 육종 (뼈), 연골 육종 (연골), 평활근육종 (평활근), 횡문근육종 (골격근), 중피 육종 또는 중피종 (체강의 막 내층), 섬유육종 (섬유 조직), 혈관육종 또는 혈관내피종 (혈관), 지방육종 (지방조직), 신경아교종 또는 별아교세포종 (뇌에서 발견되는 신경성 연결 조직), 점액육종 (원시 배아 연결 조직), 에센키머스 (esenchymous) 또는 혼합된 중배엽 종양 (혼합된 연결 조직 유형)을 포함한다. 골수종 이외에도, 백혈병 및 림프종이 치료받을 수 있다.

<127> 특정한 종양 유형과 관련된 다수의 TAA가 동정되었다. 이들은 인간 텔로머라제 역 전사효소 (hTERT), 서비빈, MAGE-1, MAGE-3, 인간 융모막성 생식선자극호르몬, 암배 항원, 알파 페도단백질, 췌장 종양태아 항원, MUC-1, CA125, CA 15-3, CA 19-9, CA 549, CA 195, 전립선-특이성 항원; 전립선-특이성 막 항원, Her2/neu, gp-100, 돌연변이체 K-ras 단백질, 돌연변이체 p53, 끝이 절단된 표피 성장 인자 수용체, 키메라 단백질 <sup>n210</sup>BCR-ABL; 인간 파필로마바이러스의 E7 단백질; 및 엡스테인-바르 바이러스의 EBNA 3 단백질을 포함한다. 환자의 항-종양 면역 반응을 발생시키거나 증진시키기 위하여 이러한 항원, 그의 항원성 단편, 및 항원 및/또는 단편의 혼합물의 어느 것이라도 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 표 5는 일례의 일부 TAA 및 이러한 TAA와 관련된 질병을 기재하고 있다.

**표 5**

<128>

항원	질병
cTAGE-1 및 변형체	피부 T 세포 림프종
BLA 또는 글로보트리아오실세라미드 (P <sup>k</sup> 항원)	버킷트 림프종
인간 T-세포 백혈병 바이러스-관련 세포 막 항원 (HTLV-MA)	성인 T-세포 백혈병 림프종 (ATL)
가슴샘세포 표면 항원 JL 1	대부분의 급성 백혈병

성인 T 세포 백혈병 관련 인간 레트로바이러스 관련 항원 (ATLA)	성인 T 세포 백혈병
엡스테인-바르 바이러스(EPV) 항원	버키트 림프종, 호지킨 병
역형성 림프종 키나아제(ALK)	CD30+ 역형성 대 세포 림프종
융합 단백질 (NPM/ALK 및 변형체)	(ALCL)
일반적인 급성 림프아구 백혈병 항원 (CALLA)	대부분의 급성 림프모구 백혈병
면역글로블린 Id; 유형 II 당단백질 (예, HM1.24; KW-2, KW-4, KW-5, KW-12); 중앙태아 항원 미성숙 라미닌 수용체 단백질 (OFA-iLRP); EBV 단백질 (예, LMP2A)	림프세포증식성 질병

<129> T-세포에 의해 인지되는 추가의 인간 TAA는 예를 들어 문헌 [Novellino 등, "A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update" Cancer Immunology and Immunotherapy, 54: 187-207 (2005)] (여기에서 참고문헌으로 인용됨)에서 발견될 수 있다. 이러한 질병의 동물 계통 및 다른 동물 질병에 상응하는 많은 동물 TAA가 당 기술분야에 공지되어 있고 본 발명의 범위 내에 포함된다.

<130> 본 발명의 하나의 구현양태에서, TAA는 인간 텔로머라제 역 전사효소(hTERT) 및 TAA로서 서비빈으로 구성된 군에서 선택된다. hTERT는 인간 암의 85% 초과에서 발현되는 반면, 정상 조직에서 그의 발현은 제한된다. 예를 들어 [Vonderheide 등, Immunity 1999, 10: 673-79] 참조. 유사하게, 세포고사의 억제체로서 동정된 서비빈은 정상 조직으로부터 부재하지만 폐, 결장, 췌장, 전립선 및 유방암을 포함한 대부분의 종양 유형에서 발현된다. 예를 들어 [Ambrosini 등, Nat.Med.1997, 3:917-21] 참조. 이러한 TAA는 대부분의 암 유형에서 발현되고 정상 조직으로부터 드물거나 부재하기 때문에, 본 발명에 따른 암 면역요법에서 사용하기 위해 매력적인 항원이다.

<131> 본 발명의 다른 구현양태에서, TAA는 자궁경부 암과 관련된다. 세계에서 대략 500,000 명의 여성이 매년 자궁경부 암을 발병하고 여성에서 암으로부터의 두 번째 주된 사망 원인이 된다. 자궁경부 암은 인간 파필로마바이러스(HPV)에 의한 생식기 바이러스 감염에 직접 연관되며 세계적인 건강 상의 문제가 되고 있다. 특히 HPV 유형 16은 자궁경부 암의 거의 절반에서 발견되고 있다. 생식기 HPV 유형 16 및 18, 및 덜 빈번하게 유형 31, 33, 35, 45, 51 및 56은 자궁경부 및 기타 항문성기 암의 병인론에 연루되어 있다. 암 세포에서 발견되는 HPV 유형은 시험관내 연구에서 형질전환 활성을 가지며, 바이러스 형질전환 단백질, E6 및 E7 ("초기" 단백질로서 공지됨)은 자궁경부 암 세포 주 및 HPV-관련 암에서 지속적으로 발현된다. E6 및 E7은 중앙 억제인자, p53 및 망막모세포종(Rb)에 각각 결합되는 것으로 알려져 있다. HPV-관련 악성 형질전환에서, 후기 유전자(L1 및 L2) 및 일부 초기 유전자 (E1 및 E2)가 대부분 소실되고, E6 및 E7이 암종에서 자주 발견되는 유일한 개방 판독 프레임으로 남는다. E6 및 E7의 발현은, p53 및 Rb와 같은 단백질에 의해 보통 매개되는 세포 증식의 조절을 극복하는 것으로 보이며, 이는 제어되지 않은 성장을 가능하게 하고 악성 형질전환을 위한 잠재력을 제공한다.

<132> 따라서, 본 발명의 특정한 구현양태에 따르면, TAA는 E6 및 E7의 하나 이상이다. 본 발명에 따르면 E6 및 E7의 사용이 몇 가지 장점을 제공할 수도 있다. 먼저, E6 및 E7은 대부분의 자궁경부 암에서 지속적으로 발현된다. 두 번째로, 대부분의 종양 항원은 정상 단백질 또는 돌연변이된 자기-단백질로부터 유래되는 반면, E6 및 E7은 완전한 외래 바이러스 단백질이고 돌연변이체 단백질에 비해 더욱 항원성의 펩티드 또는 에피토프를 품을 수도 있다. 세 번째로, E6 및 E7은 악성 표현형의 유도 및 유지에서 중요한 역할을 하고, 기능성 E6 및 E7 없이, 이러한 세포는 발암성이 중단된다.

<133> 상이한 종 (예, 인간, 소)로부터의 뉴클레오티드 및 E6 및 E7 단백질의 아미노산 서열 및 상이한 파필로마바이러스 유형 (예, HPV16 및 18)에 대하여 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, HPV 서열 데이터베이스 <http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/index/html>. HPV16 E6, HPV16 E6 변형체 및 E7의 아미노산 서열을 도 6A (SEQ ID NO:11), 6B (SEQ ID NO:12) 및 6C (SEQ ID NO:13)에 각각 나타낸다.

<134> **2. 감염성 인자**

<135> 본 발명이 유용하게 작용하는 대표적인 감염성 인자는 제한없이 바이러스, 세균, 진균 또는 원생동물을 포함한다. 표 6은 감염성 인자의 예를 나타낸다.

표 6

<136>

	병원 인자	속	관련 질병
세균	미코박테리움 투베르쿨로시스		결핵
	바실러스 안트라시스		탄저병
	스타필로코쿠스 아우레우스		패혈증
바이러스	아데노바이러스과	마스트아데노바이러스	감염성 개 간염
	아레나바이러스과	아레나바이러스	림프구성 맥락수막염
	칼리시바이러스과	노로바이러스	노르윅크 바이러스 감염
	코로나바이러스과	코로나바이러스	중증 급성 호흡기 증후군
		토로바이러스	
	필로바이러스과	마르버그바이러스	바이러스성 출혈열
		에볼라바이러스	바이러스성 출혈열
	플라비바이러스과	플라비바이러스	서부 나일강 뇌염
		헤파시바이러스	간염C 바이러스 감염
		페스티바이러스	소 바이러스 설사, 전통적 돼지 열
	헤파드나바이러스과	오르소헤파드나바이러스	간염
	헤르페스바이러스과	심플렉스바이러스	단순포진, 성기 헤르페스, 소 유두염
		바리셀로바이러스	수두, 대상포진, 말에서의 유산, 소에서의 뇌염
		사이토메갈로바이러스	전염 단핵구증
		마르디바이러스	마택 질병
	오르소미소바이러스과	인플루엔자바이러스A	인플루엔자
		인플루엔자바이러스B	인플루엔자
	파필로마바이러스과	파필로마바이러스	피부 사마귀, 피부암, 자궁경부암
	피코르나바이러스과	엔테로바이러스	회색질척수염
		리노바이러스	감기
		아프토바이러스	수족구 병
		헤파토바이러스	간염
	포스바이러스과	오르소포스바이러스	우두, 종두, 마마
	레오바이러스과	로타바이러스	설사
		오르비바이러스	청설병
	레트로바이러스과	감마레트로바이러스	고양이 백혈병
		델타레트로바이러스	소 백혈병
		렌티바이러스	인간 면역결핍증 FIV 및 SIV
	라브도바이러스과	리사바이러스	광견병
		에페메로바이러스	소 일시열
	토가바이러스과	알파바이러스	동부 및 서부 마 뇌염
	기생충		플라스모듐
		리슈만편모충	리슈만편모충증
진균		아스퍼길러스	
		칸디다	
		록시디아	
		크립토코키	
		게오투리카	
		히스토플라스마	
		마이크로스포리디아	
	뉴모시스티스		

<137>

인간 및 조류 인플루엔자, HIV, 간염 C, 결핵, 서부 나일강 열바이러스, 크립토코쿠스증 (수막염) 헤르페스, 클



라미디아 및 탄저병이 감염성 인자의 대표예이다. 감염성 인자와 관련된 항원이 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

- <138> 하나의 구현양태에 따르면, 본 발명에 따른 접합체에서 감염성 인자 자체가 사용된다. 본 구현양태에 따르면, 감염성 인자, 예컨대 바이러스 및 결합 쌍 요소를 포함하는 접합체가 사용된다. 인간 또는 조류 인플루엔자 바이러스 또는 HIV 또는 기타 바이러스를 포함한 바이러스와 같은 감염성 인자가 사용될 수 있다. 그의 감염성을 감소시키거나 제거하기 위하여 감염성 인자가 변형되거나 약해질 수 있다.
- <139> 단지 예증을 위하여, 본 발명의 측면이 인플루엔자에 관련하여 더욱 상세히 설명된다. 인플루엔자 바이러스에 의해 유발되는 전염성 질병이고, 호흡관에 영향을 미치며, 코, 목 및 폐에서의 증상뿐만 아니라 열, 두통, 피로 및 동통을 종종 일으킨다. 또한, 이것은 폐렴, 기관지염 또는 굼염 및 귀 감염과 같은 합병증을 일으키거나 만성 상태를 악화시킨다. 인플루엔자 바이러스는 유형 A, B 또는 C로서 분류된다. 유형 A 및 B에 속하는 균주는 집단으로 퍼지고, 대부분의 인간 인플루엔자와 관련된다. 유형 A 인플루엔자는 인간에서 압도적인 대부분의 공공 건강 문제를 유발한다.
- <140> 유형 A 인플루엔자 바이러스는 이러한 단백질의 2가지의 구성에 의존하여 분류된다; 헤마글루티닌(H), 표적 세포 내로 바이러스의 결합 및 도입을 촉진하는 단백질, 및 뉴라미니다제(N), 감염된 세포로부터 새로 형성된 바이러스 입자의 방출 및 신체를 통한 그것의 퍼짐에 관여하는 단백질. 15개 헤마글루티닌 아형(H1-H15) 및 9개 뉴라미니다제 아형 (N1-N9)이 동정되었다. 인간에서 인플루엔자의 큰 출현은 3개의 헤마글루티닌 아형(H1, H2 및 H3) 및 2개의 뉴라미니다제 아형(N1 및 N2)에 의해 유발된다. 예를 들어, 1918 flu 바이러스의 헤마글루티닌은 H1이고 그의 뉴라미니다제는 N1이고, 따라서 H1N1 아형으로서 명명된다. 다른 출현은 1957년에 H2N2 아형, 1968년에 H3N2, 및 극동아시아, 중국 및 현재 유럽 및 중동에서 최근 조류 및 인간에서 출현된 H5N1을 포함한다.
- <141> 인플루엔자 A 바이러스는 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제의 반응성 또는 항원성 부위에서 돌연변이 또는 변화와 연관된 메카니즘에 의해, 또는 다른 아형에 의해 하나의 헤마글루티닌 또는 뉴라미니다제 아형의 갑작스런 치환에 의해 끊임없이 발달된다. 이러한 메카니즘에 의해 새로운 바이러스 아형이 얻어지고 인플루엔자 바이러스가 면역 체계의 방어를 피하고 퍼지도록 한다. 인플루엔자 A 바이러스의 항원성 변형체가 매년 출현하고, 국제 보건 기구에 의해 진행되는 인플루엔자 바이러스의 국제적 감독을 기초로 하여 최신의 백신 체제를 요구한다. 최근들어 H5N1과 같은 새로운 인플루엔자 바이러스 아형이 지속적으로 출현하는 현상에 기인하여, 더 많은 주된 인플루엔자의 출현이 발생할 것으로 기대된다. 그럴듯한 생체공포 영화시나리오에서, 실험실-유래 바이러스가 항원성 변화를 초래하도록 유사하게 설계되고 따라서 확립된 숙주 방어를 피하는 돌발을 일으킨다.
- <142> 본 발명의 접합체는, 빠르게 생성 및 제조되기 쉽고 그의 항원성 성분이 어려움 없이 현재의 건강상의 요구를 기초로 하여 변화되고 새롭게 될 수 있으며, 바이러스성 기관 및 감염된 세포를 선택적으로 표적으로 하고, 치료 효과를 위해 감염 후에 뿐만 아니라 예방을 위해 감염 전에 투여될 수 있는, 인플루엔자 백신에서 사용될 수 있다.
- <143> 따라서, 하나의 구현양태에 따르면, 인플루엔자 항원 (또는 그의 항원성 단편)이 본 발명의 접합체의 항원 성분으로서 사용된다. 예를 들어, 항원은 하나 이상의 H1 및 N1 (양쪽 모두 고 면역원성) 및/또는 하나 이상의 핵 단백질(NP) 및 기질 단백질 1 (MP1) 및/또는 기질 단백질 2 (MP2) (모두 고 보존된 구조 단백질)를 포함할 수도 있다. H5와 같은 세계적으로 유행하는 균주로부터의 단백질이 본 발명에 따른 항원으로서 사용될 수 있다. 어떠한 이론에 의해 제한되기를 원하지 않지만, NP 및 MP2와 같은 세포내 단백질이 변동을 거의 또는 전혀 나타내지 않기 때문에 더욱 보편적인 백신을 제공할 수도 있고, 따라서 일 년 마다의 조절이 필요없이 이종 바이러스 감염을 방지할 수도 있다. 예를 들어, NP는 인플루엔자 A 단리물 중에서 90% 초과 단백질 서열 상동성을 나타내고 지배적인 세포독성 T 세포 표적 에피토프를 함유한다. 본 발명에서 유용한 다른 인플루엔자 항원은 PA, PB1 및 PB2 (RNA 폴리머라제 소단위) 및 NS1 및 NS2 (인터페론 반응 억제인자 및 RNP 핵 유출)을 포함한다. 문헌 [Brown, 2000, Biomed. Pharmacother. 54: 196-209; Steinhauer 등, 2002, 36: 305-32; De Jong 등, 2000, 40: 218-28; Alexander, Vet.Microbiol. 74: 3-13] 참조.
- <144> 따라서, 하나의 구현양태에 따르면, 유형 A 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질 (또는 그의 항원성 단편)이 본 발명의 접합체의 항원 성분으로서 사용된다. 현재, 인플루엔자의 예방은 주 성분으로서 H를 가진 인플루엔자 백신을 피하 주사함으로써 달성된다. 예를 들어 인플루엔자 바이러스 A/푸에토리코(PuertoRico)/8/34 (PR8)으로부터의 H1 (H1N1)이 지배적이고 순환하는 H 단백질이며 특징화되어 있고 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 다른 구현양태에서, 유형 A 인플루엔자 뉴라미니다제 단백질 (또는 그의 항원성 단편)이 접합체의 항원 성분으로서



사용된다. H 단백질-함유 접합체 또는 N 단백질-함유 접합체를 포함하는 조성물이 인플루엔자에 대한 백신으로서 유용하다. (예를 들어, 현재의 인플루엔자 백신은 주 성분으로서 H 단백질을 포함하고, 상동성 바이러스의 전염을 막기 위해 충분한 면역을 유도하는 것으로 밝혀졌다). 대안적으로, H 단백질을 포함한 접합체 및 N 단백질을 포함한 접합체 또는 항원들의 조합, 예컨대 가변 및 보존 항원의 조합을 투여하는 것이 유리할 수도 있다. 이것은 각각 단일의 항원-함유 접합체를 포함하는 2 이상의 조성물을 투여함으로써 또는 단일 조성물에 2 이상의 접합체 (따라서 2 이상의 항원)를 제공함으로써 달성될 수 있다. 하나의 구현양태에서, 현재의 공공 건강 요구를 기초로 하여 접합체(들)의 항원 성분이 선택된다.

<145> 하나의 구현양태에서, 접합체는 면역 보조자극 폴리펩티드로서 4-1BBL을 포함한다. 어떠한 이론에 의해 구속되지 않을지 모르지만, 이러한 접합체가 생체내에서 환자에게 투여될 때 DC 위에서 4-1BBL 및 4-1BB 수용체 간의 상호작용을 통해 DC에 결합하고, 그 결과 DC의 표면 위에서 백신의 내재화 및 인플루엔자 항원의 제시뿐만 아니라 DC의 활성화 및 성숙화를 가져오는 것으로 생각된다. DC의 활성화는 CD8 및 CD4 T 세포와의 상호작용 및 이들의 활성화를 유도할 수도 있다. 활성화된 CD4 T 세포는 B 세포와 상호작용할 수도 있고 항체 분비 세포 내로의 활성화 및 분화를 일으키며 이것은 체액 반응을 유발한다. CD8 T 세포의 활성화는 바이러스-감염된 세포를 사멸시키는 기능을 하는 더 많은 CD8 T 세포의 분화 및 증식을 유도할 수도 있다. 접합체는 4-1BB 수용체를 발현하고 시그널을 더욱 증폭시키는 활성화된 CD8 및 CD4 T 세포에 직접 결합할 수도 있다. 또한, 접합체 (4-1BBL을 통해)는 활성화된 천연 킬러(NK) 세포에 직접 결합할 수도 있고, 이것은 바이러스-감염된 세포를 사멸시키는 기능을 하며, 이들 모두는 더욱 강력한 면역 반응을 가져온다. 따라서, 접합체는 치료 및 예방 백신에서 그의 효력을 뒷받침하는 세포 및 체액 반응을 일으킬 것이다.

<146> 다른 항원성 인자에 대한 백신으로서 유용한 접합체의 항원 성분은 감염성 인자와 관련된 항원을 기초로 하여 당업자에 의해 유사한 방식으로 선택될 수 있다. 예를 들어, HIV와 관련된 항원은 HIV 외피 gp120 에피토프 (예, V3와 같은 가변 루프) 또는 기타 HIV 단백질, 예컨대 Gag 단백질 (Pr55gag, 기질 p17, 캡시드 p24, 뉴클레오패시드 p7), p5; Pol (폴리머라제), Vif (바이러스 감염성 계수 p23); Vpr (바이러스 단백질 R p15); Rev (바이러스 유전자 발현 p19의 조절인자); Vpu (바이러스 단백질 U); Env (gp 160, gp 120, gp 41); Tat (전사 활성화인자 p14); 및 Nef (네가티브 효과기 p24)를 포함한다. 예를 들어 [Peters, 201, Vaccine 2: 688-705; Michael, 2003, Clin.Med.3: 269-72; Gandhi & Walker, 2002, Ann.Rev.Med. 53: 149-72; Haseltine, 1991, FASEB 5: 2349-60] 참조. 백신에서 유용한 다른 항원은 헤모필루스 인플루엔자에 유형 b의 캡슐 다당류, 네이제리아 메닝기티디스의 캡슐 다당류, 스트렙토코쿠스 뉴모니아의 캡슐 다당류, 간염 B의 표면 항원, 및 디프테리아 및 과상풍 독소의 비활성화 외독소를 포함한다. 이러한 항원은 인플루엔자 항원에 관해 상기 기재된 바와 같이 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

<147> **결합 쌍**

<148> 일례의 결합 쌍은 비오틴 및 스트렙타비딘(SA) 또는 아비딘이다. 비오틴에 대해 실질적인 결합 활성, 예컨대 천연 SA 또는 아비딘의 결합 친화성의 적어도 50% 이상을 보유한 SA 또는 아비딘 단편이 각각 사용될 수도 있다. 이러한 단편은 스트렙타비딘 잔기 13-138, 14-138, 13-139 및 14-139를 포함할 수도 있는 전체-길이 스트렙타비딘 폴리펩티드의 끝이 절단된 변형체 "코어 스트렙타비딘" ("CSA")을 포함한다. 예를 들어 [Pahler 등, J.Biol.Chem. 1987, 262: 13933-37] 참조. 비오틴에 대해 강한 결합을 보유하는 스트렙타비딘 및 아비딘의 다른 끝이 절단된 형태가 또한 사용될 수도 있다. 예를 들어 [Sano 등, J Biol Chem. 1995 Nov 24, 270 (47): 28204-09 (코어 스트렙타비딘 변형체 16-133 및 14-138 기재)] (미국 특허 6,022,951) 참조. 실질적으로 비오틴 결합 활성을 보유하거나 증가된 비오틴 결합 활성을 보유하는 스트렙타비딘의 돌연변이체 및 스트렙타비딘의 코어 형태가 사용될 수도 있다. 문헌 [Chilcoti 등, Proc Natl Acad Sci USA 1995 Feb 28; 92(5): 1754-8; Reznik 등, Nat Biotechnol. 1996 Aug; 14(8): 1007-11] 참조. 예를 들어, 잠재적인 T 세포 에피토프 또는 림프구 에피토프를 제거하기 위해 감소된 면역원성을 가진 돌연변이체, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발에 의해 돌연변이된 돌연변이체가 사용될 수 있다. 문헌 [Meyer 등, Protein Sci. 2001 10: 491-503] 참조. 유사하게, 실질적인 비오틴 결합 활성 또는 증가된 비오틴 결합 활성을 보유한 아비딘의 돌연변이체 및 아비딘의 코어 형태가 사용될 수도 있다. 문헌 [Hiller 등, J.Biochem. (1991) 278: 573-85; Livnah 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA (0: 5076-80 (1993))] 참조. 편의상, 본 명세서에서, 사용된 용어 "아비딘" 및 "스트렙타비딘"은 비오틴-결합 단편, 돌연변이체 및 이러한 결합 쌍 요소의 코어 형태를 포함한다. 아비딘 및 스트렙타비딘이 상업적 공급업자로부터 입수가 가능하다. 또한, 스트렙타비딘 및 아비딘을 코드화하는 핵산 서열 및 스트렙타비딘 및 아비딘 아미노산 서열은 예를 들어 진뱅크 수탁 번호 X65082; X03591; NM\_205320; X05343; Z21611 및 Z21554에서 발견될 수 있다.

- <149> 여기에서 사용된 "비오틴"은 NHS-비오틴 및 EZ-링크™ 술포-NHS-LC-비오틴 (피어스(Pierce))와 같은 세포 표면 (종양 세포 표면 포함)과 같은 표면에 결합할 수 있는 비오틴-함유 잔기를 포함한다. 비오틴의 이러한 단백질 반응성 형태가 통상적으로 입수가 가능하다.
- <150> 비오틴과 그의 결합 파트너, 아비딘 또는 스트렙타비딘 간의 상호작용은 본 발명의 내용에서 몇 가지 장점을 제공한다. 예를 들어, 비오틴은 스트렙타비딘 ( $10^{13} \text{ M}^{-1}$ ) 및 아비딘 ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ )에 대해 극히 높은 친화력을 갖는다. 추가로, 스트렙타비딘 및 아비딘은 비오틴의 4개 분자에 각각 결합하는 사량체 폴리펩티드이다. 따라서, 스트렙타비딘 또는 아비딘을 포함하는 면역 보조자극 잔기가 사량체 및 고급 구조를 형성하는 경향을 갖는다. 그 결과, 이들은 예컨대 수용체의 응집을 통하여 더욱 강력한 시그널 변환을 위해 상응하는 면역 세포 수용체에 교류될 수 있다.
- <151> 당업자라면, 유리한 성질을 나타내는 면역 보조자극 분자의 고급 구조, 예컨대 면역 보조자극 분자의 이량체, 삼량체, 사량체 및 고급 다량체를 포함한 접합체를 제공하기 위하여, 다른 메카니즘 (예를 들어 다른 결합 잔기 또는 화학적 또는 유전적 가교를 사용한 기타 접합 방법)이 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 접합체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- <152> **접합체**
- <153> 면역 보조자극 폴리펩티드, 항원 또는 감염성 인자 및 결합 쌍의 요소를 포함하는 접합체가 당 기술에 알려져 있는 방법에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드/항원/감염성 인자 및 결합 쌍 요소가 서로에 공유 결합될 수 있거나 직접적으로 또는 링커를 통해 서로에 접합될 수 있다. 하나의 구현양태에 따르면, 폴리펩티드/항원/감염성 인자 및 결합 쌍 요소가 융합 단백질의 성분이다. 융합 단백질은 당 기술분야에 공지된 다수의 상이한 방법에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 하나 이상의 성분 폴리펩티드는 화학적으로 합성될 수 있거나 또는 공지된 재조합 핵산 기술을 사용하여 발생될 수 있다. (여기에서 사용된 바와 같이, "핵산"은 RNA 또는 DNA를 가리킨다). 본 발명에서 유용한 핵산 서열은 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 획득될 수 있다. 다양한 PCR 방법이 예를 들어 문헌 [PCR Primer: A Laboratory Manual, Diffebach 7 Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995]에 기재되어 있다.
- <154> 하나의 구현양태에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드가 C-말단을 통해 결합 쌍 요소의 N-말단에 결합된다. 예를 들어, 면역 보조자극 폴리펩티드가 C-말단을 통해 코어 스트렙타비딘(CSA)의 N-말단에 결합될 수 있다. 따라서, 본 발명은 CD80-CSA 융합 단백질을 포함하고, CD80 잔기가 C-말단을 통해 CSA의 N-말단에 결합된다. 다른 구현양태에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드가 N-말단을 통해 결합 쌍 요소의 C-말단에 결합된다. 예를 들어, 면역 보조자극 폴리펩티드가 N-말단을 통해 CSA의 C-말단에 결합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 CSA-4-1BBL, CSA-LIGHT, CSA-CD40L 및 CSA-OX40L 융합 단백질을 포함하고, 여기에서 CSA 잔기가 C-말단을 통해 면역 보조자극 폴리펩티드의 N-말단에 결합된다. 면역 보조자극 폴리펩티드는 결합 쌍 요소에 직접적으로 결합될 수 있거나 하나 이상의 연결 폴리펩티드와 같은 하나 이상의 연결 잔기를 통해 연결될 수도 있다.
- <155> 하나의 구현양태에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드, 항원 또는 감염성 인자가 비오틴화된다. 비오틴화 접합체는 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 만들어질 수 있고 이하 실시예에 예시된다.
- <156> 예를 들어, 비오틴화 단백질 또는 감염성 인자를 발생시키기 위하여 비오틴 아비택 테크놀로지 (아비디티 인코포레이티드, 미국 코넥티컷주 덴버)를 사용할 수 있다. 비오틴 아비택은 비오틴 리가제, BirA에 의해 인지되는 특유한 15개 아미노산 펩티드로 이루어지고, 펩티드 서열에서 비오틴을 리신 잔기에 부착시킨다. [Schatz, 1993, Biotechnology, 11: 1138-43]. 비오틴 아비택이 유전적으로 주요 단백질에 융합될 수 있고, 이것은 단백질이 비오틴 분자로 표지화될 수 있게 한다.
- <157> 비오틴 아비택 기술에 대해 한가지 잠재적인 단점은, 시스템이 표지 영역에서 단일의 특유한 리신 잔기에 있는 단백질을 비오틴화하기 때문에 낮은 정도의 비오틴화 가능성이다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 정제된 비오틴 리가제를 사용하여 정제된 표지화 단백질을 시험관내에서 변형시킬 수 있다. 비오틴화를 효소적으로 수행하기 때문에, 반응 조건이 더욱 온화하고 표지화는 고 특이성이며 반응이 비오틴 유도체를 사용하는 단백질의 화학적 변형에 비해 더욱 효율적이다. 대안적으로, 유전자 조작된 비오틴화 단백질을 생성하기 위하여 문헌 [Jordan 등, 2003, Clin.Diag.Lab.Immunol. 10: 339-44]에 기재된 방법이 사용될 수 있다.
- <158> 단편이 관계된 전체-길이 잔기의 활성을 보유하는 한, 면역 보조자극 폴리펩티드, 결합 쌍 요소 항원 또는 감염성 인자의 단편이 본 발명에서 유용하다. 따라서, 예를 들어, 면역 보조자극 단편은 그의 면역 보조자극 활성

을 보유해야 하고 (예를 들어 그의 수용체 또는 리간드에 결합하는 능력을 보유), 결합 요소 단편은 결합 파트너와의 결합 능력을 보유해야 하고, 항원 또는 감염성 인자 단편은 관계된 전체-길이 항원 또는 감염성 인자에 대해 면역 반응을 유도하는 능력을 보유해야 한다. 당 기술분야에서 통상적인 방법에 의하여 보유된 활성에 대해 단편을 선별할 수 있다. 면역 보조자극 폴리펩티드의 일례의 단편을 이하에서 기재한다.

<159> 접합체는 결합 쌍 요소와 면역 보조자극 폴리펩티드, 항원 또는 감염성 인자 간의 펩티드 링커와 같은 링커를 포함할 수도 있다. 접합체의 한쪽 또는 양쪽 기능성 말단의 활성을 증진시키기 위하여 링커 길이 및 조성물을 선택할 수도 있다 (예, 보조자극 폴리펩티드/항원, 감염성 인자 또는 결합 쌍 요소). 링커는 일반적으로 약 3 내지 약 15개 아미노산 길이이고, 더욱 바람직하게는 약 5 내지 약 10개 아미노산 길이이지만, 더욱 길거나 더욱 짧은 링커가 사용될 수도 있거나 링커가 완전히 필요없을 수도 있다. 이러한 측면에서, 단일 사슬 항체의 중쇄 및 경쇄를 연결하기 위해 사용되는 것과 같은 가요성 링커 (예, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>)가 사용될 수도 있다. 문헌 [Huston 등 (1988), Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85: 5879-5883; 미국 특허 5,091,513, 5,132,405, 4,956,778; 5,258,498 및 5,482,858 참조. 다른 링커들은 FENDAQPKS 또는 LQNDQAQPKS이다. 하나 이상의 도메인 및 면역 글로블린 Fc 영역 (예, CH1, CH2 및/또는 CH3)이 링커로서 사용될 수도 있다. 화학적 링커가 또한 사용될 수도 있다.

<160> 이들이 관련 핵산 또는 폴리펩티드의 활성을 보유하는 한, 변형되거나 변화되거나 변이되는 핵산 및 폴리펩티드가 본 발명에서 또한 유용하다. 예를 들어, 본 발명에서 사용하기 위해 적절한 핵산 및 폴리펩티드 서열은 관련 핵산 또는 폴리펩티드, 다시 말해서 공지된 면역 보조자극 폴리펩티드 또는 결합 쌍 요소를 코드화하는 핵산에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성 (적어도 80% 서열 동일성 포함)을 가질 수 있다. 일부 구현양태에서, 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 관련 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는다.

<161> 본 발명은, 이들이 동일한 아미노산을 코드화한다 (즉, 핵산 서열을 변형시킨다)는 점에서, "무증상(silent)"인 염기 변화를 가진 핵산을 포함한다. 본 발명은 또한 보존적 아미노산 치환을 가진 폴리펩티드를 코드화하는 핵산 및 이러한 폴리펩티드를 포함한다. 보존적 아미노산 치환 (예를 들어, 하나의 소수성 잔기를 상이한 소수성 잔기로 치환)하는 것이 당 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 점 돌연변이 등에 의해 실행될 수 있다. 주어진 변형된 서열, 변형체 또는 변이체의 적절성은 수용체 결합 및/또는 당 기술분야에 공지된 생물학적 선별 방법, 예컨대 단편에 관해 상기 언급된 방법을 사용하여 입증될 수 있다.

<162> 여기에서 사용된 바와 같이, "% 서열 동일성"은 정렬된 핵산 또는 폴리펩티드 서열에서 조화된 위치의 수를 결정하고, 조화된 위치의 수를 정렬된 뉴클레오티드 또는 아미노산의 총 수로 나누고, 100을 곱함으로써 계산된다. 조화된 위치란, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산이 정렬된 서열에서 동일한 위치에 발생하는 위치를 가리킨다. 정렬된 뉴클레오티드 또는 아미노산의 총 수는, 두 번째 서열을 정렬시키는데 필요하고 비-상동성 서열, 예컨대 주요 서열의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수도 있는 서열 (즉, 면역 보조자극 폴리펩티드 또는 결합 쌍 요소를 코드화하는 서열)과의 정렬 (예, 강제적 정렬)을 포함하지 않는 뉴클레오티드 또는 아미노산의 최소 수를 가리킨다. 정렬된 뉴클레오티드 또는 아미노산의 총 수는 전체 코드화 서열에 상응할 수도 있거나 또는 여기에 정의된 바와 같이 전체-길이 서열의 단편에 상응할 수도 있다.

<163> 월드 와이드 웹 상의 ncbi.nlm.nih.gov에서 입수가 가능한 BLAST (기본 국소 정렬 조사 도구) 프로그램으로 통합된 것과 같이, 문헌 [Altschul 등, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402]에 의해 기재된 알고리즘을 사용하여 서열이 정렬될 수 있다. Altschul 알고리즘을 사용하여 핵산 분자 ("조회 서열")과 다른 서열 또는 그의 일부 간의 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위하여 BLAST 조사 또는 정렬을 수행할 수 있다. 핵산 서열 간의 동일성을 정렬하고 비교하기 위해 BLASTN을 사용할 수 있는 반면, 아미노산 서열 간의 동일성을 정렬 및 비교하기 위해 BLASTP를 사용할 수 있다. 치료 폴리펩티드를 코드화하는 핵산 서열과 다른 서열 간의 퍼센트 동일성을 계산하기 위해 BLAST 프로그램을 사용할 때, gap 페널티를 위한 디폴트를 포함하여 각각의 프로그램의 디폴트 매개변수를 사용할 수 있다.

<164> 서던 또는 노던 블롯 분석 (즉, 하이브리드화), PCR 또는 원위치 하이브리드화 분석과 같은 방법에 의해 본 발명의 핵산을 검출할 수도 있다. 폴리펩티드는 전형적으로 형질감염된 세포 주에서 면역조직화학법에 의해, 또는 소듐 도데실 설페이트(SDS)-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 이어서 코마시에 블루-염색 또는 특정한 폴리펩티드에 대해 특이적 결합 친화성을 가진 항체 (단클론성 또는 다클론성)를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출된다. 이러한 방법들의 다수가 문헌 [Sambrook 등, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]에 상세히 언급되어 있다.



- <165> 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍 요소를 코드화하는 핵산 서열은 통상적인 분자 생물학 기술을 사용하여 구조물 내에서 상호간에 작동적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook 등, 2001, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 또는 Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel 등, 2002, 제5판, Current Protocols)] 참조. 이 방법들에서 사용하기 위해 적절한 구조물은 통상적으로 입수가가능하고 당 기술분야에서 일반적으로 사용된다. 구조물은 프로모터 서열, 조절 요소, 예컨대 인핸서 서열, 및 반응 요소 및/또는 핵산 서열의 발현을 조절하는 유도가능한 요소와 같은 발현을 위해 필요한 요소를 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 바와 같이 "작동적으로 연결된"은 (i) 핵산의 발현을 지시하거나 조절하는 방식으로 핵산 서열에 대해 프로모터 및/또는 기타 조절 요소(들)를 위치시키고; 및/또는 (ii) 면역 보조자극 폴리펩티드를 코드화하는 핵산 및 염기 쌍 요소를 코드화하는 핵산을 위치시켜, 코드화 서열이 "프레임 내"에 있도록 하고, 다시 말해서 구조물이 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍 요소를 포함하는 융합 단백질을 코드화하도록 하는 것을 가리킨다.
- <166> 구조물은 당 기술분야에 공지된 방법에 의하여 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생성하도록 증식되거나 발현될 수 있다. 여기에서 사용된 용어 "숙주" 또는 "숙주 세포"는 원핵, 예컨대 이.콜리뿐만 아니라 진핵, 예컨대 효모, 곤충, 식물 및 동물 세포를 포함하는 것을 의미한다. 동물 세포는 예를 들어 COS 세포 및 HeLa 세포를 포함한다. 숙주 세포는 당업자에게 일반적으로 공지된 기술, 예컨대 갈슘 포스페이트 또는 리튬 아세테이트 침전, 일렉트로포레이션, 리포펙션 및 입자 충돌과 같은 기술을 사용하여 DNA 분자 (예, 구조물)로 형질전환되거나 형질 감염될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이 벡터를 전파시키거나, 핵산 (예, DNA 또는 RNA)을 생성하거나, 면역 보조자극 폴리펩티드 또는 그의 단편을 발현하거나, 또는 융합 단백질을 발현하기 위한 목적에서 본 발명의 벡터를 함유하는 숙주 세포가 사용될 수도 있다.
- <167> 도 1A & 1B, 2A & 2B, 3A & 3B, 4A & 4B, 5A & 5B 및 7A & 7B는 코어 스트렙타비딘 및 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함한 면역 보조자극 잔기를 위해 코드화 서열, 및 상응하는 코드화된 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 & 15)을 포함하는 대표적인 핵산 서열 (SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 & 14)을 나타낸다.
- <168> **면역요법**
- <169> 본 발명의 한가지 구현양태는, (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체, 및 (b) (i) 첫 번째 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 두 번째 접합체를 그것을 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 첫 번째 항원 또는 감염성 인자에 대해 면역 반응을 발생하거나 증진시키는 방법을 제공한다. 대안적인 구현양태에서, 면역 세포를 첫 번째 및 두 번째 접합체로 처리한 다음 환자에게 투여한다. 상기 언급된 바와 같이, 면역 보조자극 폴리펩티드 및 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 (또는 감염성 인자 자체)가 사용될 수도 있고, 결합 쌍에서도 마찬가지일 것이다.
- <170> 본 발명은 주요 항원에 대한 접합과 함께 그리고 접합 없이 키메라 보조자극 분자의 사용을 포함한다.
- <171> 접합체가 환자에게 직접 투여되는 구현양태에서, 첫 번째 접합체 및 두 번째 접합체가 실질적으로 동시에 또는 상이한 시간에 투여될 수 있다. 하나의 구현양태에서, 접합체가 환자에게 투여되기 전에 결합 쌍 요소의 결합 활성을 통해 함께 결합된다. 예를 들어, 첫 번째 및 두 번째 접합체가 시험관내에서 조합될 수 있고 단일 조성물에서 투여될 수 있다. 다른 구현양태에서, 첫 번째 접합체가 먼저 투여된 다음, 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 세포에 결합되기에 충분한 시간 후에 두 번째 접합체를 투여한다. 예를 들어, 이 기간은 1시간 내지 수 시간, 1일 내지 수 일, 또는 1주일 또는 그 이상으로 변할 수도 있다.
- <172> 첫 번째 및 두 번째 접합체가 예컨대 정맥내, 비내, 복강내 또는 피하 주사에 의하여 전신적 또는 국소적으로 환자에게 투여될 수 있다. 하나의 구현양태에서, 하나 이상의 조성물(들)을 종양 부위에 직접 주사를 통해, 예컨대 종양내 주사에 의해 또는 국소 감염 부위에 주사를 통해 국소적으로 투여한다. 다른 구현양태에서, 하나 이상의 조성물을 상이한 경로에 의해 투여한다. 예를 들어, 하나 이상의 조성물을 국소적으로 투여할 수 있고 하나 이상을 전신적으로 투여할 수 있다.
- <173> 면역 세포를 치료하기 위하여 접합체를 사용하고 이것을 환자에게 직접적으로 투여하는 구현양태에서, 면역 세포를 실질적으로 동시에 또는 상이한 시간에 첫 번째 및 두 번째 접합체로 처리할 수 있다. 하나의 구현양태에서, 면역 세포를 처리하기 위해 사용되기 전에, 첫 번째 및 두 번째 접합체를 결합 쌍 요소의 결합 활성을 통해 함께 결합한다. 예를 들어, 첫 번째 및 두 번째 접합체가 단일 조성물에서 조합될 수 있고, 시험관내에서, 예컨대 면역 세포를 조성물 내에서 접촉시킴으로써 면역 세포를 처리하기 위해 사용될 수 있다. 다른 구현양태에

서, 면역 세포를 첫 번째 접합체로 처리한 다음, 기간 후에 두 번째 접합체로 처리한다. 예를 들어, 이 기간은 1 시간 내지 수 시간, 1 일 내지 수 일, 1 주일 또는 그 이상으로 변할 수도 있다. 전신 또는 국소 투여, 예컨대 종양내 주사 또는 국소 감염 부위로의 주사를 포함하는 상기 기재된 수단에 의하여 처리된 면역 세포를 환자에게 투여한다.

<174> 하나의 구현양태에 따르면, 방법은 세 번째 접합체를 투여하거나 면역 세포를 세 번째 접합체로 처리하는 것을 더욱 포함한다. 하나의 구현양태에서, 세 번째 접합체는 (i) 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함한 접합체 요소 및 (ii) 종양 또는 감염성 인자와 관련된 두 번째 항원 또는 감염성 인자 자체를 포함한 접합체 요소를 포함한다. 세 번째 접합체의 면역 보조자극 폴리펩티드는 첫 번째 접합체의 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이할 수도 있고; 두 번째 항원은 첫 번째 항원과 동일하거나 상이할 수도 있다. 이 구현양태의 특정한 측면에서, 면역 보조자극 폴리펩티드 및 두 번째 항원이 면역 보조자극 폴리펩티드 및 두 번째 항원의 각각과 연관된 결합 쌍 요소의 상호작용을 통해 함께 결합된다. 이 구현양태에 따르면, 세 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소가 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이할 수도 있다.

<175> 하나의 구현양태에서, 첫 번째 접합체는 구성적 수용체, 예컨대 CD80, LIGHT 및 CD40L에 결합하는 면역 보조자극 폴리펩티드이고, 세 번째 접합체는 유도성 수용체, 예컨대 4-1BBL 및 OX40L에 결합하는 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함한다.

<176> 표 7은 구성적 및 유도성 보조자극 분자의 목록을 제공한다.

**표 7**

<177>

구성적	유도성
CD80-CSA	CSA-4-1BBL
CSA-CD40L	CSA-OX40L
CSA-LIGHT	PD-L1-CSA
	GL-50-CSA

<178> 종양 세포 증식 및/또는 종양 크기에서의 감소를 결정함으로써 암 면역요법의 효능을 평가할 수 있다. 종양 세포의 수는 고정적이지 않고 세포 분열을 겪는 세포의 수 및 세포 사멸 (예, 세포고사)의 수를 반영한다. 종양 세포에 대한 개체의 면역 반응의 증가는 세포의 증식을 억제할 수도 있다. 여기에서 사용된 종양 세포의 증식이란 주어진 기간 (예, 시간, 일, 주 또는 달)에 걸쳐 종양 세포의 수의 증가 (시험관내 또는 생체내)를 가리킨다. 종양 세포의 증식 억제는 종양 세포 수의 증가 속도의 저하, 종양 세포의 완벽한 소실, 또는 이들 사이의 증식 저하에 의해 측정될 수 있다. 고휘 종양의 크기 저하는 종양 세포의 증식 억제를 암시한다.

<179> 본 발명은, 면역 보조자극 폴리펩티드 (예컨대 4-1BBL)와 그의 수용체와의 상호작용을 통해 TAA를 DC에 특이적으로 표적화하는 능력을 제공함으로써, 선행 기술 암 백신에 비해 장점을 제공한다. 또한, 본 발명은, 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있고 생체 내에서 DC에 의해 흡수되어, DC의 단리 및 생체의 조작 또는 유전자 요법의 사용을 필요로 하지 않으면서 항원 제시 및 활성화를 유도하는 백신을 제공한다.

<180> 환자의 감염 부담을 결정하고, 임상 종점, 예컨대 열 또는 팽윤을 평가함으로써 감염에 대한 면역요법의 효능을 평가할 수 있다.

<181> 본 발명 (또는 면역 보조자극 분자의 고급 구조를 제공하기 위한 기타 메카니즘)에 따른 아비딘/비오틴 결합 쌍의 사용은, 강한 반응을 위해 면역 보조자극 수용체의 가교를 가능하게 하고 다수의 항원 분자가 DC로 전달될 수 있도록 하는 사량체 구조 (또는 기타 다량체 구조)를 제공한다는 장점을 부여한다. 하나의 구현양태에서, 첫 번째 결합 쌍 요소, 즉 첫 번째 접합체의 결합 쌍 요소 (첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 포함)가 아비딘, 스트렙타비딘 또는 코어 스트렙타비딘이고, 두 번째 결합 쌍 요소, 즉 두 번째 접합체의 결합 쌍 요소 (첫 번째 항원 또는 감염성 인자 포함)가 비오틴이다. 다른 구현양태에서, 첫 번째 결합 쌍 요소는 비오틴이고 두 번째 결합 쌍 요소는 아비딘, 스트렙타비딘, 또는 코어 스트렙타비딘이다.

<182> 4-1BBL로의 DC의 자극이 면역 체계의 종양 회피에서 주된 역할을 하는 T<sub>reg</sub> 세포의 억제 기능을 무효로 하는 것으로 밝혀졌기 때문에, 면역 보조자극 폴리펩티드로서 4-1BBL의 사용은 추가의 장점을 제공할 수도 있다. 따라서, 4-1BBL 및 TAA를 포함하는 본 발명의 접합체는 효과적인 제시를 위하여 TAA를 DC로 전달하고, 다양한 사이

토카인의 동화를 위해 DC를 활성화하고, 종양 근절을 위해 Teff 및 NK 세포의 기능을 상승시키면서 T<sub>reg</sub> 세포의 기능을 무효화한다.

<183> **변형된 면역 세포**

<184> 본 발명은 상기 기재된 면역요법 방법에서 유용한 변형된 면역 세포 및 그의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 측면에 따르면, 첫 번째 종양 관련 항원을 발현하는 종양 또는 감염성 인자에 대해 면역 반응을 발생하거나 증진시키기 위해 면역 세포를 변형시키는 방법이 제공된다. 방법은, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 면역 세포를 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 첫 번째 접합체; 및 (b) (i) 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 두 번째 접합체와 접촉시키는 것을 포함한다. 본 방법에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드와 수용체 간의 결합을 통해 첫 번째 접합체를 면역 세포에 접합시키고, 첫 번째와 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체를 면역 세포에 접합시킨다.

<185> 임의의 수단에 의하여 면역 세포를 첫 번째 및 두 번째 접합체와 접촉시킬 수도 있고, 이것을 생체내 또는 시험관내에서 수행할 수도 있다. 예를 들어, 생체내 방법은 면역 세포를 포함하고 종양 또는 감염성 인자를 포함하거나 포함할 위험이 있는 환자에게 첫 번째 및 두 번째 접합체를 투여하는 것을 포함할 수도 있다. 본 방법에 따르면, 첫 번째 및 두 번째 접합체는 실질적으로 동시에 (동일하거나 별개의 조성물로) 또는 연속적으로 (별개의 조성물로) 투여될 수도 있다. 하나의 구현양태에서, 환자가 종양을 포함하는 경우에, 첫 번째 및 두 번째 접합체의 적어도 하나가 종양내 주사에 의해 투여된다.

<186> 일례의 시험관내 방법은, 면역 세포를 예컨대 첫 번째 및 두 번째 접합체를 포함하는 단일 조성물과 접촉시키거나, 또는 첫 번째 및 두 번째 접합체를 포함하는 첫 번째 및 두 번째 조성물과 각각 접촉시킴으로써 첫 번째 및 두 번째 접합체와 시험관내에서 접촉시키는 것을 포함한다. 접합체가 단일 조성물에 제공될 때, 이들은 조성물에서 제공된 바와 같이 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 함께 결합될 수도 있다.

<187> 상기 기재된 것을 포함하여 면역 보조자극 폴리펩티드, 항원 또는 감염성 인자 및 결합 쌍 요소가 본 발명의 측면에서 사용될 수 있다.

<188> 본 방법에 따르면 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 면역 세포가 변형될 수 있다. 하나의 구현양태에서, 면역 세포는 T 세포 또는 호중구이다. 일례의 T 세포는 CD4+ 세포, CD8+ 세포, 천연 킬러 세포, 단핵구 및 수지상 세포를 포함한다.

<189> 본 발명의 측면의 추가의 구현양태에서, 면역 세포는 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 포함하고, 방법은 면역 세포를 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 첫 번째 접합체 요소 및 (ii) 종양 또는 감염성 인자와 연관된 항원 (또는 감염성 인자 자체)을 포함하는 두 번째 접합체 요소를 포함하는 세 번째 접합체와 접촉시키는 것을 더욱 포함한다. 이러한 구현양태에서, 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이할 수도 있고, 존재한다면 두 번째 항원은 첫 번째 항원과 동일하거나 상이할 수도 있다. 다른 특정한 구현양태에서, 첫 번째 및 두 번째 접합체 요소는 각각 결합 쌍의 첫 번째 및 두 번째 요소를 더욱 포함한다. 이러한 구현양태에 따르면, 세 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소는 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하다. 추가로, 첫 번째 접합체 요소가 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체 요소에 결합될 수도 있다.

<190> 상기 언급된 첫 번째 및 두 번째 접합체에서와 같이, 세 번째 접합체는 여기에 기재된 것을 포함하여 면역 보조자극 폴리펩티드, 항원 또는 감염성 인자 및 결합 쌍 요소를 포함할 수도 있다.

<191> 관련된 측면에서, 본 발명은 이 방법에 의해 만들어진 면역 세포의 집단을 제공한다. 이러한 면역 세포는 다른 면역 세포와 접촉될 때 종양에 대해 면역 반응을 발생하거나 증진시킨다.

<192> 또한, 본 발명은, 변형된 면역 세포를 (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함한 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함한 접합체 요소를 포함하는 첫 번째 접합체; 및 (b) (i) 첫 번째 항원 또는 감염성 인자를 포함한 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함한 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체로 변형시키는, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포를 제공한다. 본 구현양태에 따르면, 면역 보조자극 폴리펩티드와 수용체 간의 결합을 통해 첫 번째 접합체를 면역 세포



에 접합시키고, 첫 번째와 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체를 면역 세포에 접합시킨다.

- <193> 상기 기재된 방법에서와 같이, 상기 기재된 것을 포함하여 본 발명의 측면에서 면역 보조자극 폴리펩티드, 항원 또는 감염성 인자, 및 결합 쌍 요소들을 사용할 수 있다.
- <194> 또한, 본 방법에 따르면, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 면역 세포를 변형시킬 수 있다. 하나의 구현양태에서, 면역 세포는 T 세포 또는 호중구이다. 일례의 T 세포는 CD4+ 세포, CD8+ 세포, 천연 킬러 세포, 단핵구 및 수지상 세포를 포함한다.
- <195> **면역자극 잔기**
- <196> 본 발명은 면역자극 활성을 가진 면역자극 잔기를 제공한다. 단독으로 투여될 때, 또는 항원 또는 다른 면역자극 인자의 투여와 함께 아주반트로서 사용될 때, 면역자극 잔기가 유용하다. 예를 들어, 면역자극 잔기가 백신, 암 면역요법 및 면역-기초 질환의 치료에서 유용하다. 면역자극 잔기는 동물에게 투여하기 위해 적절한 조성물에서 제형될 수 있고 면역자극이 필요한 동물, 예컨대 백신, 암 면역요법을 받거나 면역-기초 질환을 위한 치료를 받고 있는 동물에게 투여될 수 있다.
- <197> 하나의 구현양태에 따르면, 면역자극 잔기는 상기 기재된 면역 보조자극 폴리펩티드의 어느 것, 예컨대 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L을 포함한다. 다른 구현양태에서, 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, ICOSL, PD-L1, PD-L2, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF 및 APRIL로 구성된 군에서 선택된다. 또 다른 구현양태에서, 면역 보조자극 폴리펩티드는 4-1BBL이다.
- <198> 이 구현양태의 한 가지 특정한 측면에 따르면, 면역자극 잔기는 스트렙타비딘 또는 코어 스트렙타비딘을 더욱 포함한다. 예를 들어, 면역자극 잔기는 면역자극 폴리펩티드 및 코어 스트렙타비딘을 포함하는 접합체 또는 융합 단백질일 수도 있다.
- <199> 다른 구현양태에서, 면역자극 잔기는 면역 보조자극 폴리펩티드 및 스트렙타비딘 또는 코어 스트렙타비딘으로 필수적으로 구성된다. 본 구현양태에 따르면, 면역자극 잔기는 다른 면역 보조자극 폴리펩티드 또는 항원과 같은 다른 면역자극 인자를 포함하지 않고, 이것에 접합되거나 달리 결합되지 않는다.
- <200> 본 발명은 면역 자극이 필요한 환자에게 면역자극 잔기를 투여하는 것을 포함하는 면역자극 방법을 포함한다. 본 방법의 하나의 구현양태에서, 면역자극 잔기는 면역 보조자극 폴리펩티드 및 스트렙타비딘 또는 코어 스트렙타비딘을 포함한다. 다른 구현양태에서, 면역자극 잔기는 필수적으로 면역 보조자극 폴리펩티드 및 스트렙타비딘 또는 코어 스트렙타비딘으로 구성된다. 추가의 구현양태에서, 방법은 항원을 환자에게 면역자극 잔기의 투여와 동시에 또는 연속적으로 (이전 또는 이후) 투여하는 것을 더욱 포함한다. 동시 투여의 일부 구현양태에서, 면역자극 잔기 및 항원을 단일 조성물, 예컨대 면역자극 잔기 및 항원을 포함하는 혼합물에 투여한다. 동시 투여의 다른 구현양태에서, 면역자극 잔기 및 항원을 별개의 조성물로 투여한다. 일부 구현양태에서, 항원을 상기 기재된 항원-함유 접합체, 예컨대 항원 및 결합 쌍의 요소를 포함한 접합체로서 투여한다. 다른 구현양태에서, 항원은 결합 쌍의 요소를 포함한 접합체로서 투여되지 않는다.
- <201> 면역자극 방법의 다른 구현양태는, 면역 보조자극 폴리펩티드 및 스트렙타비딘 또는 코어 스트렙타비딘으로 필수적으로 구성된 면역자극 잔기를 투여하는 것으로 필수적으로 구성된다. 본 구현양태에 따르면, 면역자극 잔기에 접합되거나 달리 결합되는 다른 면역자극 인자, 예컨대 다른 면역 보조자극 폴리펩티드 또는 항원을 투여하지 않는다. 따라서, 예를 들어, 비오틴닐화 분자, 예컨대 비오틴닐화 세포 또는 비오틴을 포함한 단백질 접합체를 투여하지 않는다.
- <202> 어떠한 이론에 의해 구속되기를 원하지 않지만, 본 발명의 면역자극 잔기는 세포 표면 면역 수용체와 그들의 리간드 간의 상호작용을 자극하고, 이에 의해 체액 및 세포 면역 반응을 촉진하는 것으로 생각된다. 스트렙타비딘 (또는 코어 스트렙타비딘)을 포함하는 면역자극 잔기는, 사이토카인, 케모카인의 생성 및 면역자극 분자의 상향조절을 위하여 수용체를 효과적으로 끌어들이고 B 세포, 단핵구 및 수지상 세포를 자극하는 안정한 사랑체 및 올리고머를 형성한다.
- <203> 하기 실시예는 본 발명을 더욱 상세히 예증하고 어느 측면에서도 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

**실시예**

- <204> **실험 방법**
- <205> **동물.** 성체 동종번식 BALB/c (H-2<sup>d</sup>) 및 C57BL/6 생쥐를 잭슨 래보러토리즈 (Jackson Laboratories) (미국 메인 주 바 하버)로부터 구입하였다. TCR 형질전환 OT-I, D011.10, C57BL/6.SJL 동물을 타코닉스(Taconics) (미국 뉴욕주 저만타운)으로부터 구입하고 NIH 지침 하에 유지시켰다.
- <206> **OVA를 발현하는 A20 세포의 확립.** 유니버시티 오브 루이지애나의 탐 미첼 박사로부터 OVA 구축물을 수득하고, 이것을 BglII 및 EcoRI으로 제한된 pcDNA3 벡터 (미국 캘리포니아주 샌디에고 인비트로젠) 내에 직접적으로 클론화하였다. 암피실린 배지 위에서 세균 형질전환 및 선택 후에, 몇몇 클론들을 미니 플라스미드로 제조하고 포지티브 클론을 동정하기 위하여 BglI/EcoRI으로 소화시켰다. 제조업자의 지시에 따라 리포펙타민™ 2000 (인비트로젠) 키트를 사용하여 큰 플라스미드 제조 및 A20 세포 내로의 형질감염을 위하여 삽입물을 함유한 클론을 사용하였다. G418 (제네티신)을 함유하는 배지에서 세포를 선택하고, OVA 또는 T 세포 증식 분석에 대해 웨스턴 블롯 및 항체를 사용하여 OVA의 발현을 결정한다.
- <207> **TC-1 이식가능한 자궁경부 암 모델의 확립.** C57BL/6 생쥐에서 TC-1 종양 모델을 확립하였다. 1차 C57BL/6 생쥐 폐 상피세포를 HPV-16 E6 및 E7 및 활성화된 ras 종양유전자로 동시형질전환함으로써 종양발생 TC-1 세포 주가 유래되고, 인간 자궁경부 암종을 위한 모델로서 특징화되었다. TC-1 세포는 동계 C57BL/6 생쥐에서 종양을 형성한다. 모델을 확립하기 위하여,  $1 \times 10^5$  종양 세포를 C57BL/6 생쥐의 오른쪽 옆구리에 이식하고 종양 성장에 대해 동물을 검사하였다.
- <208> **곤충 DES 발현 체계를 사용하는 재조합체 4-1BBL의 발현 및 정제.** 문헌 [Singh 등, 2003, Cancer Res. 63: 4067-73]에 기재된 바와 같이, 드로스필라 DES 발현 체계 (미국 캘리포니아주 칼스배드 인비트로젠)을 사용하여 4-1BBL을 발현하는 안정한 형질감염체를 확립하였다. 25 °C 및 105 rpm으로 설정된 배양기 진탕기에서 72시간 동안 1mM 황산구리로 보충된 드로스필라 무-혈청 배지 (미국 캘리포니아주 칼스배드 기브코)에서 재조합체 단백질 발현을 위해 형질감염체를 유도한다. 배양 상층액을 원심분리에 의해 수집하고, 단백질 내로 처리된 6x-His-표지의 장점을 취하여, 코발트(II)-카르복시메틸아스파르테이트 가교된 아가로스 고정화 금속 친화성 수지 (BD-탈론, BD 바이오사이언스) 또는 Ni-NTA 금속 친화성 수지 (퀴아젠)을 사용하여 큰 규모 정제로 처리한다.
- <209> **간략하게, 4-1BBL을 함유하는 배양 배지를 95% 에탄올의 적가에 의해 침전시켜 10% 에탄올의 최종 농도를 생성한다.** 4 °C에서 밤새 배양 후에 침전된 4-1BBL을 결합 완충액 (50mM 인산나트륨 pH 7.0; 500mM 염화나트륨; 0.5% 트윈-20; 1% 글리세롤; 5mM 2-메르캅토에탄올)의 출발 부피의 1/10에 재용해시킨다. 결합 완충액의 5X 겔 층 부피를 사용하여 금속 친화성 수지를 평형화하고, 4-1BBL을 함유하는 재용해된 단백질 용액에 첨가하고, 실온에서 45 분 동안 엔드-오버-엔드 회전으로 배양시킨다. 4-1BBL 결합된 금속 친화성 수지를 50 내지 100 ml의 세척 완충액 (50mM 인산나트륨 pH 7.0; 500 mM 염화나트륨)으로 2회 세척한다. 결합된 4-1BBL을 용출 완충액 (50mM 인산나트륨 pH 7.0; 500mM 염화나트륨 150 mM 이미다졸)의 2X 겔 층 부피로 금속 친화성 수지로부터 용출한다.
- <210> **정제된 4-1BBL 용출물을 모으고, 30kD 분자량 절단 막을 가진 아미콘 울트라™ (밀리포어, 미국 메사추세츠주 베드포드) 원심분리 필터 장치 내에 부하한다.** 원심분리 필터 장치를 3000 rpm (2000 × g)에서 4 °C에서 15분 동안 원심분리한다. 무균 PBS를 보유액에 첨가하고, 필터를 3000 rpm (2000 × g)에서 다시 원심분리한다. 농축/탈염 4-1BBL을 함유하는 보유액을 원심분리 필터 장치로부터 흡출하고, 무균 크리오바이알에 넣고, 액체 질소에 보관한다. 단리된 단백질의 순도를 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 평가한다. 제조업자의 지시에 따라서 BCA 단백질 분석 (피어스)을 사용하여 단백질 농도를 결정한다.
- <211> **비오틴화 OVA의 발현 및 정제.** N-말단뿐만 아니라 C-말단 AviTag-단백질 융합을 발현하기 위하여 아비디티 인코포레이티드(Avidity, Inc) (미국 코넥티컷주 덴버)로부터의 pAN 및 pAC 벡터로 상기 기재된 OVA 구축물을 서브클론화한다. 암피실린 배지에서 세균 형질전환 및 선택 후에, 몇몇 클론들을 미니 플라스미드로 제조하고 적절한 제한 효소로 소화시켜 포지티브 클론을 동정한다. 큰 플라스미드 제조를 위하여 삽입물을 가진 클론을 사용한다. 염색체 내로 안정하게 통합된 birA 리가제 유전자를 가진 균주인 AVB100 이.콜리를 형질전환하기 위하여 플라스미드를 사용한다. 비오틴 표지를 가진 OVA의 높은 수준의 발현을 위하여 L-아라비노스로 단백질 발현을 유도한다. AviTag 항체 아가로스를 사용하여 발현된 단백질을 정제한다. 웨스턴 블롯 및 프로브를 위해 알칼리 포스포타제 접합된 스트렙타비딘을 사용하여 농도, 내독소 수준 및 비오틴닐화에 대해 정제된 OVA를 평가한다. 필요하다면, 데톡시-겔 내독소 제거 키트(피어스)를 사용하여 내독소를 제거한다. 비오틴닐화 OVA를

CSA-4-1BBL 융합 단백질과 접합시키고 이하 언급된 바와 같이 OT-1 TCR 형질전환 세포를 사용하여 생체내 증식 분석에서 시험한다. 단백질을 등분하고 사용할 때까지 -70 °C에서 동결시킨다.

- <212> 증식 분석. 생체내 증식 분석을 위하여, OT-1 (OVA<sub>257-264</sub>/K<sup>b</sup>) TCR 형질전환 동물로부터 비장 및 림프절 세포를 모은다. 세포를 5 μM CFSE (카복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜에스테르)로 표지화하고, 꼬리정맥 주사에 의해 1 백만 개 CFSE-표지화 세포를 CD45.1<sup>+</sup> 동종 B6-SJL 생쥐 내로 옮긴다. 24시간 후에, 동물을 10 μg OVA 단독으로, 또는 CSA 또는 CSA-4-1BBL와 혼합되거나 이들에 접합된 OVA로 공격한다. 비장 및 림프절 세포를 3일 후에 수집하고, 림프 게이트에서 CD8<sup>+</sup> CD45.1<sup>-</sup> (OT-1) 세포 집단에서 CFSE 회색의 분석에 의해 증식을 결정한다. 분석을 위해 모 집단을 결정하기 위하여, OVA 단백질을 받지 않은 일부 동물로부터 수집된 세포를 사용한다.
- <213> 시험관내 증식 분석을 다음과 같이 수행한다: BALB/c 생쥐로부터의 CFSE-표지화 DO 11.10 (OVA<sub>323-339</sub>/I-A<sup>d</sup>) TCR 형질전환 세포를, 3일 동안 다양한 비율로 OVA를 발현하는 방사선조사된 A20 형질감염체에 대한 반응체로서 사용한다. 배양물을 수집하고 증식을 위해 유세포 분석법으로 분석한다.
- <214> **유세포 분석법.** 주요 1차 및 2차 항체를 먼저 적절한 다음 표준 절차를 사용하여 유세포 분석법에서 최적 농도를 사용하여 유세포 분석법을 수행한다. 예를 들어 문헌 [Mhoyan 등, 1997, Transplantation 64: 1665-70] 참조. 동종형-조화 항체가 네가티브 대조로서 사용된다. 샘플을 FACS 캘리버 또는 벤티지 (미국 캘리포니아주 마운틴뷰 벡톤 디킨슨) 위로 주행시키고, 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 (트리소프트)를 사용하여 분석을 수행한다.
- <215> **면역요법.** 다음과 같이 예방접종을 수행한다. 간략하게, CSA-4-1 BBL 융합 단백질을 다양한 물비로 PBS 중에서 비오틴닐화 OVA와 혼합한 다음, 예비-예방접종을 위해 BALB/c 생쥐 내에, 또는 면역요법을 위해 치사량의 생존 A20 (1×10<sup>6</sup>) 세포로 옆구리에서 피하 접종된 동물 내에 복강내 주사한다. 대조는 예방접종되지 않은 동물 또는 대조 단백질로 예방접종된 동물을 포함한다. 일단 검출되면, 캘리퍼를 사용하여 종양을 격일로 측정하고, 종양 크기를 가장 긴 직경의 평균 및 수직 직경 ± 표준 오차로서 기록한다. 불쾌함을 피하기 위하여, 종양 크기가 대략 20 mm 직경에 이르러 때 동물을 안락사시킨다.
- <216> **통계.** 카플란-메이어 곡선을 사용하여 종양 생존에 대한 치료 효과를 판단한다. 로그-랭크 시험 (일반화 새비지/멘틀 콕스(Savage/Mantel Cox))을 사용하여 상이한 군 간의 생존 차이를 평가한다. 개별 동물의 군으로부터의 데이터 비교와 관련된 절차는 F 시험 (2개 군) 또는 레빈(Levene) 시험 (다중 군)을 사용하여 검사된 변동의 동일성을 가질 것이다. 백신이 동일하지 않을 때, 로그 변환이 수행된다. 정상적으로 분포된 샘플 평균을 비교하고자 할 때, 학생의 시험 (2개 군) 또는 뉴만-케울스(Newman-Keuls) 시험 (다중 군)이 사용된다. 데이터가 정상적으로 분포되지 않을 때, 만-위트니(Mann-Whitney) U 시험 (2개 군) 또는 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 시험 (다중 군)이 사용된다. 통계적 유의치는 P<0.05로서 정의된다.
- <217> **실시예 1: CSA-4-1BBL은 동종항원-유발 반응을 증대시킨다.**
- <218> 상기 언급된 바와 같이, 4-1BBL은 적응성 및 선천적 면역 반응의 조절에서 중요한 역할을 한다. 4-1BBL은 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포, NK 세포 및 DC의 활성화를 위한 보조자극 분자로서 작용하고, T<sub>reg</sub> 세포의 억제 기능을 억제한다. 따라서, 이러한 분자는 암 요법을 위해 효과적인 종양 반응의 발생을 위해 특이적인 아주반트로서 역할을 할 수 있다.
- <219> CSA-4-1BBL 융합 단백질은 코어 스트랩타비딘 잔기의 존재에 기인한 사랑체/올리고머 구조를 형성하고 가용성 분자이다. 다음과 같이 동종 혼합 림프구 반응 (MLR)을 사용하여 T 세포 반응에 대한 CSA-4-1BBL의 면역자극 활성을 증명하였다.
- <220> CSA-4-1BBL의 존재 또는 부재 하에서 BALB/c 방사선조사된 비장세포에 대한 반응체로서 C57BL/6 생쥐 림프절 세포를 사용하였다. 배양물을 마지막 18시간의 배양 기간 동안 [<sup>3</sup>H] 티미딘으로 표지화하고, 증식을 평가하였다. CSA-4-1BBL로 보충된 배양물은 대조에 비하여 강력한 증식 활성을 나타내었다 (도 8).
- <221> **실시예 2. CSA-4-1BBL은 T 세포 증식을 증진시킨다.**

- <222> 4-1BB에 대한 단클론성 항체에 대해 4-1-BBL 융합 단백질의 상대 활성을 평가하기 위하여, 증식 분석에서 다양한 양의 4-1BBL 융합 단백질 및 항체의 존재 하에서, 유세포 분석법에 의해 분류된 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 항-CD3 항체의 준최적 농도로 다클론성으로 자극시켰다. 융합 단백질은 항체에 비해 T 세포의 증식에서 70배 더 많은 활성을 가졌다 (도 9).
- <223> 이러한 항체 Ab는 암 면역요법의 동물 모델에서 강력한 활성을 갖는 것으로 밝혀졌기 때문에 (예를 들어 문헌 [Melero 등, 1998, Cell Immunol. 190: 167-72; Melero 등, 1997, Nat.Med. 3: 682-85] 참조), 이러한 데이터는 CSA-4-1BBL 융합 단백질이 아주반트로서 및 DC에 TAA를 전달하는 부형제로서 암 백신의 유용한 성분임을 나타낸다.
- <224> **실시예 3: CD8<sup>+</sup> T 세포에 미치는 비오틴화 OVA/CSA-4-1-BBL 접합체의 효과**
- <225> 통상적으로 입수가 가능한 키트 (피어스 바이오테크놀로지, 미국 일리노이주 록포드)를 사용하여 난알부민 펩티드 (OVA)를 비오틴화하였다. 비오틴화 OVA를 시험관내에서 다양한 비율로 접합을 위해 CSA-4-1BBL 융합 단백질과 예비혼합하고, 백만 개의 OT-1 T 세포로 적절히 전달된 비감작 C57BL/6.SJL 동물 내에 복강내 주사하였다. 구체적으로, 백만 개의 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포를 CFSE로 표지화하고, 비오틴화 난알부민 (10 µg/주사) ("OVA") 및 비오틴화 OVA와 혼합된 CSA-4-1BBL (1 µg/주사)("41BBL+OVA") 또는 접합된 OVA-비오틴/CSA-4-1BBL ("41BBL-OVA")로 면역화된 6.SJL 생쥐 내로 전달하였다. (도 10). 도 10의 마지막 패널 ("41BBL-OVA\*")는 10 µg 비오틴화 OVA에 접합된 5 µg의 CSA-4-1BBL에 대한 반응을 나타낸다. 대조를 위해, CSA-4-1BBL과 등물 수준에서 코어 스트렙타비딘 ("SA")을 사용하였다.
- <226> 도 10에 나타낸 바와 같이, 4-1BBL/OVA 접합체는 대조 "SA/OVA" 접합체 (33.6%) 또는 비접합된 단일 단백질 "41BBL+OVA" (35.5%)에 비하여 OT-1 세포에서 강력한 (73.5%) 증식 반응을 발생하였다. 5 µg 용량의 CSA-4-1BBL이 1 µg 용량 (73.5%)에 비해 훨씬 더 양호한 반응 (94.5%)을 발생하기 때문에 증식 반응은 용량-의존적이다.
- <227> 이 실시예는 CSA-4-1BBL 융합 단백질이 항원-특이성 CD8<sup>+</sup> T 세포의 증식 반응을 증가시킴을 보여주고, 이것은 4-1BBL-CSA/비오틴화 항원 구축물이 전문적 APC에 항원을 성공적으로 전달하고 효과적인 면역 반응의 발생을 위해 이러한 세포들을 활성화시킬 수 있음을 나타낸다.
- <228> **실시예 4: CSA-4-1BBL은 DC에 항원을 전달한다.**
- <229> 이 실시예는 CSA-41BBL이 항원을 DC에 효과적으로 전달함을 증명한다. 비오틴화 PE는 형광 항원으로서 사용되었다. 비오틴화 PE (250 ng)을 얼음 위에서 30 분 동안 250 ng CSA-41BBL과 접합시켰다. 조(Jaws) II 수지상 세포 (5×10<sup>5</sup>/웰)을 비오틴화 PE (250 ng/ml) 또는 비오틴화 PE/CSA-41BBL 접합체와 16시간 동안 배양하였다. 유세포 분석법을 사용하여 PE의 수준을 검출하였다. 도 11A는 PE+ 세포를 보여주는 히스토그램이다. 회색으로 채워진 부분은 비처리 세포를 나타내고, 검은색 점선은 비오틴화 PE로 처리된 세포를 나타내고, 검은색 선은 비오틴화 PE/CSA-41BBL 접합체로 처리된 세포를 나타낸다. 도 11B는 각각의 처리에 대해 PE의 평균 형광 강도(MFI)를 나타내고, 접합체-처리된 세포가 상당히 큰 반응을 나타냄을 증명한다.
- <230> **실시예 5: CSA-4-1BBL은 DC를 활성화시킨다**
- <231> 이 실시예는 4-1BBL이 수지상 세포를 활성화시킴을 증명한다. 조 II 수지상 세포 (5×10<sup>5</sup>/웰)을 처리하지 않거나 또는 24-웰 플레이트에서 5 ng/ml GM-CSF의 존재하에서 48 시간 동안 5 µg/ml CSA-41BBL 접합체 또는 5 µg/ml 지방다당류 (LPS)로 처리하였다. 도 12A에 나타낸 바와 같이 유세포 분석법을 사용하여 CD86 및 MHC 부류 II 수준을 분석하였다. 밝은 회색으로 채워진 부분은 동종형 처리된 세포를 나타내고, 어두운 회색으로 채워진 부분은 비처리 세포를 나타내고, 검은색 선은 CSA-4-1BBL 처리된 세포를 나타내고, 점선은 LPS 처리된 세포를 나타낸다. 도 12B는 CD86 및 MHC 부류 II의 평균 형광 강도(MFI)를 나타내고, CSA-4-1BBL 처리된 세포가 상당히 큰 반응을 나타내었음을 증명한다.
- <232> **실시예 6: CSA-4-1BBL은 항원을 DC로 전달하고 생체내에서 DC를 활성화시킨다.**
- <233> 이 실시예는, CSA-4-1BBL이 비오틴화 항원을 수지상 세포에 전달하고 이러한 세포를 생체내에서 활성화시킴을 증명한다. 비오틴화 OVA를 CSA-41BBL과 접촉시켜 비오틴화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체를 수득한다. 이러한 접합체 또는 비오틴화 OVA/CSA 접합체를 24시간 후에 비감작 C57BL/6 생쥐 내에 정맥 주사하고, 동물을 안락



사시키고 비장 세포를 수집하였다. CD11c+ 세포 집단에서 유세포 분석법을 사용하여 수지상 세포 활성화를 분석하였다. 도 13에 나타난 바와 같이 비감작 비오틴화 OVA-SA 처리된 동물 및 비오틴화 OVA/CSA-41-BBL 처리된 동물로부터의 수지상 세포 상에서 CD40, CD86 및 MHC 부류 II 발현의 평균 형광 강도(MFI)를 결정하였다. 이 도면은 비오틴화 OVA/CSA-41-BBL 처리된 동물이 상당히 높은 반응을 나타내었음을 증명한다.

<234> **실시예 7: CSA-4-1BBL은 Treg 세포의 억제 기능을 증화한다.**

<235> 상기 언급된 바와 같이, 천연 발생 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg 세포는 4-1BB 수용체를 구성적으로 발현하고, 그 자체로서 4-1BB 자극에 반응한다. 하기 실시예는 Treg 세포에서 4-1BB 융합 단백질의 자극 활성을 증명한다.

<236> 유세포 분류를 사용하여 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Teff 세포 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 세포를 분리하고, 방사선조사된 선천성 세포 및 항-CD3 항체의 존재 하에서 1:1 비율로 배양하였다. 공동-배양 실험에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>(DP) 대 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>(SP) T 세포의 증식을 구별하기 위하여, 카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜에스테르 (CFSE, 분자 프로브, OR)로 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포를 염색하고 억제 분석에서 사용하였다. 간략하게, 세포를 PBS로 세척하고, 4ml의 2.5 μM CFSE/1×10<sup>6</sup> 세포 (소량의 세포를 표지화할 때 비율을 유지하였다)에서 실온에서 7분 동안 배양하였다. 2 개 부피의 소 태아 혈청 중에서 1 분 동안 세포를 배양하고, PBS로 2회 세척하여 모든 과량의 CFSE를 제거하였다. 유세포 분석법을 사용하여 증식을 평가하였다.

<237> Treg 세포는 무력성이기 때문에 항-CD3 자극에 반응하지 않지만, 4-1BB에 대한 반응에서 적절한 증식을 나타내었다 (도 15). Treg 세포는 Teff 세포의 증식 반응을 억제하고, 그의 효과는 4-1BB의 첨가에 의해 반전될 수 있다. 이것은 비감작 Treg 세포를 사용한 데이터와 일치하고, 이 경우에 확장된 세포의 억제 효과가 CSA-4-1BBL의 존재에 의해 증화되었다 (하기 참조).

<238> 이러한 데이터는 4-1BB의 면역조절 효과 및 암 면역요법을 위한 그의 용도를 입증하였다. 예를 들어, 4-1BB 융합 단백질은 더욱 강한 항-종양 면역 반응을 위해 Treg 세포의 억제 기능을 하향조절하면서 Teff 기능을 상승시킨다.

<239> **실시예 8: 4-1BBL의 이중 역할**

<240> Treg 기능의 조절에서 4-1BB/4-1BBL-매개 시그널 전달의 역할이, 반대되는 연구결과를 가진 최근 2개의 연구의 주제가 되었다. 하나의 연구는 4-1BB 시그널전달이 Treg 세포의 억제 기능을 증화시킴을 증명하는 반면 [Choi 등, 2004, J.Leukoc.Biol. 75: 785-91], 다른 연구는 4-1BB 시그널전달이 억제 기능에 대한 주된 효과없이 Treg 증식을 매개한다고 보고하였다 [Zheng 등, 2004, J.Immunol. 173: 2428-34]. 이러한 불일치를 명백히 하기 위하여, CSA-4-1BBL 융합 단백질을 사용하여 Treg 기능에서 4-1BB 시그널전달의 역할을 조사하였다.

<241> 비감작 BALB/c 생쥐의 비장 및 말초 림프 절로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (단일 포지티브; SP) 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (이중 포지티브; DP) T 세포를 분류하고, 3일 동안 단독으로 또는 1:1 비율로 배양하였다. 배양물을 방사선조사된 비장세포, 항-CD3 항체 (0.5 μg/ml) 및 도 14A에 나타난 농도 (μg/ml)의 4-1BBL 또는 등물량의 대조 CSA 단백질로 보충하였다. 유세포 분류를 사용하여 비감작 BALB/c 생쥐로부터 정제된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 이중 포지티브 (DP) T 세포는, 공동-배양 실험에서 CD3에 대한 항체에 의해 유도되는 단일 포지티브 (SP) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff 세포의 증식 반응을 현저하게 억제하였다. 이러한 억제 효과는 1 μg/ml CSA-4-1BBL로 배양물을 보충함으로써 효과적 및 특이적으로 반전되었으나, 등물 수준으로 사용된 대조 CSA는 그렇지 않았다.

<242> CSA-4-1BBL 융합 단백질에 의한 억제의 관찰된 반전이 SP 세포의 증식 반응의 회복에 기인하는지의 여부를 시험하기 위하여, SP 세포를 CFSE로 표지화하고 CSA-4-1BBL (0.5 μg/ml) 또는 대조 단백질로서의 CSA의 존재 하에서 공동-배양물 실험에서 사용하였다. CSA-4-1BBL은 대조에 대해 44% 및 CSA 단백질에 대해 46%로부터 60%까지 SP 세포의 증식을 증가시켰다. DP 세포는 SP T 세포의 증식을 현저히 감소시켰으며 (16%), 이것은 4-1BBL에 의해 현저히 회복되지만 (34%), CSA 대조 단백질에 의해 회복되지 않는다 (17%) (도 14B). 이러한 데이터는 4-1BBL 융합 단백질이 Treg 세포의 억제 기능을 하향-조절한다는 것을 증명한다.

<243> 따라서, 본 연구는 CSA-4-1 BBL 융합 단백질이 Treg 세포에 대한 2개의 반대되는 활성을 명백히 한다는 것을 보여준다. 한편으로, 이것은 Treg 세포 확장을 촉진하기 위하여 항-CD3 항체 및 IL-2과 함께 상승 작용한다. 다른 한편, 이것은 비감작 및 활성화된 Treg 세포의 억제 기능을 차단하지만, 배양 배지로부터의 제거가 억제 기

능의 회복을 가져오기 때문에 Treg 세포를 4-1BBL 융합 단백질과 접촉시킬 때만이다.

<244> 4-1BBL의 이러한 후자의 효과는 면역 회피 메카니즘으로서 Treg 세포를 사용하는 종양 및 감염에서 어느 정도의 의미를 가질 수도 있다.

<245> **실시예 9: 암 백신으로서 항체-4-1BBL 접합체의 용도**

<246> **(a) 가용성 단백질로서 OVA를 발현하는 A20 형질감염체의 생성**

<247> 제조업자 (인비트로젠) 프로토콜에 따라서 리포펙타민™ 2000 키트를 사용하여 상기 기재된 OVA 구축물을 A20 세포 내로 형질감염시킨다. 안정한 형질감염체를 G418 선택 배지에서 선택하고, 단일 세포 수준에서 클론화하고, 웨스턴 블롯을 사용하여 OVA의 발현에 대해 시험하였다. 상당한 수준의 OVA 발현을 가진 클론은, 상기 도 10을 참조로 하여 기재된 CFSE 증식 분석에서 OVA 펩티드에 대해 특이적인 DO11.10 CD4<sup>+</sup> T 세포에 대한 자극인자로서 작용한다. OVA 발현에 대해 포지티브인 것으로 일단 입증되면, 백만 개의 생 A20 세포를 BALB/c 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사한다. 격일마다 종양 발생 및 생존에 대해 동물을 검사하고, 종양이 20mm 직경의 크기에 이르러 때 안락사시킨다. 모 A20 세포로 접종된 동물이 종양 성장에 대한 대조로서 사용될 것이다. OVA를 발현하는 A20 세포 형질전환체는 상승작용 BALB/c 생쥐 내로 주입될 때 종양을 형성할 것이다.

<248> **(b) 곤충 DES 체계를 사용한 CSA-4-1BBL 융합 단백질의 생성**

<249> DES 발현 체계 (인비트로젠) 및 본 발명자의 확립된 프로토콜을 사용하여 CSA-4-1BBL 단백질을 만들었다. 예를 들어 [Singh 등, 2003, Cancer Res. 63: 4067-73]; [Yolcu 등, 2002, Immunity 17: 795-808] 참조. CSA-4-1BBL 융합 단백질 내로 조작된 6XHis 표지의 장점을 가진 고정화된 금속 기초 친화성 크로마토그래피를 사용하여 융합 단백질을 정제하였다. 단백질을 탈염시키고 한외여과에 의해 농축하고 정제를 위해 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 비신코닌산 (BCA) 분석 (피어스)를 사용하여 농도에 대해 단백질 제제를 평가하고, 캄브렉스 (Cambrex)로부터의 QCL-1000<sup>(R)</sup> 크로모제닉 LAL 말단점 분석을 사용하여 내독소의 존재에 대해 시험하였다.

<250> **(c) OVA의 비오티닐화**

<251> 제조업자 (분자 프로브, 미국 캘리포니아주 샌디에고) 프로토콜에 따라 DSB-X 비오티닐 표지화 키트를 사용하여 말레이미드 활성화, 무-내독소, 닭 OVA (피어스)를 비오티닐화한다. PBS 중에서의 광범위한 투석 후에, 웨스턴 블롯 및 프로브를 위해 알칼리성 포스파타제 접합된 스트렙타비딘을 사용하여, 농도, 내독소 수준 및 비오티닐화에 대해 비오티닐화 OVA를 평가한다. 필요하다면, 데톡시-겔(Detoxi-Gel) 내독소 제거 키트 (피어스)를 사용하여 내독소가 제거된다. 비오티닐화 OVA를 CSA-4-1BBL 융합 단백질과 접합시킨다. 단백질 접합체를 등분하고 사용 시까지 -80 °C에서 동결한다.

<252> **(d) 암 백신으로서 비오티닐화 OVA/CSA-4-1 BBL 접합체의 용도**

<253> CSA-4-1BBL 및 비오티닐화 OVA을 다양한 몰비, 예컨대 1:1, 1:5, 1:10, 5:1 및 10:1 4-1BBL:OVA의 비율로 PBS 중에서 예비혼합하고, 3주 간격으로 다양한 투여량 (예컨대 10, 50 및 100 µg의 OVA)에서 BALB/c 생쥐의 군에 복강내 주사한다. 비오티닐화 OVA에 접합된 스트렙타비딘, 비오티닐화 OVA 단독 또는 CSA-4-1BBL과 혼합된 비오티닐화되지 않은 OVA로 주사된 동물을 대조로서 사용할 것이다.

<254> 동물을 오른쪽 옆구리에서 1백만 개의 생 A20 종양 세포로 피하 공격하고, 격일로 종양 발생 및 생존에 대해 검사하고, 종양이 20mm 직경의 크기에 이르러 때 안락사시켰다.

<255> 비오티닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체로의 예방접종은 강력한 항-종양 면역 반응을 일으키고, 이것은 종양 성장을 예방한다. 비접합 4-1BBL 및 OVA로의 예방접종은 반응을 발생시킬 수도 있지만, 이러한 반응은 항원/4-1-BBL 접합체에 의해 발생하는 것보다 작다. OVA 단독 또는 CSA-OVA로의 예방접종은 최소의 반응만을 일으킬 수도 있고, 따라서 종양 성장을 예방하는데 비효과적이어야 한다.

<256> **실시예 10: 항원-4-1BBL 접합체로의 초기/후기 예방접종**

<257> 상기 언급된 바와 같이, 종양은 종양 성장 과정에서 발생하는 다양한 메카니즘에 의하여 면역 체계를 회피한다. 종양 진행의 초기에 본 발명의 접합체의 효능은 면역 회피 메카니즘은, 아직 확립되지 않았을 때 동물을 종양 공격과 동시에 예방접종함으로써 증명된다. 확립된 종양에 대항한 본 발명의 접합체의 효능은, 종양이 일단 확립되고 면역 회피 메카니즘을 충분히 발달시킨 다음 동물을 예방접종함으로써 증명된다.



<258> (a) 종양 진행에서의 초기 효능

<259> BALB/c 생쥐를 백만 개의 생 A20 세포로 오른쪽 옆구리에서 공격하고, 동시에 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체로 복강내 예방접종한다. 4주 동안 1주 1회 항체/4-1 BBL 접합체로의 예방접종을 반복하고, 이때까지 대조 동물에서의 종양이 직경 10 내지 15mm의 크기에 이를 것이다. 조작되지 않은 동물 및 CSA-OVA 접합체로 예방접종된 동물을 대조로 사용할 것이다.

<260> (b) 확립된 종양에 대한 효능

<261> BALB/c 생쥐를 백만 개의 생 A20 종양 세포로 오른쪽 옆구리에서 피하 접종한다. 종양 발달에 대해 동물을 검사하고 종양이 4 내지 6mm 직경의 크기에 이르면 때 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체로 예방접종한다. 초기에 예방접종 프로토콜은 종양이 소실되거나 20mm 직경의 크기에 이르면 때까지 매주 복강내 주사하는 것을 포함한다.

<262> 기억 반응을 시험하기 위하여 종양을 효과적으로 근절된 동물을 종양 소실 후 60일에 2백만개 생 A20 세포로 공격한다.

<263> 어떠한 이론에 의해 구속되기를 원하지 않지만, 본 발명의 항원/4-1 BBL 접합체는, 종양 진행 과정에서 초기에 다양한 억제 메카니즘의 부족에 기인하여, 일단 종양이 확립된 후의 투여에 비하여 종양 진행의 초기에 투여될 때 종양의 성장을 막는데 큰 효능을 가질 수도 있다. 그럼에도 불구하고, 효율적인 항원 제시를 위해 DC로의 항원의 특이적 표적화, 위험 시그널의 발생을 위한 DC의 활성화 (아주반트 효과), 및 Treg 세포의 억제 기능의 하향조절에 기인하여, 항원/4-1 BBL 접합체는 확립된 종양을 근절하는데 효능을 나타낼 것이다. DC에서의 간접적인 효과에 추가로, 백신으로의 반복 주사는 활성화된 T 및 NK 세포 위에 4-1BB 수용체를 맞물리게 하여 활발한 증식, 생존 및 기억 T 세포 기능을 유도함으로써 면역 체계를 증대시킬 수도 있다.

<264> 실시예 11: 방관자 효과에 의한 항원-4-1BBL 접합체의 효능

<265> 하기 실시예는, 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체가 방관자 효과 또는 에피토프 확산에 의하여 정의되지 않은 A20 종양 항원에 대해 면역 반응을 발생한다는 것을 증명할 것이다.

<266> BALB/c 동물을 오른쪽 옆구리에서 OVA를 발현하는 A20으로 그리고 왼쪽 옆구리에서 모 비변형 A20 세포로 접종한다. 일단 종양이 명백하면, 동물을 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체로 예방접종한다. 상기 제시된 예방접종 스케줄을 따르지만, 효능을 증진시키기 위해 필요에 따라 변형시킬 수도 있다. 양쪽 종양 유형의 성장을 위하여 동물을 검사한다.

<267> 대안적으로, 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체 (예컨대 상기 실시예에서) 로의 예방접종 후에 종양을 성공적으로 근절시킨 동물을, OVA를 발현하는 A20 종양의 근절 후 60일 째에 반대쪽 옆구리 위에서 2백만개 모 A20 세포로 피하 공격한다.

<268> 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체 백신은 TAA로서 OVA를 소실한 모 A20 종양에 대해 효능을 나타낼 것이다. 예를 들어, OVA에 대한 효과적인 면역 반응은 종양의 사멸, 종양 항원의 발산, 및 새로운 일련의 TAA에 대한 T 세포 반응의 발생을 위하여 APC에 의한 포획 및 제시를 유도할 것이다. 모 종양의 근절은 A20-OVA 종양에 대해 발생된 방관자 효과에 의해 더욱 촉진될 수도 있다.

<269> 실시예 12: 세균 발현 체계를 사용한 비오틴닐화 항원의 생성

<270> 일부 상황에서, 본 발명의 백신의 항원성 성분으로서 사용하기 위해 유전적으로 비오틴닐화된 항원을 생성하는 것이 유리할 수도 있다. 이러한 측면에서 아비디티 인코포레이티드 (미국 코넥티컷주 덴버)의 비오틴 AviTag 테크놀로지가 사용될 수도 있다. 비오틴 AviTag은 펩티드 서열에서 비오틴을 리신 잔기에 부착시키는 비오틴 리가제 BirA에 의해 인지되는 특유의 15개 아미노산 펩티드로 이루어진다. 비오틴 AviTag은 주요 단백질에 유전적으로 융합될 수도 있고, 단백질을 비오틴 분자로 표지화할 수 있도록 한다.

<271> N-말단뿐만 아니라 C-말단 AviTag-단백질 융합을 발현하기 위하여 OVA를 코드화하는 cDNA를 pAN 및 pAC 벡터 내로 각각 서브클론화한다. 염색체 내로 안정하게 통합된 birA 유전자를 가진 AVB100 이.콜리 B 균주를 형질전환하고, 비오틴 표지를 전달하는 OVA의 높은 수준의 발현을 위하여 L-아라비노스로 유도한다. AviTag 항체 아가로스를 사용하여 발현된 단백질을 정제한다. BCA 키트, QCL-1000<sup>(R)</sup> 염색체 LAL 키트, 및 알칼리성 포스파타제 접합된 스트렙타비딘으로 프로브된 웨스턴 블롯을 사용하여 농도, 내독소 수준 및 비오틴닐화에 대하여 정제된 OVA를 평가한다. 필요하다면, 데톡시-겔 내독소 제거 키트 (피어스)를 사용하여 내독소를 제거한다.

- <272> 비오티닐화 OVA를 상기 기재된 바와 같이 CSA-4-1BBL로 접합한다. 단백질 접합체를 등분하고 사용시까지 -80℃에서 동결시킨다.
- <273> **실시예 13: TERT 또는 서비빈을 포함하는 항원/4-1BBL 접합체의 용도**
- <274> 항원으로의 백신 환경에서 비오티닐화 OVA/CSA-4-1BBL와 함께 상기 예시된 비오티닐화 항원/CSA-4-1BBL 접합체를 사용할 수도 있다. 암 백신과 관련하여, 2개의 일반적인 인간 TAA, 텔로머라제 역 전사효소 및 서비빈이 본 발명의 비오티닐화 항원/CSA-4-1BBL 접합체의 유리한 항원 성분일 수도 있다.
- <275> **실시예 14: E7/4-1BBL 접합체**
- <276> 상기 언급된 바와 같이, 항원 성분으로서 인간 파필로마바이러스 E7 항원을 포함하는 본 발명의 접합체가 자궁경부 암에 대해 유용하다. 이 실시예는 본 발명의 특정한 구현양태에 관련된다.
- <277> **(a) 비오티닐화 HPV-16 E7의 생성**
- <278> 비오티닐화 E7이 HPV 백신으로서 유용한 본 발명에 따른 접합체의 항원 성분으로서 사용된다. 하나의 구현양태에서, 전체 길이 E7 단백질은 최대 수의 에피토프를 제공하는 것이다. 전체 길이 HPV-16 E7을 코드화하는 cDNA를 TC-1 세포로부터의 전체 RNA를 사용하여 RT-PCR에 의해 클론화한다. 서열 입증 후에, DES 체계에서 구성 발현 및 분비를 위해 6X-His 표지와 함께 프레임에서 pMIB/V5-His 벡터 (인비트로젠) 내로 cDNA를 서브클론화한다. 상기 기재된 것과 같은 금속 친화력 수지를 사용하여 분비된 단백질을 정제한다. 제조업자의 프로토콜 (피어스)에 따라 EZ-링크 술포-NHS-LC-비오티닌을 사용하여 시험관내에서 정제된 E7을 비오티닐화한다. 간략하게, 정제된 농축 E7을 포스페이트 완충 염수(PBS)에서 완충액-교환하고, EZ-링크 술포-NHS-LC-비오티닌과 함께 실온에서 1시간 동안 배양한다. 접선 흐름 여과장치 (미국 뉴저지주 스펙트럼 랩스)를 사용하여 비접합 비오티닌을 제거한다.
- <279> **(b) E7/4-1BBL 접합체의 생성**
- <280> 상기 기재된 일반적 절차에 따라, 비오티닐화 E7 및 CSA-4-1BBL 융합 단백질을 사용하여 E7 및 4-1BBL을 포함한 접합체를 생성한다. 비교를 위하여, 다음과 같이 E7/4-1BBL 융합 단백질이 생성된다. DES 체계에서 구성 발현 및 분비를 위해 6X-His 표지와 함께 프레임에서 pMIB/V5-His 벡터 (인비트로젠) 내로 E7 및 4-1BBL을 코드화하는 cDNA를 서브클론화하고, 상기 기재된 바와 같이 단백질을 발현 및 정제한다.
- <281> **(c) E7/4-1BBL 접합체의 결합 활성**
- <282> E7/4-1BBL 접합체의 비오티닌 결합 및 4-1BB 수용체 결합 활성을 다음과 같이 평가한다.
- <283> 비오티닌 결합을 위하여, TC-1 세포를 비오티닐화하고 얼음 위에서 PBS 중에서 CSA-4-1BBL (100 ng/10<sup>6</sup> 세포)와 배양한다. 세포를 PBS로 광범위하게 세척하고 4-1 BBL에 대한 플루오로크롬-표지화 항체로 염색하고, 유세포 분석법을 사용하여 분석한다. CSA와 접합된 비오티닐화 세포가 대조로서 사용된다.
- <284> 활성화 T 세포 위에서 4-1BB 수용체에 대한 접합체 또는 융합 단백질의 결합을 시험하기 위하여, C57BL/6 생쥐로부터의 비장세포를 5 µg/ml의 콘카나발린 A (Con A)와 36시간 동안 활성화하고, PBS로 세척하고 얼음 위에서 다양한 농도의 접합체 또는 융합 단백질과 함께 배양한다. 세포를 광범위하게 세척하고, 4-1BBL, 코어 스트렙타비딘 또는 E7에 대한 적절한 플루오로크롬-표지화 항체로 염색하고, 유세포 분석법으로 분석하였다.
- <285> 먼저 1:4 비율 (CSA-4-1BBL:E7)로 단백질을 사용하여 접합체를 형성한 다음 CSA-비오티닌 결합의 화학양론을 결정하고 샌드위치식 ELISA에서 접합체를 시험함으로써 비오티닐화 E7에 대한 CSA-4-1BBL 접합체의 결합을 결정한다. 간략하게, 접합된 단백질을 항-E7 항체로 코팅된 96-웰 플레이트에 결합하고, 세척한 다음 반응성 항-스트렙타비딘 항체와 배양하여 존재하는 E7/4-1BBL 복합체의 양을 측정한다. 접합체의 형성을 입증한 후에, 상기 기재된 바와 같이 활성화된 T 세포 위에서 4-1BB 수용체에 대한 결합 능력에 대해 평가한다.
- <286> **실시예 15: E7/4-1BBL 접합체에 의해 유도된 면역 반응**
- <287> **(a) 용량의 최적화**
- <288> E7/4-1BBL 접합체를 포함한 백신의 최적 용량을 다음과 같이 평가할 수도 있다. 1, 10 또는 50 µg의 비오티닐화 E7를 사용하여 비오티닐화 E7 및 CSA-4-1BBL을 2개의 비율 (예컨대 CSA-4-1BBL:E7 = 1:4 및 1:8)로 혼합함으로써 비오티닐화 E7 및 CSA-4-1BBL을 포함하는 접합체를 형성한다. 필적하는 양의 대조 비오티닐화되지 않은 E7을 사용한다. (E7의 용량은 50 µg의 E7로의 예방접종이 TC-1 세포에 대한 보호 면역 반응을 발생시키는데 효

파적이라는 것을 증명한 연구를 기초로 한다). 4-1BBL:E7의 최적 비율 및 최적 량의 항원을 결정할 수 있고 하기 기재된 바와 같이 다양한 프로토콜 하에서 백신에 대한 면역 반응을 평가함으로써 실험적으로 조절할 수 있다.

**<289> (b) 사랑체 분석**

**<290>** 사랑체 염색은 CD8<sup>+</sup> T 세포의 확장에 관해 백신 효능의 평가를 가능하게 한다. C57BL/6 암컷 생쥐를 PBS 중에서 상기 기재된 백신 제제로 복강내 주사한다. PBS, CSA-4-1BBL, CSA-4-1BBL + 비오틴닐화되지 않은 E7, 또는 E7-4-1BBL 융합 단백질로 주사된 생쥐가 대조로서 사용된다. 두 번째 등가 용량을 10일 후에 복강내 주사하고, 마지막 예방접종 후에 3일에 비장세포를 수집하고, 사랑체 기술 및 유세포 분석법을 사용하여 E7-특이적 CD8<sup>+</sup> T 세포의 수를 정량화한다. 간략하게, 면역화된 동물로부터 비장세포를 FITC-항-CD8 항체 및 E7의 면역결정 에피토프, 펩티드 49-57 (RAHYNIVTF)로 부하된 MHC 부류 I H-2D<sup>b</sup> 분자의 PE-사랑체로 표지화한다. (사랑체는 내셔널 인스티튜트 오브 헬스 테트라머 퍼실리티 (미국 조지아주 아틀란타)로부터 취득될 수 있다). 센다이 바이러스 핵단백질 324-332 펩티드 (FAPGNYPAL)로 부하된 부류 I H-2D<sup>b</sup> 분자를 네가티브 대조로서 사용한다. 염색 후에, 사랑체에 대해 포지티브인 CD8<sup>+</sup> T 세포의 퍼센트를 정량화하기 위하여 유세포 분석법에 의해 세포를 분석한다.

**<291> (c) 세포내 IFN- $\gamma$  분석**

**<292>** 효과기 CD8<sup>+</sup> T 세포를 위한 서명 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 발현을 위해 백신-유도된 CD8<sup>+</sup> T 세포를 특징화하면 T 세포의 기능을 평가할 수 있다. 암컷 C57BL/6 생쥐를 비오틴닐화 E7/CSA-4-1BBL 접합체 백신의 최적 량(상기 기재된 바와 같이 결정됨)으로 복강내 주사하고, 10일 후에 면역화된 동물로부터의 비장세포를 수집하고 5일 동안 E7을 발현하는 방사선조사 TC-1 세포로 공동배양한 다음, 골기체 운반 억제제 브레펠린 A으로 배양 보충한다. 피콜 구배를 사용하여 생 세포를 수집하고, 항-생쥐 Fc $\gamma$  수용체 항체 (2.4G2, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션)와 함께 1시간 동안 배양한 다음 FITC-표지화 항-CD8 항체로 염색한다. 세포를 고정시키고, 투과시키고 PE-표지화 항-IFN- $\gamma$  항체 (파르밍겐)에 대해 염색하고 유세포 분석법에 의해 분석한다. 동종형 항체로 염색된 세포를 대조로서 사용한다. PBS, E7-4-1BBL 융합 단백질 또는 CSA-4-1BBL + 비오틴닐화되지 않은 E7로 면역화된 동물로부터의 비장세포를 대조로서 사용한다.

**<293> (d) 사멸 반응**

**<294>** E7 분자를 발현하는 TC-1 세포를 용해시키기 위한 백신-유도 CD8<sup>+</sup> T 세포의 능력을 다음과 같이 평가한다. 상기 기재된 바와 같이 예방접종된 동물로부터 수집된 비장세포를 100  $\mu$ g/ml E7 단백질의 존재 하에서 5일 동안 공동배양한다. CD8<sup>+</sup> T 세포의 성장을 뒷받침하기 위하여 배양물을 50U/ml 외인성 IL-2로 보충한다. 피콜 구배를 사용하여 생육가능한 비장세포를 회수하고, JAM 분석에서 다양한 효과기:표적 비율 (예컨대 1:1, 10:1, 20:1, 40:1 및 80:1)에서 TC-1 표적 세포에 대한 효과기 세포로서 사용한다. 예를 들어, 문헌 [Singh 등, 2003, Cancer Res. 63: 4067-73] 참조. CD8<sup>+</sup> T 세포에 의한 종양 세포의 직접적인 사멸이 암 면역요법에 중요하기 때문에, 이 분석에서 효능의 증명은 자궁경부 암에 대한 백신의 효능을 더욱 뒷받침할 것이다.

**<295> (e) CD4<sup>+</sup> T 세포 증식 반응**

**<296>** CD4<sup>+</sup> T 세포 반응의 유도에서 비오틴닐화 E7/CSA-4-1BBL의 효능을 다음과 같이 평가한다. 면역화된 동물로부터의 비장세포를 CFSE로 표지화하고, IL-2가 배양물에 첨가되지 않는 것 이외에는 상기 기재된 것과 동일한 배양 조건 하에서 재조합체 E7 단백질과 공동배양한다. 배양 동안에 다양한 날에 세포를 수집하고, APC-DC4 항체로 염색하고, 유세포 분석법을 사용하여 증식에 대해 분석한다. E7 단백질을 갖지 않거나 또는 OVA 단백질을 가진 배양물이 대조로서 사용된다. CD4<sup>+</sup> T 세포 반응이 CD8<sup>+</sup> T 세포 및 B 세포 반응을 위해 중요하다는 일반적인 합의가 존재하기 때문에, 이 분석에서 효능의 증명은 자궁경부 암에 대한 백신의 효능을 더욱 뒷받침할 것이다.

**<297> (f) 체액 반응**

**<298>** 체액 반응을 발생시키기 위해 비오틴닐화 E7/CSA-4-1BBL 백신으로의 생체내 처리 능력을 다음과 같이 평가한다. 예방접종된 생쥐로부터의 혈액을 수집하고, 혈액을 단리하고, E7 단백질을 코팅된 맥시소르브 ELISA 플레이트 (Nalgene Nunc International)를 선별하기 위해 사용한다. 항-E7 IgG 및 IgM을 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 염소 항-생쥐 IgG 및 염소 항-생쥐 IgM 항체로 검출한다. 대조는 PBS로 면역화된 동물로부터 수집된 혈청 및 상기 기재된 것과 같은 대조 단백질을 포함한다.

**<299>** 비오틴닐화 E7/CSA-4-1BBL 접합체 백신은 이러한 분석에서 강력한 반응을 일으킬 것이다. E7-4-1BBL 융합 단백

질로의 예방접종도 반응을 일으킬 수 있지만, 이러한 반응은 더욱 작은 크기인 것으로 예상된다. CSA-4-1BBL + 비오틴화되지 않은 E7로의 예방접종이 반응을 일으킬 수도 있지만, APC에 의한 E7 항원의 흡수가 무작위로 일어나고 접합체에 의해 달성되는 APC로의 E7의 표적 전달만큼 효과적이지 못하기 때문에 이러한 반응은 접합체 백신의 것만큼 강하지 않을 것이다.

**<300> 실시예 16: E7/4-1BBL 접합체의 치료 효능**

**<301>** TC-1 이식가능한 종양 모델에서 종양 형성을 방지하고 근절함에 있어서 본 발명의 E7/4-1BBL 접합체를 포함한 백신의 효능을 2개의 상이한 환경에서 평가한다. 첫 번째 환경은 면역 회피 메카니즘이 아직까지 개발되지 않았을 때 종양 주사 이전의 예방접종과 관련된다. 두 번째 환경은 충분히 개발된 면역 회피 메카니즘을 가진 확립된 종양에 대한 예방접종과 관련된다. C57BL/6 생쥐를 TC-1 세포로 주사하여 종양 형성을 유도하고, 비오틴화 E7/CSA-4-1BBL 접합체로 TC-1 주사 전 및 후에 예방접종한다. 상기 기재된 바와 같이 면역 반응을 평가한다. 격일로 종양 발달 및 생존에 대해 생쥐를 검사하고 종양이 직경 20mm의 크기에 이르면 때 안락사시킨다.

**<302> (a) 연속되는 종양 공격에 대한 E7/4-1BBL 접합체의 효능**

**<303>** 하기 실시예는 본 발명의 E7/4-1BBL 접합체로의 면역화가 연속되는 종양 공격에 대한 보호 면역을 발생한다는 것을 증명할 것이다.

**<304>** 암컷 C57BL/6 생쥐를 PBS 단독, CSA-4-1BBL 단독, 비오틴화되지 않은 E7과 혼합된 CSA-4-1BBL, 본 발명의 비오틴화 E7/CSA-4-1BBL 접합체 및 E-7-4-1BBL 융합 단백질로 복강내 주사한다. 상기 기재된 바와 같이 최적화된 용량을 사용한다. 첫 번째 투여 후 14일에 두 번째 등가 용량을 피하 주사한다. TC-1 세포를 수집하고 무균 PBS에 재현탁시키고 마지막 면역화 후 14일에 주사를 위해 사용한다. 생쥐를  $1 \times 10^5$  TC-1 세포 (0 일)로 오른쪽 옆구리에서 피하 공격하고 60일 동안 관찰한다. E7+ 종양을 위한 접합체의 특이성을 입증하기 위한 대조로서, 한 조의 면역화 생쥐를 A20 암 세포로 공격한다. 격일로 종양 발달 및 생존에 대해 생쥐를 검사하고 종양이 20mm 직경의 크기에 이르면 때 안락사시킨다. 기억 반응을 시험하기 위해, 종양을 발생시키지 않은 동물을 첫 번째 종양 공격 후 60일에  $1 \times 10^6$  TC-1 세포로 재-공격한다. 14일 간격으로, 각각의 군으로부터의 생쥐를 희생시키고 그들의 비장세포를 수집한다. 상기 기재된 바와 같이 사랑체 염색 및 사이토카인 염색을 사용하여 CD8+ T 세포 반응을 결정하기 위해 비장세포를 사용한다.

**<305> (b) 기존의 종양에 대한 E7/4-1BBL 접합체의 효능**

**<306>** 이미 존재하는 종양에 대한 본 발명의 E7/4-1BBL 접합체의 치료 효능을 다음과 같이 증명한다.

**<307>** 암컷 C57B:6 생쥐를 TC-1 세포로 오른쪽 옆구리에서 피하 주사하고 생쥐의 100%가 명백한 종양을 가질 때 예방접종한다. 종양 크기가 직경 20mm에 이르면 때까지 백신을 상기 기재된 것과 같이 최적화된 용량으로 매주 복강내 투여하고, 20mm 직경에 이르렀을 때 생쥐를 안락사시킨다. 종양의 성장 속도 및 치사율을 60일 동안 평가한다. 또한, 장기간 생존을 평가하고 90일 이상 지속한다.

**<308>** 본 발명의 비오틴화 E7/CSA-4-1BBL 접합체로의 예방접종은 양쪽 환경에서 강력한 항-종양 면역 반응을 일으키고, 이것은 종양 성장의 예방 및 기존의 종양의 근절을 유도한다. 비접합 CSA-4-1BBL 및 E7로의 예방접종 및 E7-4-1BBL 융합 단백질로의 예방접종도 항-종양 반응을 일으킬 수도 있지만, 이러한 반응은 최소이고 종양 성장을 예방하거나 기존의 종양을 근절함에 있어서 효과가 없을 수도 있다.

**<309> 실시예 17: 인플루엔자 A 항원을 포함한 접합체**

**<310>** 주요 인플루엔자 단백질 (예, H1, N1, NP 및/또는 MP2)의 cDNA를 인플루엔자 A RNA로부터의 역 전사효소-중합효소 연쇄 반응에 의해 발생시킨다. cDNA를 pCSA 벡터 내로 서브클론화하고, 안정한 형질감염체의 확립을 위해 드로소필라 곤충 세포 내로 형질감염시킨다.

**<311>** 단백질 내로 조작된 6X-His 표지의 장점을 고려하여, 금속 친화성 수지 및 접선 흐름 여과장치 (아포이문 (ApoImmune)에 의해 이미 사용된 방법 및 기술)를 사용하여, 분비된 H1, N1, NP 및 MP2 단백질을 드로소필라 배양 배지로부터 정제한다. 정제된 단백질을 겔 전기영동, 면역블롯 기술, 기질 보조 레이저 탈착/이온화 - 질량 분광분석법 (MALDI-MS) 및 분석 초한외여과에 의해 분석한다.

**<312>** CSA-4-1-BBL (상기 기재된 것과 같이 만들어짐)을 비오틴화 H1, N1, NP 또는 MP2와 함께 1:4의 물비로 혼합하여, 인플루엔자 A 항원/4-1BBL 접합체를 형성한다. 간략하게, 비오틴화 H1, N1, NP 또는 MP2를 CSA-4-1BBL과 4 °C에서 1시간 동안 배양한다. 비오틴화되지 않은 H1, N1, NP 또는 MP2를 CSA-4-1BBL과 배양하여 비



접합 대조로서 사용한다. 접합체를 백신으로서 유용한 조성물로 제형할 수 있다.

<313> **실시예 18: 인플루엔자 A에 대한 예방접종**

<314> **(a) 투여 최적화**

<315> C57BL/6 생쥐를 변화하는 용량의 상기 기재된 인플루엔자 A 항원/4-1BBL 접합체로 예방접종한다. 상기 기재된 바와 같이 사랑체 기술, 사이토카인 염색, 세포독성 분석 및 체액 반응의 측정을 포함한 표준 면역학적 기술을 사용하여 생쥐에서의 면역 반응을 결정한다. 백신을 위한 최적의 투여 섭생법을 결정하기 위하여 초기 결과를 사용한다.

<316> **(b) 감염 공격으로의 예방접종**

<317> 다음과 같이 인플루엔자 A로 공격된 생쥐에서 인플루엔자 A 항원/4-1BBL 접합체 백신의 보호 및 치료 효능을 증명한다. 인간 인플루엔자 바이러스-감염된 동물을 감염 전 및 후에 인플루엔자 A 항원/4-1BBL 접합체 백신으로 처리하고, 치료 효능을 결정하기 위하여 바이러스 역가를 측정한다. 예방접종된 동물 및 대조 감염된 동물로부터 폐를 감염 후 1, 3, 5, 7 및 9일에 수집한다. 치사율의 간접적인 측정으로서 체중 손실을 매일 결정한다.

<318> 다른 일련의 실험에서, 폐 병리를 평가하고, 폐 바이러스 역가를 결정한다. 이러한 목적을 위하여, 폐를 균질화하고 균질물을 1500 ×g에서 15분 동안 원심분리 후에 바이러스 상층액을 수집하고 이후의 분석 때까지 -80 °C에서 동결한다. 폐로부터 바이러스 상층액의 희석을 37 °C에서 24시간 동안 96웰 U-바닥 플레이트에서 3 × 10<sup>4</sup> MDCK 세포/웰로 첨가하고, 웰로부터 배지를 제거하고 무혈청 배지를 첨가한다. 4일 후에, 배양물 상층액이 더 이상 닭 적혈구를 응집시키지 않을 때 희석액을 확인한 후에, 공지된 바이러스 농도의 표준 곡선 및 TCID<sub>50</sub>의 리드-먼치(Reed-Munch) 계산을 사용함으로써 바이러스 역가를 결정한다.

<319> **실시예 19: 면역 보조자극 CD40L 잔기**

<320> 이 실시예에서 사용된 인간 단핵구 백혈병 THP-1 및 생쥐 A20 B-세포 림프종 계통은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC, 미국 미들랜드주 록빌)으로부터 구입되었다. A20 세포를 10% 가열-불활성화 태아 소 혈청 (FBS; 미국 버지니아주 윈체스터 벨리 바이오메디칼), 12mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신 (모두 기브코로부터) 및 50 μM 2-메르캅토에탄올 (미국 미조리주 세인트루이스 시그마)로 보충된 DMEM (기브코, 미국 미들랜드주 게이터스버그)에서 배양하였다. 습윤화된 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37 °C에서 5% FBS, 100 U/ml 페니실린 및 0.1mM HEPES 완충액 (기브코)로 보충된 RPMI에서 THP-1 세포를 배양하였다. 세포를 37 °C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 현탁액 중에 생육시켰다.

<321> 이 실시예에서 사용된 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 및 안정한 생쥐 CD154 형질감염된 CHO (CHO-mCD40L) 계통은 제일 비숍 박사 (유니버시티 오브 아이오와)에 의해 제공되었고, 100mM HEPES, 50 μg/ml 겐타마이신 및 5% FBS를 함유하는 RPMI 1640 (기브코) 중에서 유지되었다.

<322> 인간 말초 혈액 단핵 세포로부터 역류 세정법에 의해 단리된 일차 단핵구는 래리 웨일 박사 (NICDR)로부터의 선물이었다.

<323> CD40 녹아웃 생쥐 (CD40KO 세포주)로부터 고정화 대식세포 세포주는 골수 세포를 앞서 기재된 바와 같이 v-myc 및 v-raf 종양유전자를 함유하는 생쥐 재조합 J2 레트로바이러스로 감염시킴으로써 확립되었다. 예를 들어 문헌 [Clemon-Miller 등, 2000, Immunobiol. 202: 477-92] 참조.

<324> 형질감염체를 발현하는 안정한 인간 CD40의 발생을 위하여, 600 v, 20 μ sec 및 2 펄스에서 J2 형질전환 주를 10 μg의 DNA로 일렉트로포레이트하였다. 형질감염 후 24시간에 제오신 (100 μg/ml)를 배지에 첨가하고 CD40의 표면 발현을 위해 저항성 콜로니를 염색하였다. FACS 벤티지 SE (미국 캘리포니아주 산호세 벡톤 딕킨슨)을 사용하여 고 CD40 발현 세포를 분류하고, 이 연구에서 사용하기 위해 유지하였다.

<325> **(a) CSA-CD40L 잔기의 클론화 및 발현**

<326> PCR에서 주형 및 특이적 프라이머로서 스트렙토마이세스 아비디니로부터 단리된 게놈 DNA를 사용하여 CSA를 코드화하는 유전자를 클론화하였다 (도 16에서 a 및 b). 식물적혈구응집소(PHA) 활성화된 인간 말초 혈액 림프구로부터 단리된 총 RNA로부터 발생된 첫 번째 가닥 cDNA를 PCR에서 주형 및 CD40L-특이적 프라이머 (도 16의 c 및 d)로서 사용하여 인간 CD40L의 세포의 도메인을 클론화하였다. 콘카나발린 A (ConA)로 활성화된 생쥐 비장 세포로부터 단리된 총 RNA를 사용하여, 생쥐 CD40L을 CSA-hCD40L에서와 동일한 방식으로 클론화하였다.



- <327> 이어서, CSA/CD40L 유전자를 드로소필라 S2 발현 체계 (DES; 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 샌디에고) 내에 발현하기 위하여 pMT/BiP/V5-His CuSO<sub>4</sub>-유도가능한 벡터 내에 프레임으로 서브클론화하였다. 제조업자의 프로토콜 (인비트로젠)에 따라서 칼슘 포스페이트 형질감염 키트를 사용하여 드로소필라 S2 세포를 20 µg의 재조합체 벡터로 형질감염시켰다. 1 µg의 pCoHygro 벡터와 공동형질감염시키고 300 µg/ml 히그로마이신의 존재하에서 유지시킴으로써 안정한 형질감염체를 확립하였다. 500 µM의 최종 농도에서 황산구리를 사용하여 재조합체 단백질의 발현을 달성하였다. 유도 후 3일 째에 배양 상층액을 수집하고, 40% 과황산암모늄으로 침전시키고 PBS에 대해 투석하였다.
- <328> 앞서 기재된 바와 같이 변형된 금속-이온 친화성 크로마토그래피 방법을 사용하여 재조합체 단백질을 정제하였다. 예를 들어 문헌 [Lehr 등, 2000, Protein Expression Purif., 19: 362-68] 참조. 간략하게, 배양 상층액 또는 침전된 단백질을, 킬레이트화 세파로스 고속 유동으로 충전된 파르마시아 XK 16 컬럼 (스웨덴 업살라 파르마시아 바이오테크)을 통해 통과시키고, 재조합체 단백질을 50 mM 이미다졸로 용출시켰다. 브래드포드 염료-결합 방법 또는 ELISA (미국 미네소타주 미네아폴리스, R&D 시스템을) 사용하여 단백질 농도를 결정하였다.
- <329> **(b) 웨스턴 블롯 및 ELISA에 의한 CSA-CD40L 잔기의 특장화**
- <330> CSA-hCD40L의 발현을 검출하고 퀀티킨(Quantikine) CD40L 면역분석을 사용하여 정량화하였으며, 이러한 분석은 제조업자의 지시 (R & D 시스템)에 의해 기재된 바와 같이 마이크로플레이트 상에 예비코팅된 CD40L에 대해 특이적인 다클론성 Abs를 사용한다. 웨스턴 블롯 분석을 위하여, CSA-hCD40L 및 CSA-mCD40L의 상층액을 먼저 천연 및 변성 조건 하에서 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분별화한 다음, 반건조-블롯 장치 (미국 캘리포니아주 헤르쿨스 바이오레드)를 사용하여 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막 위로 옮겼다. 막을 먼저 차단 완충액에서 배양하고 이어서 실온에서 1시간 동안 차단 완충액 중의 1:1000 희석으로 염소 항-SA Ab (미국 일리노이주 록포드, 피어스)에서 배양하였다. 이어서, 막을 광범위하게 세척하고 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 항-염소 항체와 함께 1:4000 희석에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 제조업자의 지시 (영국 아머샴 바이오사이언시스, ECL)에 따라 화학발광 기질을 사용하여 단백질을 검출하였다.
- <331> 형질감염체는 비변성 PAGE 조건 하에서 안정한 사량체 및 고급 구조를 형성하는 높은 수준의 CSA-CD40L 잔기를 발현하였다. 단량체로의 해리는 100 °C에서 가열한 후에 변성 조건 하에서만 발생하고 60 °C에서는 발생하지 않았다. 이러한 데이터는 면역 보조자극 잔기의 CD40L 폴리펩티드가 올리고머로서 CSA의 발현, 적절한 접힘 및 존재를 방해하지 않는다는 것을 증명한다.
- <332> **(c) 수용체 결합 및 활성화 분석**
- <333> 1백만개 CD40L 포지티브 생쥐 A20B 세포 림프종 또는 인간 대식세포 THP-1 세포를 200 ng/ml의 CSA-CD40L (인간 또는 생쥐) 잔기 또는 대조 CSA 단백질과 함께 4 °C에서 30분 동안 배양하였다. PBS로의 몇 번의 세척 후에, 유세포 분석법에서 FITC 접합된 항-스트렙타비딘 항체 (벡터 래보러토리즈, 미국 캘리포니아주 버링검)를 사용하여 결합된 단백질을 검출하였다. 비특이성 결합을 검출하기 위하여 CSA를 네가티브 대조로서 사용하였다.  $0.5 \times 10^6$  THP-1 세포를 100 ng/ml의 CSA-hCD40L 또는 CSA와 배양하거나, 또는 CD40L의 막 형태로 형질감염된  $0.5 \times 10^6$  CHO 세포와 48시간 동안 공동 배양함으로써, CD80 및 MHC 부류 II 분자의 발현에 미치는 CSA-CD40L로의 자극 효과를 결정하였다. 이어서 세포를 세척하고 포화 농도의 FITC 접합된 항-CD80 (L307.4) 및 HLA 부류 II (TU 36) 항체 (BD-파르밍겐, 미국 캘리포니아주 샌디에고)로 염색하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.
- <334> 유세포 분석법에 의해 결정되고 도 17에 나타난 것과 같이, CSA-mCD40L이 인간 및 생쥐 CD40 수용체 양쪽 모두에 결합되었다 (도 17A 및 B, 어두운 선). 반대로, CSA-hCD40L은 인간 세포 위에서 단지 그의 수용체와 상호작용하고, 생쥐 세포에 대해 검출불가능한 결합은 최소였으며 (도 17C & D, 어두운 선), 이는 그의 종 특이성을 증명한다. 대조 단백질로서 CSA가 사용될 때 검출가능한 결합이 존재하지 않기 때문에 이러한 상호작용은 CD40-특이성이었다 (도 17, 희색으로 채워진 부분).
- <335> 시험되어지는 모든 CSA-hCD40L 단백질 농도에서 유세포 분석법에서 HLA 부류 II (도 18A) 및 CD80 (도 18B) 분자에 대한 항체를 사용하여, MHC 부류 II 및 CD80 분자의 상향조절된 발현을 THP-1 세포의 표면 위에서 검출하였으며, 48시간의 자극 후에 100 ng 단백질/ $5 \times 10^5$  세포에서 최대 상향조절이 달성되었다. HLA 부류 II 분자 (MFI 55.8 대 35.5)를 상향조절함에 있어서 CSA-hCD40L (가는 실선)은 CHO 세포에서 발현된 CD40L의 막 결합 형태 (굵은 실선)에 비해 더욱 효과적이었다. 반대로, CD40L의 양쪽 형태에 의한 CD80의 상향조절은 거의 필적

하였다 (MFI 33.6 대 36.2). CSA 단백질 (채워진 히스토그램)과의 배양이 배경 수준에 비하여 CD80 및 HLA 부류 II 분자의 발현에 상당한 영향을 미치지 않기 때문에, 상향조절된 발현은 CSA-hCD40L에 대해 특이적이었다.

**<336> (d) 골수-유래 DC의 제조**

**<337>** 6- 내지 8-주령 생쥐의 대퇴골로부터 골수를 분출시키고, 피펫팅에 의해 단일 세포 내로 분산시키고, 적혈구를 염화암모늄 포타슘(ACK) 용액으로 용출시켰다. 이어서, TIB 105, TIB 146 및 클론 RL-172 히브리도마 세포 배양물 포화 상층액의 각테일을 사용하여 얼음 위에서 30분 동안 단일 세포 현탁액을 T 및 B 세포에 대해 소실시켰다. (배양 상층액은 미국 펜실바니아주 유니버시티 오브 피츠버그의 타티아나 조리나 박사의 선물이었다). 세포를 토끼 보체와 함께 37 °C에서 30분 동안 배양하고, 10<sup>6</sup> 세포/ml의 농도에서 6-웰 플레이트에서 완전 배지 (RPMI 1640, 2mM L-글루타민, 100 µg/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 10% FBS, 0.1mM 비펄수 아미노산, 1mM 소듐 피루베이트, 1 µg/ml 인도메타신 및 50 µM N-메틸-L-아르기닌) (시그마)에서 밤새 생육시켰다 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). 비-부착성 세포를 조심스러운 피펫팅에 의해 수집하고, 수를 세고, 재조합 생쥐 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (5 ng/ml) 및 rmIL-4 (5 ng/ml) (미국 메사추세츠주 스윙프스콧 US 바이오로지칼로부터 입수됨)으로 보충된 완전 배지에 10 세포/ml의 농도로 재현탁하였다. 세포를 6-웰 플레이트 (4 ml/웰)에서 5일 동안 배양하였다.

**<338>** 5일째에, 배양물에 존재하는 DC를 세포 표면 MHC의 발현 및 보조자극 분자에 대하여 유형별로 분류하고, 변하는 농도 (0.1 내지 0.5 µg/10<sup>6</sup> 세포)의 CA-mCD40L, 배지 단독 또는 CSA와 함께 배양하였다. 세포를 다양한 날에 수집하고, CD11c에 대한 PE-표지화 단클론성 항체(HL3) 및 CD80 (16-10A1) 및 CD86 (GL1)로의 FITC 표지화 mAbs (모두, 파르밍겐으로부터 입수가가능함)을 사용하여 성숙 마커의 발현에 대해 분석하였다.

**<339>** 48시간 동안 다양한 농도 (0.1 내지 0.5 µg/10<sup>6</sup> 세포)의 생쥐 CSA-CD40L와 함께 배양된 5일 생쥐 골수 배양물로 부터의 미성숙 수지상 세포는, 10<sup>6</sup> 세포 당 0.2 µg 단백질 농도에서 CD86에 비해서보다 CD80 발현의 상향조절에 미치는 높은 효과 (3 대 2 배)와 함께, CD80 및 CD86 보조자극 분자 양쪽 모두의 증가된 발현을 나타내었다 (도 19A & B). 높은 농도의 CSA-CD40L 용합 단백질 또는 더 오랜 배양 기간은 추가의 상향조절을 가져오지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). CSA 단백질과 함께 배양된 세포가 배경 수준에 비하여 보조자극 분자의 발현에서 최소의 검출불가능한 변화를 갖기 때문에, 이러한 효과는 면역 보조자극 잔기에 특이적이었다.

**<340> (e) 전구-염증 사이토카인 생성의 분석**

**<341>** 인간 단핵구를 96-웰 마이크로티터 플레이트에 평판배양하고 1 µg/ml의 통상적으로 입수가가능한 삼량체 재조합체 인간 CD40L (rhsCD40L) + 1 µg/ml의 증진제 (미국 캘리포니아주 샌디에고 알렉시스 바이오케미칼스) 및 100 ng/ml의 CSA-hCD40L, CSA-mCD40L 또는 CSA를 사용하여 자극시켰다. 상층액을 배양 18시간 후에 수집하고 모든 사이토카인 (파르밍겐)에 대해 OptEIA™ 세트를 사용하여 ELISA에 의해 분석하였다. 이-맥스 정확성 마이크로플레이트 판독기 (미국 캘리포니아주 서니베일, 몰리클러 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하여 분석을 수행하였다.

**<342>** CSA-hCD40L와 인간 단핵구의 결합에 의하여 CSA 단독에 비해 인간 IL-1β 생성이 5-배 자극되었으며, 이것은 rhsCD40L에 의해 유도되는 수준과 동등하다 (도 20A & B). 유사하게, CSA-mCD40L으로 인간 단핵구를 자극하면 인간 IL-6가 강력하게 자극되었다 (도 20C & D). 따라서, 인간 및 생쥐 CSA-CD40L 용합 단백질 양쪽 모두가 IL-1β 및 IL-6를 생성하기 위해 인간 단핵구 위에서 CD40을 자극할 수 있다.

**<343> (f) RNA아제 보호 분석**

**<344>** RNA아제 보호 분석에 의하여 사이토카인 mRNA 합성 분석을 수행하였다. 세포를 6-웰 플레이트에서 평판배양하고 3 내지 4시간 동안 CSA-CD40L 잔기를 사용하여 CD40을 통해 자극하였다. 증진제와 함께 CD40L 및 rhsCD40L을 발현하는 CHO 형질감염체를 대조로서 사용하였다. 제조업자의 지시 (인비트로젠)에 의해 기재된 바와 같이 트리아졸을 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA (5 µg)을 55 °C에서 밤새 인간 사이토카인/RNA 주형 세트, mCK-3b (미국 캘리포니아주 샌디에고 리보퀀트 BD-파르밍겐)으로부터 발생된 방사능표지된 프로브와 하이브리드화하였다. RNA아제 처리를 37 °C에서 45분 동안 수행한 다음, 보호된 프로브를 정제하고 TBE 완충액 중에서 5% 폴리 아크릴아미드 겔 (바이오래드)를 사용하여 전기영동에 의해 분해하였다. 겔을 건조시키고 코닥 바이오맥스 XL X-선 필름 (미국 뉴욕주 로체스터 이스트만 코닥)에 노출시켰다. 소화되지 않은 프로브를 마커로서 사용하여, 표준 곡선을 반 로그 페이지에서 이동 거리 대 뉴클레오티드 길이로서 그래프화하였다. 이어서, 샘플 중에서

RNA아제-보호된 띠의 정체를 그래프로부터 추정하였다.

- <345> 도 20D에 나타난 것과 같이, CSA-hCD40L로의 자극은 CSA 단독에 비하여 IL-6 mRNA에서 2.8배 증가하였다.
- <346> 이러한 데이터는 함께 취해져서 인간 및 생쥐 CSA-CD40Ls 양쪽 모두가 단핵구 및 대식세포에서 CD40 시그널전달을 유도할 수 있음을 나타낸다.
- <347> **(g) CSA-hCD40L은 IFN- $\gamma$  초회감작(primed) 대식세포에서 iNOS 생성을 자극한다.**
- <348> IFN- $\gamma$  초회감작 대식세포의 CD40 결찰은 산화질소 생성을 자극하고, 이것은 대식세포의 살균 및 세포독성 활성화에서 중요한 역할을 한다. 유도가능한 산화질소 합성효소 (iNOS)는 L-아르기닌으로부터 산화질소의 합성을 촉매작용하는 산화질소 합성효소의 계에 속한다. Th1 및 Th2 T 헬퍼 세포는 대식세포에서 아르기닌 대사를 차별적으로 조절할 수 있다. Th1 세포는 대식세포에 의한 iNOS 생성을 유도하는 반면, Th2 세포는 대식세포가 항-염증 기능과 관련된 아르기나제를 생성하도록 유도한다. 따라서, 대식세포 iNOS 생성은 면역 반응의 Th1 유형의 특징이다.
- <349> 생쥐 대식세포에서 iNOS 생성을 자극하기 위한 CSA-CD40L 잔기의 능력을 다음과 같이 증명하였다. CD40KO-인간 CD40 세포를 24 시간 동안 IFN- $\gamma$ 로 초회감작시키고, 이어서 24 시간 동안 CSA-hCD40L, rhsCD40L 또는 CSA 단독으로 자극시켰다. 세포 용해물을 표준화하고 항-iNOS Ab를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 도 21에서 증명된 바와 같이, CSA-hCD40L 또는 rhsCD40L로 대식세포의 자극은 iNOS 생성을 자극시키지만, CSA는 그렇지 않다. 1  $\mu$ g/ml의 통상적인 rhsCD40L로의 자극은 배경에 비해 iNOS를 6-배 자극시키는 반면, 300 ng/ml의 CSA-hCD40L로의 자극은 CSA 단독에 비해 iNOS를 9-배 자극시켰다. 이러한 데이터는 CSA-hCD40L이 대식세포 iNOS 생성의 강력한 자극인자임을 나타낸다.
- <350> **실시예 20: CSA-4-1BBL에 의해 유도된 생체내 사멸 반응**
- <351> 비감작 C57BL/6 생쥐를, 항원으로로서 50  $\mu$ g 난알부민 (OVA) 및 2개 용량 (각각, 12.5  $\mu$ g 및 25  $\mu$ g)의 CSA-4-1BBL 또는 LPS로 정맥내 면역화하였다. 비감작 동물을 대조로서 사용하였다.
- <352> 7일 후에, 모든 생쥐는 CFSE 표지화 표적 세포를 받았으며, 이것을 다음과 같이 제조하였다. 비감작 C57BL/6 생쥐로부터의 비장세포를 2개의 집단으로 나누었다. 첫 번째 집단을 0.25  $\mu$ M CFSE (CFSE<sup>7</sup>)로 표지화하고, 두 번째 집단을 2.5  $\mu$ M CFSE로 표지화한 다음, 1시간 동안 2  $\mu$ g/ml OVA<sub>257-264</sub> 펩티드 (SIINFEKL)로 전달하였다 (CFSE<sup>3</sup>). 세포를 1:1 비율로 혼합하고 총  $1 \times 10^7$  세포를 수용체 동물 내에 정맥 주사하였다. 비장을 48시간 후에 수집하고, 유세포 분석법에 의해 CFSE 형광 강도를 분석하였다. 결과를 도 22에 나타내고, 이것은 비감작 동물로 표준화된 참조 CFSE<sup>7</sup> 피크에 비하여 펩티드-전달 CFSE<sup>3</sup> 피크의 퍼센트 용해로서 표현된다. 도 22에 나타난 바와 같이, OVA 및 CSA-4-1BBL로의 면역화는 표적 세포에서 강력한 생체내 사멸 반응을 발생하였으며, CSA-4-1BBL은 시험된 양쪽 농도에서 LPS에 비해 강력한 아주반트 효과를 증명하였다.
- <353> **실시예 21: 4-1BBL로의 보조자극은 생쥐에서 HPV16 E7 단백질에 대한 면역 반응, 조절된 TC-1 종양 및 유도된 항-종양 기억을 크게 증진시켰다.**
- <354> HPV16 E7 에피토프 P1 (아미노산 서열 RAHYNIVTF를 가짐)의 CD8+ T 세포 에피토프의 투여를 기초로 한 예방접종 프로토콜에서, 비감작 B6 생쥐를 인간 파필로마바이러스-16 E7 단백질을 안정하게 발현하는  $1 \times 10^5$  생 TC-1 세포로 오른쪽 옆구리에서 피하 공격하였다. 도 23은 TC-1 종양 모델에서 생쥐의 생존을 나타낸다. 10일 후에, 생쥐는 (i) PBS (◆, n=20); (ii) 50  $\mu$ g P1 + 12.5  $\mu$ g CSA (■, n=6), (iii) 25  $\mu$ g CSA-4-1BBL (▲, n=10); (iv) 50  $\mu$ g P1 + 25  $\mu$ g CSA-4-1BBL (△, n=13), 또는 (v) 50  $\mu$ g P1 + 10  $\mu$ g CpG (□, n=7)의 1회 피하 주사를 받았다.
- <355> 도 23에 나타난 것과 같이, P1 또는 CSA-4-1BBL로의 면역화는 일부 성공적인 면역요법을 달성하였으나, P1 및 CSA-4-1BBL로의 면역화에 의하여 더욱 양호한 결과 (증가된 생존 포함)가 달성되었다. 단지 PBS 만을 받은 모든 동물은 종양을 발생하였다.
- <356> 생존한 동물을 60일에 재공격하였다 (검은색 화살표). 종양 성장을 1주 3회 검사하였다. 종양 공격 후 CSA-4-1BBL 및 P1의 투여는 P1 또는 CSA-4-1BBL 단독, 또는 P1 및 CpG에 비하여 동물의 생존을 상당히 증가시켰다. 중요하게, P1+CSA-4-1BBL 군에서 생존 동물의 어느 것도 2차 공격 시에 종양을 발생하지 않았으며 이것은 면역학적 기억을 증명한다.

- <357> 실시예 22: OVA/CSA-4-1BBL으로의 예방접종은 종양 성장을 예방한다.
- <358> 25  $\mu\text{g}$  CSA-4-1BBL에 접합된 50  $\mu\text{g}$  OVA 또는 50  $\mu\text{g}$  비오틴화 OVA로 비감작 C57BL/6 생쥐를 면역화하였다. 일부 동물은 대조로서 처리되지 않은 채로 남았다. 7일 후에, 생쥐를  $1 \times 10^5$  OVA-발현 EG.7 종양 세포로 오른쪽 옆구리에서 피하 공격하였다. 종양 성장을 캘리퍼를 사용하여 1주 3회 검사하였다. 결과 (무-종양 생존)을 도 24에 나타낸다. 표시된 바와 같이, 모든 대조 동물 및 OVA로 예방접종된 동물은 종양을 발생한 반면, 비오틴화 OVA/CSA-4-1BBL로 예방접종된 모든 동물은 종양을 발생하지 않았으며, 이것은 비오틴화 OVA/CSA-4-1BBL로의 예방접종이 가슴샘종 종양의 성장을 100% 예방한다는 것을 증명한다.
- <359> 실시예 23: 4-1BBL은 생체내에서 항원-특이적 CTL 반응을 강력히 증진시킨다.
- <360> 비감작 C57BL/6 생쥐를 (i) 50  $\mu\text{g}$  OVA, (ii) 50  $\mu\text{g}$  OVA 및 25  $\mu\text{g}$  CSA-4-1BBL, (iii) 50  $\mu\text{g}$  OVA 및 25  $\mu\text{g}$  항-CD137 항체 또는 (iv) 50  $\mu\text{g}$  OVA 및 25  $\mu\text{g}$  LPS로 정맥내 면역화하였다. 비감작 동물을 대조로서 사용하였다. 7일 후에, 모든 생쥐는 CFSE 표지화 표적 세포를 받았다. 간략하게, 비감작 C57BL/6로부터의 비장세포를 2개의 집단으로 나누었다. 첫 번째 집단을 0.25  $\mu\text{M}$  CFSE (CFSE<sup>제1</sup>)로 표지화하였다. 두 번째 집단을 2.5  $\mu\text{M}$  CFSE로 표지화한 다음 1시간 동안 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  OVA<sub>257-264</sub> SIINFEKL 펩티드로 펄스하였다 (CFSE<sup>제2</sup>). 세포를 1:1의 비율로 혼합하고, 총  $1 \times 10^7$  세포를 수용체 동물에게 정맥내 주사하였다. 비장을 48시간 후에 수집하고, 유세포 분석법에 의해 CFSE 형광 강도를 분석하였으며, 결과를 도 25에 나타낸다. 각각의 패널의 한쪽 구석에, 비감작 동물로 표준화된 참조 CFSE<sup>제1</sup> 피크에 비교하여 펩티드 전달된 CFSE<sup>제2</sup> 피크의 퍼센트 분해율로서 결과를 표현한다. 이러한 분석은, 4-1BBL이 항원(OVA) 단독 (24.2%) 또는 항원 및 LPS (35%)에 비하여 높은 수준(95%)까지 항원 특이성 CTL 반응을 증진시킬 수 있고, 그 결과 대부분의 표적 세포가 사멸된다는 것을 밝혀내었다.
- <361> 실시예 24: 4-1BBL 보조자극은 생체내에서 CD8+ T-세포에 대한 항원 제시를 증가시킨다.
- <362> 비감작 B6-SJL (CD45.1+) 동물을 (i) 10  $\mu\text{g}$  OVA, (ii) 10  $\mu\text{g}$  OVA 및 5  $\mu\text{g}$  4-1BBL로 정맥내 면역화하거나, 또는 (iii) 비처리된 채로 유지하였다. 2일 후에, 동물은 정맥 주사에 의해  $1 \times 10^6$  CFSE 표지화 OT-1 세포 (CD45.2+)를 받았다. 비장을 3일 후에 수집하고, 도 26에 나타낸 것과 같이 유세포 분석법에 의하여 OT-1 세포의 증식을 분석하였다. 항원과 함께 4-1BBL의 투여는 대부분의 OT-1 세포의 증식에 의해 증명되는 바와 같이 CD8+ T 세포에 대한 항원 제시를 증가시켰다 (OVA + 4-1BBL에 대해 83.2%; OVA에 대해 13.7%; 비처리에 대해 8.8%).
- <363> 실시예 25: 4-1BBL은 수지상 세포에 의한 항원 흡수를 증가시킨다.
- <364> 비감작 BALB/c 생쥐를 25  $\mu\text{g}$  OVA-FITC, 25  $\mu\text{g}$  OVA-FITC 및 10  $\mu\text{g}$  CSA, 또는 25  $\mu\text{g}$  OVA-FITC 및 25  $\mu\text{g}$  CSA-4-1BBL로 피하 주사하였다. 3 시간 후에, 주사 부위에서 서혜부 림프절을 수집하였다. 도 27에 나타낸 것과 같이 생체내 형광-표지화 항원 최신정보를 결정하기 위하여 유세포 분석법을 사용하여 CD11c+ 집단에서 FITC+ 세포를 분석하였다. 나타낸 바와 같이, 4-1BBL 시그날전달은 CD11c+ DC에 의한 항원 흡수를 증가시킨 반면 대조 CSA 단백질은 효과를 갖지 않았다.
- <365> 본 발명은 당업자가 그것을 만들고 이용할 수 있도록 충분히 상세하게 설명되고 예시되었으나, 본 발명의 의도 및 범위에서 벗어나지 않으면서 다양한 대안, 변형 및 개선이 분명해야 한다. 여기에 제공된 실시예는 바람직한 구현형태의 전형이고 일례일 뿐이며 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 변형 및 기타 용도는 당업자에게 발생할 것이다. 이러한 변형은 본 발명의 의도 내에 포함되고 본 발명의 범위에 의해 한정된다.
- <366> 본 발명의 범위 및 의도에서 벗어나지 않으면서 여기에 개시된 본 발명에 다양한 치환 및 변형을 행할 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.
- <367> 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 공고는 본 발명이 속하는 기술분야에서 일반적인 기술의 수준을 나타낸 것이다. 각각의 개별적인 공보가 구체적 및 개별적으로 참고문헌으로 포함되었다고 표시된 것과 마찬가지로, 모든 특허 및 공보들은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.
- <368> 여기에 예증을 위해 기재된 본 발명은, 본 명세서에 구체적으로 개시되지 않은 어떠한 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재 하에서도 적절하게 실행될 수 있다. 즉, 예를 들어 각각의 경우에 "포함하는", "필수적으로 구성된" 및 "구성된"을 다른 2개의 용어의 어느 하나로 대체할 수도 있다. 사용된 용어 및 표현들은 설명을



위해 사용된 것이고 제한적이지 않으며, 이러한 용어 및 표현의 사용에서 본 명세서에 표시되거나 기재된 특징 또는 그의 일부의 균등물을 제외할 의도가 없고, 청구되어진 본 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 구현양태 및 임의의 특징에 의해 구체적으로 개시되어 있긴 하지만, 당업자라면 여기에 개시된 개념의 변형 및 변화를 행할 수도 있고, 이러한 변형 및 변화가 첨부된 청구의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다는 것을 이해해야 한다.

<369> 다른 일례의 구현양태가 이하 및 하기 청구의 범위에 기재된다.

<370> **일례의 구현양태**

<371> 1. (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 첫 번째 집합체; 및

<372> (b) (i) 첫 번째 항원을 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 집합체 요소를 포함한 두 번째 집합체

<373> 를 포함하는 조합.

<374> 2. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘이고, 상기 결합 쌍의 두 번째 요소가 비오틴인, 구현양태 1의 조합.

<375> 3. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 코어 스트렙타비딘을 포함하는 것인, 구현양태 2의 조합.

<376> 4. 상기 첫 번째 집합체가 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함한 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인, 구현양태 1의 조합.

<377> 5. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1 BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인, 구현양태 1의 조합.

<378> 6. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1 BBL인 구현양태 5의 조합.

<379> 7. 상기 첫 번째 집합체가 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함한 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인, 구현양태 6의 조합.

<380> 8. 상기 첫 번째 항원이 감염성 인자와 관련되는 것인, 구현양태 1의 조합.

<381> 9. 상기 감염성 인자가 인간 또는 조류 인플루엔자 및 인간 면역결핍 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 것인, 구현양태 8의 조합.

<382> 10. 상기 첫 번째 항원이 종양 관련 항원인 구현양태 1의 조합.

<383> 11. 상기 종양 관련 항원이 인간 텔로머라제 역 전사효소, 서비빈, MAGE-1, MAGE-3, 인간 용모막성 생식선자극 호르몬, 암배 항원, 알파 페토단백질, 췌장 종양태아 항원, MUC-1, CA125, CA 15-3, CA 19-9, CA 549, CA 195, 전립선-특이성 항원; 전립선-특이성 막 항원, Her2/neu, gp-100, 돌연변이체 K-ras 단백질, 돌연변이체 p53, 끝이 절단된 표피 성장 인자 수용체, 키메라 단백질<sup>p210</sup> BCR-ABL; HPV E6, HPV E7; 엡스테인-바르 바이러스 EBNA3 단백질, 및 이들의 혼합물 또는 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 10의 조합.

<384> 12. 상기 첫 번째 및 두 번째 집합체가 별개의 조성물로서 제공되는 것인 구현양태 1의 조합.

<385> 13. 상기 첫 번째 및 두 번째 집합체가 단일 조성물로서 제공되는 것인 구현양태 1의 조합.

<386> 14. 상기 조성물이 제약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것인 구현양태 13의 조합.

<387> 15. 상기 조성물에 제공된 것과 같이 상기 첫 번째 집합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 집합체에 결합되는 것인, 구현양태 13의 조합.

<388> 16. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 막횡단 도메인을 포함하지 않는 것인 구현양태 1의 조합.

<389> 17. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 세포외 도메인 또는 그의 수용체 결합 부분을 포함하는 것인, 구현양태 1의 조합.

<390> 18. (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 집합체 요소 및 (ii) 두 번

제 항원 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 세 번째 접합체를 더욱 포함하고,

- <391> 상기 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 상기 두 번째 항원이 상기 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 상기 세 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소가 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하며, 상기 첫 번째 접합체 요소가 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체 요소에 결합되는 것인, 구현양태 1의 조합.
- <392> 19. (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 첫 번째 접합체; 및
- <393> (b) (i) 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체
- <394> 를 포함하는 조합.
- <395> 20. (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 첫 번째 접합체, 및 (i) 첫 번째 종양-관련 항원을 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체; 또는
- <396> (b) 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체와 시험관내 처리된 면역 세포
- <397> 를 종양을 가진 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 첫 번째 종양-관련 항원을 발현하는 종양에 대한 면역 반응을 발생 또는 증진시키는 방법.
- <398> 21. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 상기 환자에게 투여되는 것인 구현양태 20의 방법.
- <399> 22. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 따로따로 투여되는 것인 구현양태 21의 방법.
- <400> 23. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 동시에 투여되는 것인 구현양태 21의 방법.
- <401> 24. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 단일 조성물에 제공되는 것인 구현양태 20의 방법.
- <402> 25. 상기 조성물에 제공된 것과 같이, 상기 첫 번째 접합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 상기 두 번째 접합체에 결합되는 것인, 구현양태 24의 방법.
- <403> 26. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체의 적어도 하나가 종양내 주사에 의해 투여되는 것인 구현양태 21의 방법.
- <404> 27. 상기 첫 번째 종양 관련 항원이 인간 텔로머라제 역 전사효소, 서비빈, MAGE-1, MAGE-3, 인간 용모막성 생식선자극호르몬, 암배 항원, 알파 페토단백질, 췌장 종양태아 항원, MUC-1, CA125, CA 15-3, CA 19-9, CA 549, CA 195, 전립선-특이성 항원; 전립선-특이성 막 항원, Her2/neu, gp-100, 돌연변이체 K-ras 단백질, 돌연변이체 p53, 끝이 절단된 표피 성장 인자 수용체, 키메라 단백질<sup>p210</sup> BCR-ABL; HPV E6, HPV E7; 엡스테인-바르 바이러스 EBNA3 단백질, 및 이들의 혼합물 또는 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 20의 방법.
- <405> 28. (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 두 번째 종양-관련 항원 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 세 번째 접합체를 투여하는 것을 더욱 포함하고,
- <406> 상기 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 상기 두 번째 항원이 상기 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 상기 세 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소가 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하며, 상기 첫 번째 접합체 요소가 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체 요소에 결합되는 것인, 구현양태 20의 방법.
- <407> 29. 상기 종양 관련 항원이 인간 텔로머라제 역 전사효소, 서비빈, MAGE-1, MAGE-3, 인간 용모막성 생식선자극 호르몬, 암배 항원, 알파 페토단백질, 췌장 종양태아 항원, MUC-1, CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 549, CA 195, 전립선-특이성 항원; 전립선-특이성 막 항원, Her2/neu, gp-100, 돌연변이체 K-ras 단백질, 돌연변이체 p53, 끝이 절단된 표피 성장 인자 수용체, 키메라 단백질<sup>p210</sup> BCR-ABL; HPV E6, HPV E7; 엡스테인-바르 바이러스 EBNA3 단백질, 및 이들의 혼합물 또는 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 28의 방법.

- <408> 30. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 결합 쌍의 두 번째 요소가 비오틴을 포함하는 것인 구현양태 20의 방법.
- <409> 31. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 코어 스트렙타비딘을 포함하는 것인 구현양태 30의 방법.
- <410> 32. 상기 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드 및 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인 구현양태 20의 방법.
- <411> 33. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD 80 및 CD40L으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 20의 방법.
- <412> 34. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL인 구현양태 33의 방법.
- <413> 35. 상기 첫 번째 접합체가 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함한 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인 구현양태 34의 방법.
- <414> 36. 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 막횡단 도메인을 포함하지 않는 것인 구현양태 20의 방법.
- <415> 37. 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 세포외 분자 또는 그의 수용체 결합 부분을 포함하는 것인 구현양태 20의 방법.
- <416> 38. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체로 시험관내 처리된 면역 세포를 상기 환자에게 투여하는 것인, 구현양태 20의 방법.
- <417> 39. 상기 면역 세포가 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 포함하고, 상기 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드와 상기 수용체 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되고, 상기 두 번째 접합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합되는 것인 구현양태 38의 방법.
- <418> 40. 상기 면역 세포가 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체로 동시에 처리되는 것인 구현양태 38의 방법.
- <419> 41. 상기 면역 세포가 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체로 따로따로 처리되는 것인 구현양태 38의 방법.
- <420> 42. 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 면역 세포를
- <421> (a) (i) 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체; 및
- <422> (b) (i) 상기 종양 또는 감염성 인자와 관련된 항원 또는 상기 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체
- <423> 와 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드와 상기 수용체 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되고 상기 두 번째 접합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 상기 면역 세포에 접합되는 것인, 종양 관련 항원을 발현하는 종양 또는 감염성 인자에 대해 면역 반응을 발생하거나 증진시키기 위해 면역 세포를 변형시키는 방법.
- <424> 43. 상기 첫 번째 접합체 및 두 번째 접합체가 따로따로 접촉되는 것인 구현양태 42의 방법.
- <425> 44. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 동시에 접촉되는 것인 구현양태 42의 방법.
- <426> 45. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 단일 조성물에 제공되는 것인 구현양태 44의 방법.
- <427> 46. 상기 조성물에 제공된 것과 같이, 상기 첫 번째 접합체가 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 상기 두 번째 접합체에 결합되는 것인 구현양태 45의 방법.
- <428> 47. 첫 번째 및 두 번째 접합체를 면역 세포를 함유한 환자에게 투여함으로써 접촉을 실행하는 것인, 구현양태 42의 방법.
- <429> 48. 두 번째 접합체가 종양 관련 항원을 포함하고, 상기 환자가 상기 종양을 더욱 포함하고, 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체의 적어도 하나가 종양내 주사에 의해 투여되는 것인 구현양태 47의 방법.
- <430> 49. 상기 면역 세포가 T 세포 또는 호중구인 구현양태 42의 방법.
- <431> 50. 상기 T 세포가 CD4+ 세포, CD8+ 세포, 천연 킬러 세포, 단핵구 및 수지상 세포로 구성된 군에서 선택되는

것인 구현양태 49의 방법.

- <432> 51. 상기 두 번째 접합체가 종양-관련 항원을 포함하는 것인 구현양태 42의 방법.
- <433> 52. 상기 종양-관련 항원이 인간 텔로머라제 역 전사효소, 서비빈, MAGE-1, MAGE-3, 인간 용모막성 생식선자극 호르몬, 항원, 알파 페토단백질, 췌장 종양태아 항원, MUC-1, CA125, CA 15-3, CA 19-9, CA549, CA195, 전립선-특이성 항원; 전립선-특이성 막 항원, Her2/neu, gp-100, 돌연변이체 K-ras 단백질, 돌연변이체 p53, 끝이 절단된 표피 성장 인자 수용체, 키메라 단백질<sup>p210</sup> BCR-ABL; HPV E6, HPV E7; 엡스테인-바르 바이러스 EBNA3 단백질, 및 이들의 혼합물 또는 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 51의 방법.
- <434> 53. 상기 두 번째 접합체가 감염성 인자와 관련된 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 것인 구현양태 42의 방법.
- <435> 54. 상기 감염성 인자가 세균인 구현양태 42의 방법.
- <436> 55. 상기 세균이 미코박테리움 투베르쿨로시스; 바실러스 안트라시스; 스타필로코쿠스 아우레우스로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 54의 방법.
- <437> 56. 상기 감염성 인자가 바이러스인 구현양태 42의 방법.
- <438> 57. 상기 바이러스가 아데노바이러스과; 아레나바이러스과; 칼리시바이러스과; 코로나바이러스과; 필로바이러스과; 플라비바이러스과; 헤르페스바이러스과; 헤르페스바이러스과; 오르소믹소바이러스과; 파필로마바이러스과; 피코르나바이러스과; 폭스바이러스과; 레오바이러스과; 레트라바이러스과; 라브도바이러스과 및 토가바이러스과로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 56의 방법.
- <439> 58. 상기 감염성 인자가 기생충인 구현양태 42의 방법.
- <440> 59. 상기 기생충이 플라스모듐 및 리슈만편모충으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 58의 방법.
- <441> 60. 상기 감염성 인자가 진균인 구현양태 42의 방법.
- <442> 61. 상기 진균이 아스페길러스; 칸디다; 코시디아; 크립토코시; 게오트리카; 히스토플라스마; 미크로스포리디아; 및 뉴모시스티스로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 60의 방법.
- <443> 62. 상기 환자가 말, 양, 염소, 소, 돼지, 조류, 개, 고양이 및 영장류 종으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 47의 방법.
- <444> 63. 상기 환자가 인간인 구현양태 47의 방법.
- <445> 64. 상기 면역 세포가 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 포함하고, 방법이 (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 종양 또는 감염성 인자와 관련된 두 번째 항원 또는 상기 감염성 인자 및 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 세 번째 접합체를 상기 면역 세포와 접촉시키는 것을 더욱 포함하며;
- <446> 상기 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 상기 두 번째 항원이 존재한다면 상기 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 상기 세 번째 접합체의 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소가 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체의 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하고;
- <447> 상기 첫 번째 접합체 요소가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체 요소에 결합되는 것인, 구현양태 42의 방법.
- <448> 65. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 결합 쌍의 두 번째 요소가 비오틴을 포함하는 것인 구현양태 42의 방법.
- <449> 66. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 코어 스트렙타비딘을 포함하는 것인 구현양태 65의 방법.
- <450> 67. 상기 첫 번째 접합체가 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함한 융합 펩티드를 포함하는 것인 구현양태 42의 방법.
- <451> 68. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 42의 방법.



- <452> 69. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL인 구현양태 68의 방법.
- <453> 70. 상기 첫 번째 접합체가 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인 구현양태 69의 방법.
- <454> 71. 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 막횡단 도메인을 포함하지 않는 것인 구현양태 42의 방법.
- <455> 72. 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 세포의 도메인 또는 그의 수용체 결합 부위를 포함하는 것인 구현양태 42의 방법.
- <456> 73. 면역 세포가 다른 면역 세포와 접촉될 때 상기 종양에 대한 면역 반응을 발생 또는 증진시키는 것인, 구현양태 42의 방법에 의해 제조된 면역 세포의 집단.
- <457> 74. 상기 변형된 면역 세포가
- <458> (a) (i) 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체; 및
- <459> (b) (i) 첫 번째 항원 또는 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 두 번째 접합체
- <460> 를 포함하고, 상기 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드와 상기 수용체 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합되고, 상기 두 번째 접합체가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 면역 세포에 접합되는 것인, 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 위한 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포.
- <461> 75. 상기 면역 세포가 T 세포, 호중구, 천연 킬러 세포, 단핵구 및 수지상 세포로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 74의 면역 세포.
- <462> 76. 상기 T 세포가 CD4+ 세포 및 CD+ 세포로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 75의 면역 세포.
- <463> 77. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 결합 쌍의 두 번째 요소가 비오틴을 포함하는 것인 구현양태 76의 면역 세포.
- <464> 78. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 코어 스트렙타비딘을 포함하는 것인 구현양태 76의 면역 세포.
- <465> 79. 첫 번째 접합체가 상기 면역 보조자극 폴리펩티드 및 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함한 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인 구현양태 74의 면역 세포.
- <466> 80. 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86 ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 74의 면역 세포.
- <467> 81. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL인 것인 구현양태 80의 면역 세포.
- <468> 82. (a) (i) 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함한 첫 번째 접합체; 및
- <469> (b) (i) 상기 감염성 인자와 관련된 첫 번째 항원을 포함하거나 또는 상기 감염성 인자를 포함하는 접합체 요소 및 (ii) 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 두 번째 접합체
- <470> 를 감염성 인자로의 감염을 앓고 있거나 감염될 위험이 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 감염성 인자에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 방법.
- <471> 83. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 따로따로 투여되는 것인 구현양태 82의 방법.
- <472> 84. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 동시에 투여되는 것인 구현양태 82의 방법.
- <473> 85. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체가 단일 조성물로 제공되는 것인 구현양태 84의 방법.
- <474> 86. 상기 조성물에 제공된 바와 같이, 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 첫 번째 접합체가 두 번째 접합체에 결합되는 것인 구현양태 85의 방법.
- <475> 87. 상기 첫 번째 및 두 번째 접합체의 적어도 하나가 경구; 설하, 경점막; 경피; 직장; 질내; 피하; 근육내; 정맥내; 동맥내; 척수강내; 카테터를 통해; 이식을 통해; 그리고 종양에 직접 투여하는 것으로 구성된 군에서

선택되는 경로에 의해 부여되는 것인 구현양태 82의 방법.

- <476> 88. 상기 감염성 인자가 세균인 구현양태 82의 방법.
- <477> 89. 상기 세균이 미코박테리움 투베르쿨로시스; 바실러스 안트라시스; 스타필로코쿠스 아우레우스로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 88의 방법.
- <478> 90. 상기 감염성 인자가 바이러스인 구현양태 82의 방법.
- <479> 91. 상기 바이러스가 아데노바이러스과; 아레나바이러스과 칼리시바이러스과; 코로나바이러스과; 필로바이러스과; 플라비바이러스과; 헤파드나바이러스과; 헤르페스바이러스과; 오르소마이소바이러스과; 파필로마바이러스과; 피코르나바이러스과; 폭스바이러스과; 레오바이러스과; 레트로바이러스과; 라브도바이러스과; 및 토가바이러스과로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 90의 방법.
- <480> 92. 상기 감염성 인자가 기생충인 구현양태 82의 방법.
- <481> 93. 상기 기생충이 플라스모듐 및 리슈만편모충으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 92의 방법.
- <482> 94. 상기 감염성 인자가 진균인 구현양태 82의 방법.
- <483> 95. 상기 진균이 아스페르길러스; 칸디다; 코시디아; 크립토코시; 게오트리카; 히스토플라스마; 마이크로스포리디아; 및 뉴모시스티스로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 94의 방법.
- <484> 96. 상기 환자가 말, 양, 염소, 소, 돼지, 조류, 개, 고양이 및 영장류 중으로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 82의 방법.
- <485> 97. 상기 환자가 인간인 구현양태 96의 방법.
- <486> 98. 상기 감염이 인간 또는 조류 인플루엔자이고 상기 첫 번째 항원이 H, N, M1, M2e, NS1, NS2 (NEP), NP, PA, PB1 및 PB2로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 82의 방법.
- <487> 99. 상기 감염이 HIV이고 상기 첫 번째 항원이 Gag 단백질, Pol, Vif, Vpr, Rev, Vpu, 외피 에피토프, Tat 및 Nef로 구성된 HIV 항원의 군에서 선택되는 것인 구현양태 82의 방법.
- <488> 100. (i) 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함한 접합체 요소 및 (ii) 상기 감염 또는 상기 감염성 인자와 관련된 두 번째 항원 및 상기 결합 쌍의 두 번째 요소를 포함하는 접합체 요소를 포함하는 세 번째 접합체를 부여하는 것을 더욱 포함하고,
- <489> 상기 두 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고; 상기 두 번째 항원이 존재한다면 상기 첫 번째 항원과 동일하거나 상이하고; 상기 세 번째 접합체의 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소가 첫 번째 및 두 번째 접합체의 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소와 동일하거나 상이하고;
- <490> 상기 첫 번째 접합체 요소가 상기 첫 번째 및 두 번째 결합 쌍 요소 간의 결합을 통해 두 번째 접합체 요소에 결합되는 것인, 구현양태 82의 방법.
- <491> 101. 상기 감염이 인간 또는 조류 인플루엔자이고, 상기 두 번째 항원이 H, N, M1, M2e, NS1, NS2 (NEP), NP, PA, PB1 및 PB2로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 100의 방법.
- <492> 102. 상기 감염이 HIV이고 상기 두 번째 항원이 Gag 단백질, Pol, Vif, Vpr, Rev, Vpu, 외피 에피토프, Tat 및 Nef로 구성된 군에서 HIV 항원의 군에서 선택되는 것인 구현양태 101의 방법.
- <493> 103. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고 상기 결합 쌍의 두 번째 요소가 비오틴을 포함하는 것인 구현양태 82의 방법.
- <494> 104. 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소가 코어 스트렙타비딘을 포함하는 것인 구현양태 103의 방법.
- <495> 105. 상기 첫 번째 접합체가 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드 및 상기 결합 쌍의 첫 번째 요소를 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인 구현양태 82의 방법.
- <496> 106. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 82의 방법.

- <497> 107. 상기 첫 번째 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL인 구현양태 106의 방법.
- <498> 108. 상기 첫 번째 접합체가 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함한 융합 폴리펩티드를 포함하는 것인 구현양태 107의 방법.
- <499> 109. 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 막형단 도메인을 포함하지 않는 것인 구현양태 82의 방법.
- <500> 110. 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 면역 보조자극 분자의 세포외 도메인 또는 그의 수용체 결합 부분을 포함하는 것인 구현양태 82의 방법.
- <501> 111. 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘으로 필수적으로 구성되고, 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 접합체.
- <502> 112. 코어 스트렙타비딘을 포함하는 구현양태 111의 접합체.
- <503> 113. 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, ICOSL, PD-L1, PD-L2, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF 및 APRIL로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 111의 접합체.
- <504> 114. 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘으로 필수적으로 구성된 접합체를 동물에게 투여하는 것으로 필수적으로 구성된, 동물에서 면역자극 반응을 유도하는 방법.
- <505> 115. 상기 접합체가 코어 스트렙타비딘을 포함하는 것인 구현양태 114의 방법.
- <506> 116. 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 114의 방법.
- <507> 117. 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, ICOSL, PD-L1, PD-L2, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF 및 APRIL로 구성된 군에서 선택되는 것인 구현양태 116의 방법.
- <508> 118. 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하고, 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 접합체.
- <509> 119. 면역 보조자극 폴리펩티드 및 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함한 접합체를 동물에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 면역 보조자극 폴리펩티드가 4-1BBL, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, OX40L, CD27L, CD30L, LIGHT, BAFF, APRIL, CD80 및 CD40L로 구성된 군에서 선택되는 것인 동물에서 면역자극 반응의 유도 방법.
- <510> 120. 항원을 동물에게 투여하는 것을 더욱 포함하는 구현양태 119의 방법.
- <511> 121. 상기 항원이 상기 항원 및 결합 쌍의 요소를 포함한 접합체로서 투여되는 것인 구현양태 120의 방법.

**도면의 간단한 설명**

- <29> 도 1A 및 1B는 코어 스트렙타비딘 및 생쥐 LIGHT 단백질의 세포외 도메인을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:1) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:2)를 각각 나타낸다. 코어 스트렙타비딘 서열을 도 1B에 밑줄로 그어 나타낸다.
- <30> 도 2A 및 2B는 인간 CD80의 세포외 도메인 및 코어 스트렙타비딘을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:3) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4)을 각각 나타낸다. 코어 스트렙타비딘 서열을 도 2B에 밑줄로 그어 나타낸다.
- <31> 도 3A 및 3B는 생쥐 4-1BBL의 세포외 도메인 및 코어 스트렙타비딘을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:5) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6)을 각각 나타낸다. 코어 스트렙타비딘 서열을 도 3B에 밑줄로 그어 나타낸다.
- <32> 도 4A 및 4B는 코어 스트렙타비딘 및 인간 4-1BBL의 세포외 도메인을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:7) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:8)을 각각 나타낸다. 코어 스트렙타비딘 서열을 도 4B에 밑줄로 그어 나타낸다.

- <33> 도 5A 및 5B는 코어 스트랩타비딘 및 인간 CD86의 세포외 도메인을 포함한 융합 단백질의 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:9) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:10)을 각각 나타낸다. 코어 스트랩타비딘 서열을 도 5B에 밑줄로 그어 나타낸다.
- <34> 도 6A, 6B 및 6C는 HPV16 E6 (SEQ ID NO:11), HPV16 E6 변형체 (SEQ ID NO:12) 및 HV16 E7 (SEQ ID NO:13)의 아미노산 서열을 나타낸다.
- <35> 도 7A 및 7B는 실시예에서 사용된 CSA-인간 CD40L (SEQ ID NO 14 & 15) 구축물의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 나타낸다.
- <36> 도 8은 반응체로서 비감작 BALB/c 림프구 및 자극체로서 동종 C57BL/6 방사선조사된 비장세포를 사용하여 동종 혼합 림프구 반응의 결과를 나타낸다. 표시된 배양물을 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CSA-41BBL 융합 단백질로 보충하였다.
- <37> 도 9는 CSA-41BBL 융합 단백질 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 대조 CSA 단백질 (0.19  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 또는 항-4-1BBL 단클론성 항체 클론 3H3 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 존재 또는 부재 하에서 C57B/6 생쥐로부터 분류된 CD8<sup>+</sup> T 세포를 가용성 항-CD3 단클론성 항체 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 방사선조사된 비장세포로 자극시킨 생체의 T 세포 증식의 결과를 나타낸다.
- <38> 도 10은, 1백만 개 OT-1 CD8<sup>+</sup> T 세포를 CFSE로 표지화하고, 비오틴닐화 OVA (10  $\mu\text{g}/\text{주사}$ ) 및 비오틴닐화 OVA와 혼합된 CSA-4-1BBL 융합 단백질 (1  $\mu\text{g}/\text{주사}$ ) (41BBL+OVA) 또는 비오틴닐화 OVA 및 CSA-4-1BBL을 포함한 접합체로 면역화된 B6.SJL 생쥐 내로 옮겼을 때 항원 특이성 CD8<sup>+</sup> T 세포의 증식 반응을 나타낸다. 마지막 패널(\*)은 10  $\mu\text{g}$  비오틴닐화 OVA에 접합된 5  $\mu\text{g}$ 의 CSA-4-1BBL에 대한 반응을 나타낸다. 코어 스트랩타비딘(SA)을 4-1 BBL과 동물 수준으로 사용하였다.
- <39> 도 11A는 비처리 DC의 PE<sup>+</sup> 세포 (회색으로 채워진 부위), 비오틴닐화 PE로 처리된 DC (점선) 및 비오틴닐화 PE/CSA-4-1BBL 접합체로 처리된 DC (실선)를 나타내는 히스토그램이다. 도 11B는 각각의 처리를 받은 DC에 대해 PE의 평균 형광 강도(MFI)를 나타낸다.
- <40> 도 12A는 비처리된 DC (어두운 회색) 또는 GM-CSF의 존재 하에서 CSA-41BBL (실선) 또는 LPS (점선)으로 처리된 DC의 CD86 및 MHC 부류 II 수준을 분석하기 위해 수행된 유세포 분석법의 결과를 나타낸다. 도 12B는 CD86 및 MHC 부류 II의 평균 형광 강도를 나타낸다.
- <41> 도 13은 비감작 비오틴닐화 OVA/CSA 처리된 동물 및 비오틴닐화 OVA/CSA-4-1BBL 처리된 동물로부터 DC 세포 위에서 CD40, CD86 및 MHC 부류 II 발현의 평균 형광 강도를 나타낸다.
- <42> 도 14A는, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (단일 포지티브, SP) 및 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (이중 포지티브, DP) T 세포를 비감작 BALB/c 생쥐의 비장 및 말초 림프절로부터 분류하고, 방사선조사된 비장세포, 항-CD3 항체 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 표시된 농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 4-1BBL 또는 동물량의 대조 CSA 단백질로 보충된 배양물 중에서, 단독으로 배양하고 1:1 비율로 3일 동안 배양한 공동배양 실험의 결과를 나타낸다. 도 14B는 4-1BBL을 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용하는 것 이외에는 CFSE로 표지화된 SP T 세포를 도 14A에 기재된 조건 하에 억제 분석에서 사용하는 CFSE 분석의 결과를 나타낸다. 각각의 히스토그램에 대해 분리 세포의 퍼센트를 나타낸다.
- <43> 도 15는 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (단일 포지티브, SP) 및 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (이중 포지티브, DP) T 세포를 비감작 BALB/c 생쥐의 비장 및 말초 림프절로부터 분류하고, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  항-CD3 항체 및 방사선조사된 비장세포의 존재 하에서 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 4-1BBL과 함께 또는 이들 없이 단독으로 또는 1:1 비율로 배양한 생체의 T 세포 증식의 결과를 나타낸다.
- <44> 도 16은 CSA-hCD40L 및 CSA-mCD40L 구축물의 구성을 나타낸다. 화살표는 클론화 목적을 위해 사용된 프라이머 (a, b, c, d) 및 그들의 배향을 나타낸다.
- <45> 도 17은, 인간 THP-1 및 생쥐 A20 세포 주를 CSA-mCD40L 또는 CSA-hCD40L와 배양하고, FITC 표지화 항-스트랩타비딘 항체와 염색하고 유세포 분석법에서 분석하는, CSA-mCD40L 및 CSA-hCD40L를 CD40 수용체에 결합하는 것을 증명하는 유세포 분석법 분석을 나타낸다. 패널 (a) 및 (b)는 각각 인간 및 생쥐 세포 주에 CSA-mCD40L의 결합을 나타내고, 패널 (c) 및 (d)는 각각 인간 및 생쥐 세포 주에 CSA-hCD40L의 결합을 나타낸다.
- <46> 도 18은, 인간 THP-1 세포 주를 100 ng/ml의 CSA-hCD40L로 48 시간 동안 자극시키고 (가는 실선), 유세포 분석법에서 HLA 부류 II (도 18A) 및 CD80 (도 18B) 분자에 대한 항체를 사용하여 분석하는, CSA-hCD40L로 자극된 대식세포 위에서 HLA 부류 II 및 보조자극 분자의 상향조절을 증명하는 유세포 분석법 분석을 나타낸다. CSA 단백질과 함께 배양된 세포 (채워진 히스토그램) 및 막-결합 생쥐 CD40L를 발현하는 CHO 세포 형질전환체 (굵은



실선)를 각각 네가티브 및 포지티브 대조로 사용하였다.

- <47> 도 19는, 골수-유래 미성숙 DC를 다양한 기간 동안 변화하는 농도의 CSA-mCD40L (개방 히스토그램)로 자극시키고, 특정한 항체를 사용하여 CD80 (도 19A) 및 CD86 (도 19B)의 발현을 위해 분석하는, CSA-mCD40L로 자극된 생쥐 DC의 표현형 성숙을 증명하는 유세포 분석법 분석을 나타낸다. 자극되지 않은 채로 남은 세포 (가는 실선) 또는 CSA 단백질로 자극된 세포 (채워진 히스토그램)를 대조로서 사용하였다. 48시간 동안 자극된 10<sup>6</sup> 세포 당 200 ng 단백질에 대한 데이터를 나타낸다.
- <48> 도 20은, 일차 세척된 인간 단핵구를 1 µg/ml의 rhsCD40L + 증진제 (도 20A) 및 100 ng/ml의 CSA-hCD40L (도 20B) 또는 250 ng/ml의 CSA-mCD40L (도 20C) 또는 CSA로 18 시간 동안 자극시키고, 상층액을 ELISA에 의해 IL-1β 및 IL-6 함량에 대해 분석하는, CSA-CD40L로 자극된 인간 단핵구에 의한 사이토카인의 분비를 나타낸다. 도 20D는 인간 CD40 (CD40KO)를 발현하도록 유전적으로 변형된 생쥐 대식세포 세포 주를 CSA 또는 CSA-hCD40L (1 µg/ml)로 3시간 동안 자극하고 RNA를 추출하고, 주형 mck-3b와 함께 리보퀀트(RiboQuant) 다중프로브 RNA아제 보호 체계를 사용하는 RNA아제 보호 분석에 의해 분석할 때의 결과를 나타낸다. IL-6, L32 및 GAPDH에 대해 보호된 프로브를 나타낸다. 히스토그램은 관리 유전자 L32로 표준화한 후에 IL-6의 띠 밀도를 나타낸다.
- <49> 도 21은, 인간 CD40을 발현하기 위해 형질감염된 생쥐 CD40KO 대식세포 주를 24시간 동안 IFN-γ로 초회감작시킨 다음, 세포를 증진제와 함께 1 µg/ml의 통상적인 rhsCD40L로 또는 300 ng/ml의 CSA-hCD40L 또는 CSA 단백질로 24시간 동안 자극시키고, 항-iNOS 항체를 사용하는 웨스턴 블롯에 의해 세포 용해물을 분석하는, CSA-hCD40L로 자극된 대식세포에서 iNOS 발현의 자극을 나타낸다. 히스토그램은 iNOS 띠의 밀도를 나타낸다.
- <50> 도 22는 항원으로 50 µg OVA와 함께 12.5 및 25 µg의 용량에서 LPS에 비교할 때 CSA-4-1BBL의 강력한 생체내 아주반트 효과를 나타낸다. 결과를 생체내 사멸 퍼센트로 환산하여 기록한다.
- <51> 도 23은 (i) PBS (◆, n=20); (ii) 50 µg P1 + 12.5 µg CSA (■, n=6), (iii) 25 µg CSA-4-1BBL (▲, n=10); (iv) 50 µg P1 + 25 µg CSA-4-1BBL (△, n=13), 또는 (v) 50 µg P1 + 10 µg CpG (□, n=7)로 예방접종이 기존의 자궁경부 종양에 미치는 효과를 나타낸다. P1 및 CSA-4-1BBL의 조합으로의 예방접종에 의해 상당히 향상된 생존 비율이 얻어지는 반면, P1 또는 CSA-4-1BBL로의 예방접종은 일부 성공적인 면역요법을 제공하였다.
- <52> 도 24는 종양 성장을 예방하는데 미치는 비오틴화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체로의 예방접종 결과를 나타낸다. OVA (△), 비오틴화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체 (▲) 및 대조 생쥐 (●)로 예방접종된 무-종양 생존율을 나타내고, 비오틴화 OVA/CSA-4-1BBL 접합체로 예방접종된 생쥐는 100 % 생존을 나타낸다.
- <53> 도 25는 CFSE 염색된 세포의 유세포 분석법을 나타내고, 4-1BBL이 항원 단독 또는 항원 및 LPS에 비하여 높은 수준까지 생체내에서 항원 특이적 CTL 반응을 증진시킬 수 있음을 증명한다. 결과를 비감작 동물로 표준화된 참조 CFSE<sup>지</sup> 피크에 비교하여 펩티드 전달된 CFSE<sup>고</sup> 피크의 퍼센트 분해율로서 각 패널의 한쪽 구석에 표현한다.
- <54> 도 26은 4-1BBL 보조자극이 생체내에서 항원 제시를 증가시킴을 증명하는 유세포 분석법 데이터를 나타낸다.
- <55> 도 27은 4-1BBL 보조자극이 생체내에서 수지상 세포에 의한 항원 흡수를 증가시킴을 증명하는 유세포 분석법 데이터를 나타낸다.

도면

도면1A

CSA-LIGHT 뉴클레오타이드 구축물 (SEQ ID NO:1)

ACCCGTGTGTAAAGCCGCGTTTCCAAAATGTATAAAACCGAGAGCATCTGGCCAATG  
 TGCATCAGTTGTGGTCAGCAGCAAAATCAAGTGAATCATCTCAGTGCAACTAAAGGG  
 GGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATTACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGG  
 CCTCTCGCTCGGGAGATCTCATCATCACCATCACCATATCACCGGCACCTGGTACAA  
 CCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGATGGCGCCCTGACCGGAAC  
 CTACGAGTCGCGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACCGGTGCTTACGA  
 CAGCGCCCCCGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAA  
 GAATAACTACCGCAACGCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGG  
 CGCCGAGGCGA.GGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGCGGCCACCGAGGCCAA  
 CGCCTGGAAGTCCACGCTGGTTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCGGC  
 CGCCTCAAGCGAATTCCAACGATCTCACCAGGCCAACCCAGCAGCACATCTTACAGG  
 AGCCAACGCCAGCTTGATAGGTATTGGTGGACCTCTGTTATGGGAGACACGACTTGG  
 CCTGGCCTTCTTGAGGGGCTTGACGTATCATGATGGGGCCCTGGTGACCATGGAGCC  
 CGGTTACTACTATGTGTACTCCAAAGTGCAGCTGAGCGGCGTGGGCTGCCCCAGGG  
 GCTGGCCAATGGCCTCCCATCACCATGGACTATACAAGCGCACATCCCCTACCC  
 GAAGGAGTTAGAACTGCTGGTCAGTCGGCGGTCACCTGTGGCCGGGCCAACAGCTC  
 CCGAGTCTGGTGGGACAGCAGCTTCTGGGCGGCGTGGTACATCTGGAGGCTGGGGA  
 AGAGGTGGTGGTCCGCGTGCCTGGAAACCGCCTGGTCAAGACACGTGACGGCACCAG  
 GTCTATTTTCGGAGCTTTCATGGTCTGAAGGCTGCGGTGACAATGTATTTTGTGGAG  
 GGACCTCTCCAGGACTCACCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCAAGGTAAGCCTATCC  
 CTAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTACATCATCACCATCACCATT  
 GAGTTTAAACCCGCTG

도면1B

CSA-LIGHT 용합 단백질 (SEQ ID NO:2)

MKLCILLAVVAFVGLSLGRSHHHHHITGFWYNQLGSTFIIVTAGADGALTGTYESAV  
GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSALTGWTVANKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARI  
NTQWLLTSGATEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASSEFORSHQANPAHLTGANASL  
 IGIGGPLLWETRLGLAFLRGLTYHDGALVTMEPGYYVYSKVQLSGVGCPOGLANGL  
 PITHGLYKRTRSRYPKLELLVSRRSPCGRANSRRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEIVVR  
 VPGNRLVLRPRDGRSYFGAFMV

도면2A

CD80-CSA 뉴클레오티드 구축물 (SEQ ID NO:3)

CATCTCCAGTGCAACTAAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGC  
 ATATTACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGAGATCTAT  
 CCACGTGACCAAGGAAGTGAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCACA  
 ATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAG  
 AAGAAAATGGTGTGACTATGATGTCTGGGACATGAATATATGGCCGA  
 GTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGA  
 TCCTGGCTCTGCGCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTG  
 AAGTATGAAAAAGACGCTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTT  
 ATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTC  
 CAACTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAACCTCTGGAGGTTTTCCA  
 GAGCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAATGCCATCAA  
 CACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTTAGCAGCA  
 AACTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAG  
 TATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCAAGCA  
 AGAGAGATCTCATCATCACCATCACCATATCACCGGCACCTGGTACAACC  
 AGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGGGCGCCGACGGCGCCCTGACC  
 GGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGAC  
 CGGTGCTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCG  
 GTTGGACGGTGCCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCACTCCGCGACC  
 ACGTGGAGCGGCAGTACGTACGTACGGCGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCA  
 GTGGCTGTTGACCTCCGGCGCCACCGAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGC  
 TGGTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCGCCGCTCAAGC  
 CGAATTCGAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGC  
 CCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG  
 CGTACCGGTCAATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGC  
 CTCGACTGTGCTTTCTAA

도면2B

CD80-CSA 융합 단백질 (SEQ ID NO:4)

M K L C I L L A V V A F V G L S L G R S I H V T K E V K E  
 V A T L S C G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q K E K K M V  
 L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V  
 I L A L R P S D E G T Y E C V V L K Y E K D A F K R E H L  
 A E V T L S V K A D F P T P S I S D F E I P T S N I R R I  
 I C S T S G G F P E P H L S W L E N G E E L N A I N T T V  
 S Q D P E T E L Y A V S S K L D F N M T T N H S F M C L I  
 K Y G H L R V N Q T F N W N T T K Q E R S H H H H H I T  
G T W Y N Q L G S T F I V T A G A D G A L T G T Y E S A V  
G N A E S R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W T  
V A W K N N Y R N A H S A T T W S G Q Y V G G A E A R I N  
T Q W L L T S G A T E A N A W K S T L V G H D T F T K V K  
P S A A S S R I L Q I S S T V A A A R V

도면3A

CSA-4-1BBL 뉴클레오타이드 구조물 (SEQ ID NO:5)

TTCATGCAACTAAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATT  
 ACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGAGATCTCATCATC  
 ACCATCACCATATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTC  
 ATCGTGACCGCGGGCGCCGATGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGC  
 CGTCGGCAACGCGAGAGCCGCTACGTCTGACCGGTTCGTACGACAGCG  
 CCCCAGCCACCACGCGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGG  
 AAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTA  
 CGTCGGCGGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGTTGACCTCCG  
 GCGCCACCGAGGCCAACGCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACC  
 TTCACCAAGGTGAAGCCGTCCGCGCCCTCAAGCGAATTCGCGACCGAGCC  
 TCGGCCAGCGCTACAATCACCACCTCGCCCAACCTGGGTACCCGAGAGA  
 ATAATGCAGACCAGGTCAACCCTGTTTCCCACATTGGCTGCCCAACACT  
 ACACAACAGGGCTCTCCTGTGTTCCGCAAGCTACTGGCTAAAAACCAAGC  
 ATCGTTGTGCAATAACAACCTCTGAACTGGCACAGCCAAGATGGAGCTGGGA  
 GCTCATACCTATCTCAAGGTCTGAGGTACGAAGAAGACAAAAGGAGTTG  
 GTGGTAGACAGTCCCGGGCTCTACTACGTATTTTGGAACTGAAGCTCAG  
 TCCAACATTCACAAACACAGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGCTCTCTTTG  
 TTTTGCAAGCAAAGCCTCAGGTAGATGACTTTGACAACCTGGCCCTGACA  
 GTGGAAGTGTTCCTTGCTCCATGGAGAACAAGTTAGTGGACCGTTCCTG  
 GAGTCAACTGTTGCTCCTGAAGGTGGCCACCGCCTCAGTGTGGGTCTGA  
 GGGCTTATCTGCATGGAGCCCAGGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTCT  
 TATCCCAACACCACAGCTTTGGACTCTTTCTTGTGAAACCCGACAACCC  
 ATGGGAATGA/AACTATCCTTCTTGTGACTCCTAGTTGCTAAGTCCTCAA  
 GCTGCTATGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAA  
 CCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTACATCATCACCATCACC  
 ATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTTCTAA

도면3B

CSA-퓨린 4-1BBL 융합 단백질 (SEQ ID NO:6)

M K L C I L L A V V A F V G L S L G R S H H H H H I T G  
T W Y N Q L G S T F I V T A G A D G A L T G T Y E S A V G  
N A E S R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W T V  
A W K N N Y R N A H S A T T W S G Q Y V G G A E A R I N T  
Q W L L T S G A T E A N A W K S T L V G H D T F T K V K P  
S A A S S E F R T E P R P A L T I T T S P N L G T R E N N  
 A D Q V T P V S H I G C P N T T Q Q G S P V F A K L L A K  
 N Q A S L C N T T L N W H S Q D G A G S S Y L S Q G L R Y  
 E E D K K E L V V D S P G L Y Y V F L E L K L S P T F T N  
 T G H K V Q G W V S L V L Q A K P Q V D D F D N L A L T V  
 E L F P C S M E N K L V D R S W S Q L L L L K A G H R L S  
 V G L R A Y L H G A Q D A Y R D W E L S Y P N T T S F G L  
 F L V K P D N P W E



도면4A

CSA- 인간 4-1BBL 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:7)

TTCATGCAACTAAAGGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATTACTGGCC  
 GTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGAGATCTCATCATCACCATCACCATATC  
 ACCGGCACCTGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGAT  
 GCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTC  
 CTGACCGGTGTTACGACAGCGCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGT  
 TGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCACTCCGCGACCACGTGGAGC  
 GGCCAGTACGTGGCGGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCAGTGGCTGTTGACCTCC  
 GCGGCCACCGA.GGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTGGCCACGACACCTTCACC  
 AAGGTGAAGCCGTCCGCCGCTCAAGCGAATTCGCCTGCCCTGGGCCGTGTCGGG  
 GCTCGGCCTCGCCGGCTCCGCGCCAGCCGAGACTCCGCGAGGGTCCCGAGCTT  
 TCGCCCGACGATCCCGCCGCTCTTGGACCTCGCGCAGGGCATGTTGCGCAGCTG  
 GTGGCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGC  
 TTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTG  
 GTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTTTCAACTAGAGCTGCGGCGGTG  
 GTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGC  
 TCTGCTGCTGGGCGCCGCGCTTGGCTTGGACCTGGACCTGCCACCCGCTCCCTCC  
 GAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGTGACCTGAGTGCCGGC  
 CAGCGCTGGGCGTCCATCTTACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCTGGCAGCTT  
 ACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCGAAATCCAGCCGGA  
 CTCCCTTACCAGGTCGGAATAACGCCAGCCTGGGTGCAGCCACCTGGACAGAG  
 TCCGAATCCTACTCCATCCTCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCC  
 CTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCACCATCACCATT  
 GAGTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTTCTAA

도면4B

CSA- 인간 4-1BBL 융합 단백질 (SEQ ID NO:8)

MKLCILLAVVAVFVGLSLGRSHHHHHHITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAV  
GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSQTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARI  
NTQWLLTSGATEANAWKSTLVGHDITFKVKPSAASSEFACPWAVSGARASPGSAASP  
 RLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS  
 YKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT  
 VDLFPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR  
 VTPEIPAGLPSRSE

도면5A

CD86-CSA 뉴클레오타이드 구조물 (SEQ ID NO:9)

CATCTCCAGTGCACACTAAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATTAC  
 TGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGAGATCTGCTCCTCTGAAGATTC  
 AAGCTTATTTCAATGAGACTGCAGACCTGCCATGCCAATTTGCAAACCTCTCAAAACC  
 AAAGCCTGAGTGAGCTAGTAGTATTTTGGCAGGACCAGGAAAACCTGGTTCTGAATG  
 AGGTATACTTAGGCAAAGAGAAATTTGACAGTGTTCATTCCAAGTATATGGGCCGCA  
 CAAGTTTTGATTCGGACAGTTGGACCTGAGACTTCACAATCTTCAGATCAAGGACA  
 AGGGCTTGATCAATGTATCATCCATCACAAAAGCCACAGGAATGATTCGCATCC  
 ACCAGATGAATCTGAACTGTCAGTGCCTGCTAACTTCAGTCAACCTGAAATAGTAC  
 CAATTTCTAATAATAACAGAAAATGTGTACATAAAATTTGACCTGCTCATCTATACAG  
 GTTACCCAGAACCTAAGAAGATGAGTGTFTTGTGTAAGAACCAGAATCAACTATCG  
 AGTATGATGGTATTATGCAGAAATCTCAAGATAATGTCACAGAACTGTACGACGTTT  
 CCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCCTGATGTTACGAGCAATATGACCATCTTCTGTA  
 TTCTGGAAACTGACAAGACGCGGCTTTTATCTTCACCTTCTCTATAGAGCTTGAGG  
 ACCCTCAGCCTCCCCAGACCACATTCCTAGATCTCATCATCACCATCACCATATCA  
 CCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGGGCGCCGACG  
 GCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTC  
 TGACCGGTTCGTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTT  
 GGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCG  
 GCCAGTACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGTTGACCTCCG  
 GCGCCACCGAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACCTTCACCA  
 AGGTGAAGCCGTCCGCGCCTCAAGCCGAATTCCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGG  
 CCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGT  
 CTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGA  
 TCAGCCTCGACTGTGCTTTCTAA

도면5B

CD86-CSA 융합 단백질 (SEQ ID NO:10)

MKLCILLAVVAVFVGLSLGRSAPLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVVFWDQ  
 ENLVLNEVYLGKEKFDVSHSKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHKKP  
 TGMIRIHQMNSLSVLANFSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKMSVLLR  
 TKNSTIEYDGMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSP  
 FSIELEDPPPPDHIPRSHHHHHHITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGN  
AESRYVLTGRYDSAPATDGSGLGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT  
QWLLTSGATEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASS

도면6A

HPV16 E6 아미노산 서열 (SEQ ID NO:11)

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVDFAFRDL  
 CIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLBQQYNKPLCDLLIRCINQ  
 KPLCPBEKQRHLDDKKQRFHNIRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQL

도면6B

HPV16 E6 변형체 아미노산 서열 (SEQ ID NO:12)

MFQDPQERPTKLPDLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDG  
NPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLQYQYKPLCDLLIRCSINGQKPLCPDE  
KQRHLDDKKQRFHNRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQL

도면6C

HPV16 E7 아미노산 서열 (SEQ ID NO:13)

MHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNIIVTF  
CCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

도면7A

CSA-hCD40L 뉴클레오티드 구조물 (SEQ ID NO:14)

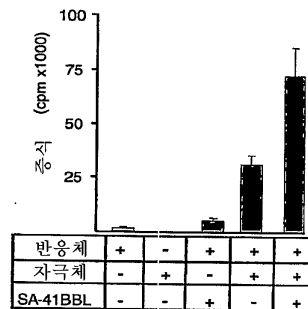
CCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATTACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTT  
GGCCTCTCGCTCGGAGATCTCATCACCATCACCATATCACCGGCAC  
CTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGATG  
GCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGC  
TACGTCCTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGAGGCAGCGG  
CACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCC  
ACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTGGCGGGCGCCGAGGCGAGG  
ATCAACACCCAGTGGCTGTTGACCTCCGGCGCCACCGAGGCCAACGCCCTG  
GAAGTCCACGCTGGTTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCGG  
CCGCCCAAGCGAATCTTTGGACAAGATAGAAGATGAAAGGAATCTTCAT  
GAAGATTTTGTATTCATGAAAACGATACAGAGATGCAACACAGGAGAAAAG  
ATCCTTATCCTTACTGAACTGTGAGGAGATTAAGCCAGTTTGAAGGCT  
TTGTGAAGGATATAATGTTAAACAAAGAGGAGACGAAGAAAAGAAAACAGC  
TTTGAATGCAAAAAGGTGATCAGAATCCTCAAATTCGGGCACATGTCAT  
AAGTGAGGCCAGCAGTAAAACAACATCTGTGTTACAGTGGGCTGAAAAAG  
GATACTACACCATGAGCAACAACCTTGGTAACCCTGGAAAATGGGAAACAG  
CTGACCGTTAAAAGACAAGGACTCTATTATATCTATGCCCAAGTCACCTT  
CTGTTCCAATCGGGAAGCTTCGAGTCAAGCTCCATTTATAGCCAGCCTCT  
GCCTAAAGTCCCCCGGTAGATTCGAGAGAATCTTACTCAGAGCTGCAAAT  
ACCCACAGTTCGGCAAACCTTGCGGGCAACAATCCATTCACTTGGGAGG  
AGTATTTGAAATGCAACCAGGTGCTTCGGTGTGTTGTCAATGTGACTGATC  
CAAGCCAAGTGAGCCATGGCACCTGGCTTCACGTCCTTTGGCTTACTCAA  
CTCTGAACAGTGTACCTTGCAGGAGCTCTAAGCCGAATTCGCAGATAT  
CCAGCACAGTGGCGGCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCC  
TATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCACGCGTACCGGTCATCATC  
ACCATCACCATGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTTCT  
TAA

도면7B

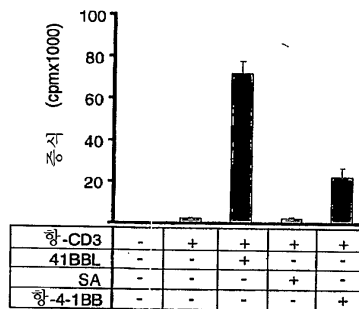
CSA-hCD40L 융합 단백질 (SEQ ID NO:15)

M K L C I L L A V V A F V G L S L G R S H H H H H H I T G  
T W Y N Q L G S T F I V T A G A D G A L T G T Y E S A V G  
N A E S R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W T V  
A W K N N Y R N A H S A T T W S G Q Y V G G A E A R I N T  
Q W L L T S G A T E A N A W K S T L V G H D T F T K V K P  
S A A S S E F L D K I E D E R N L H E D F V F M K T I Q R  
 C N T G E R S L S L L N C E E I K S Q F E G F V K D I M L  
 N K E E T K K E N S F E M Q K G D Q N P Q I A A H V I S E  
 A S S K T T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E N G  
 K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S N R E A S S Q A  
 P F I A S L C L K S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K  
 P C G Q Q S I . H L G G V F E L Q P G A S V F V N V T D P S  
 Q V S H G T G F T S F G L L K L

도면8

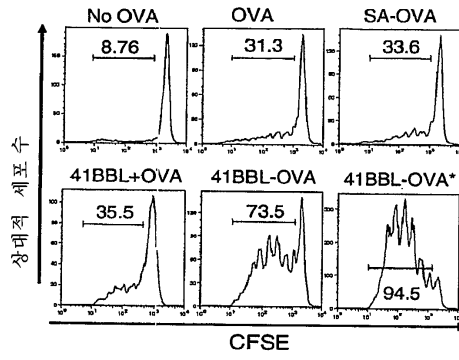


도면9

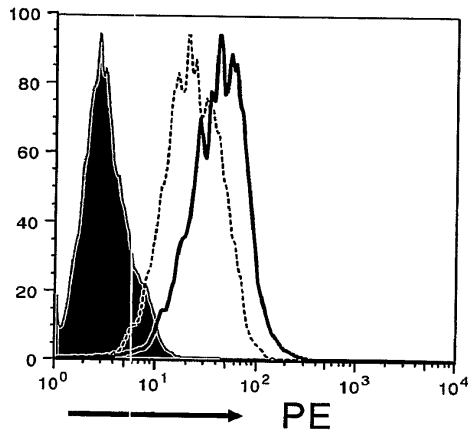




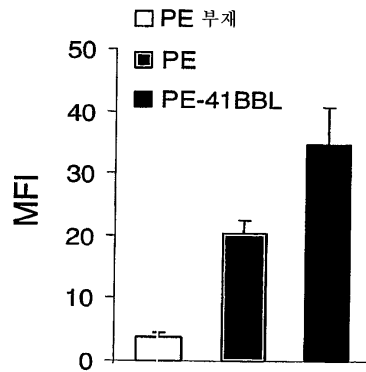
도면10



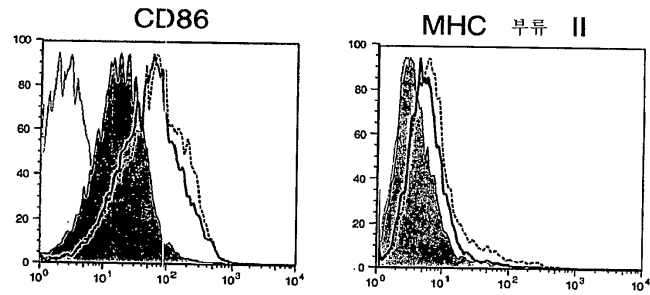
도면11A



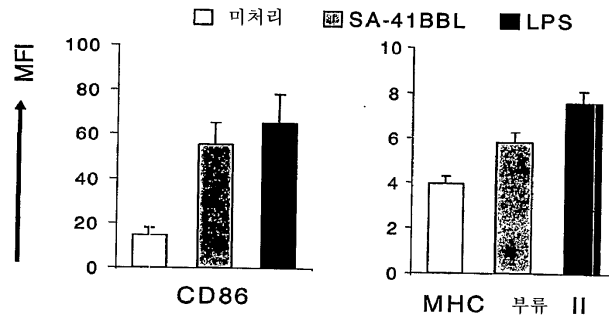
도면11B



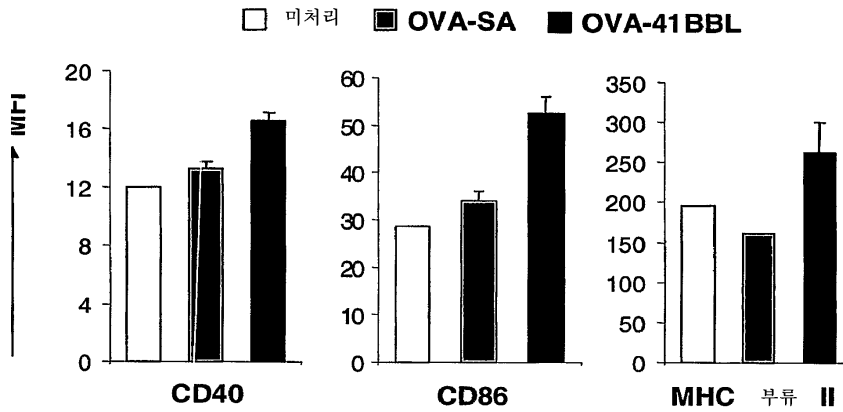
도면12A



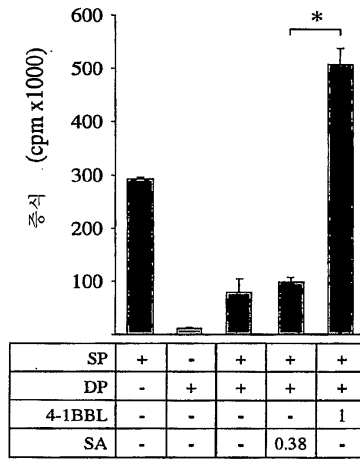
도면12B



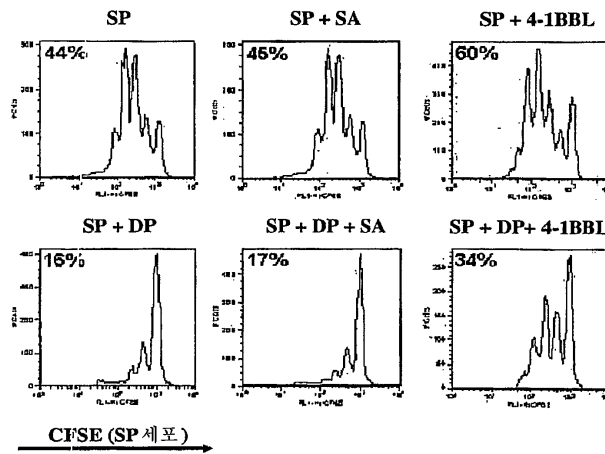
도면13



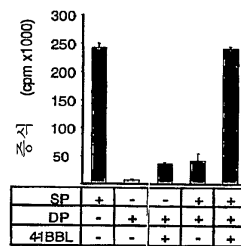
도면14A



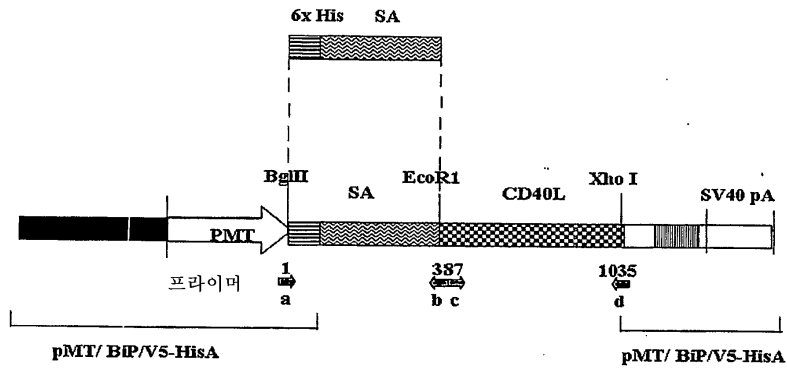
도면14B



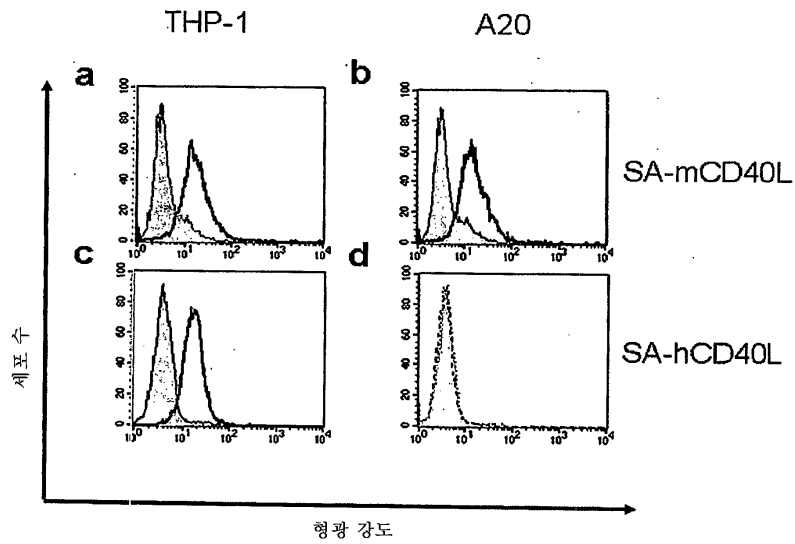
도면15



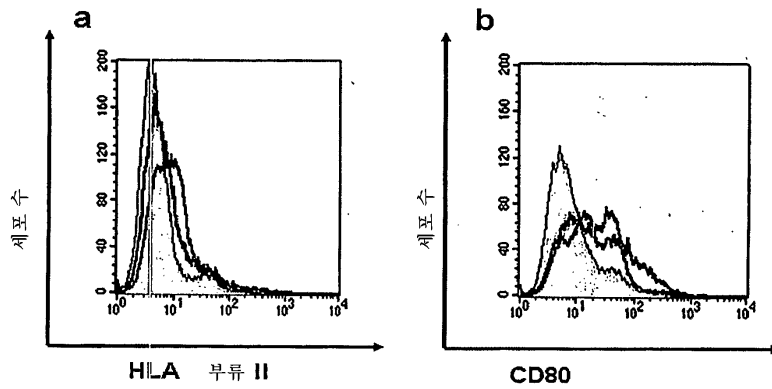
도면16



도면17

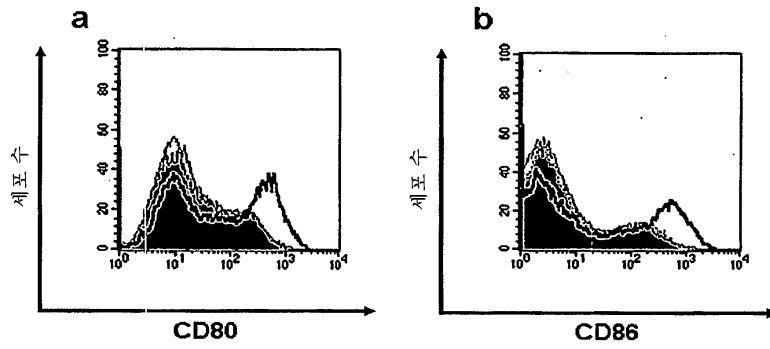


도면18

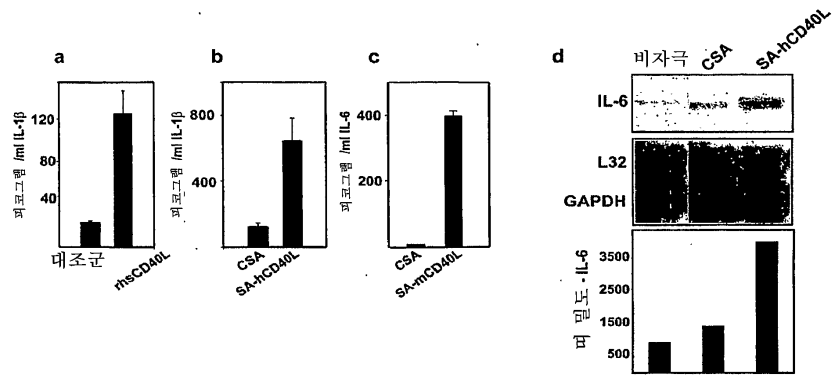




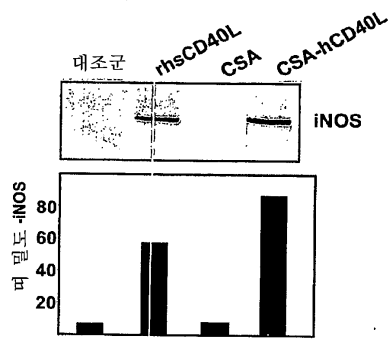
도면19



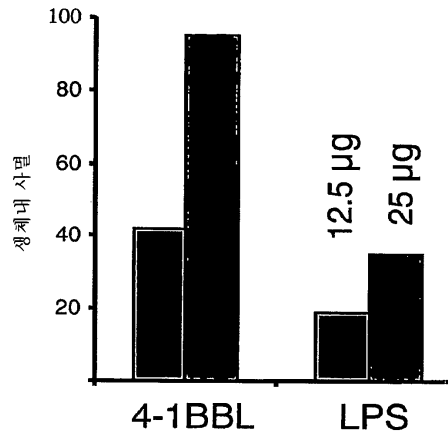
도면20



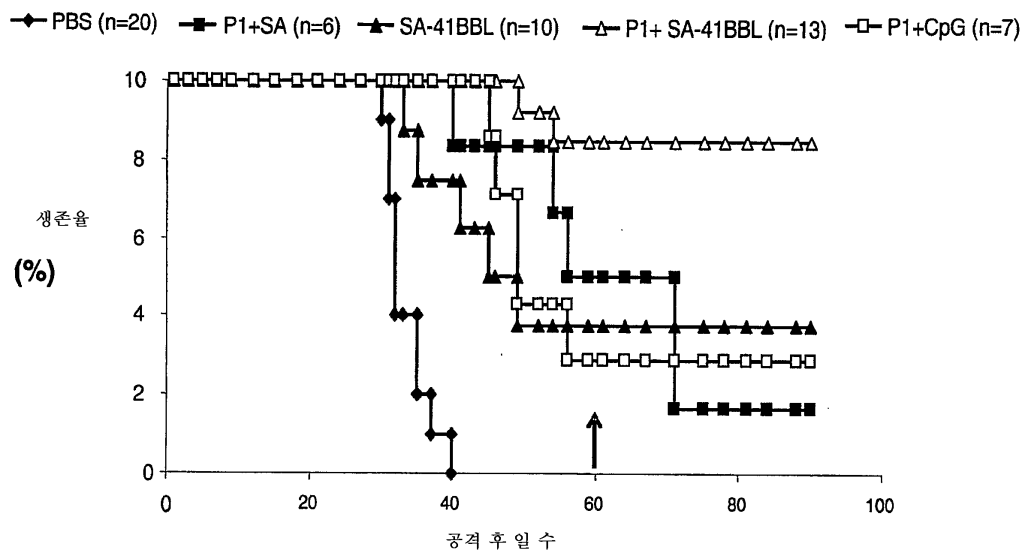
도면21



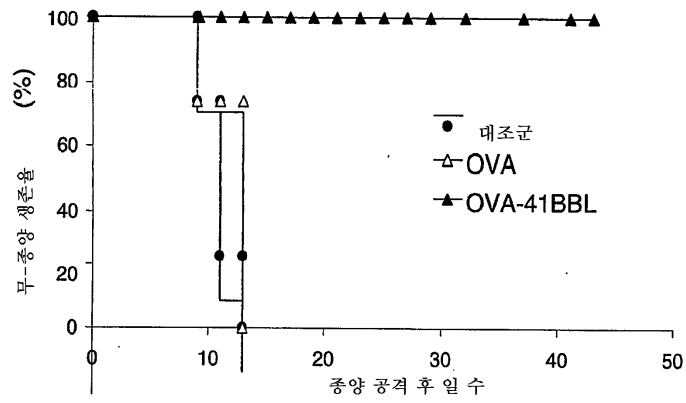
도면22



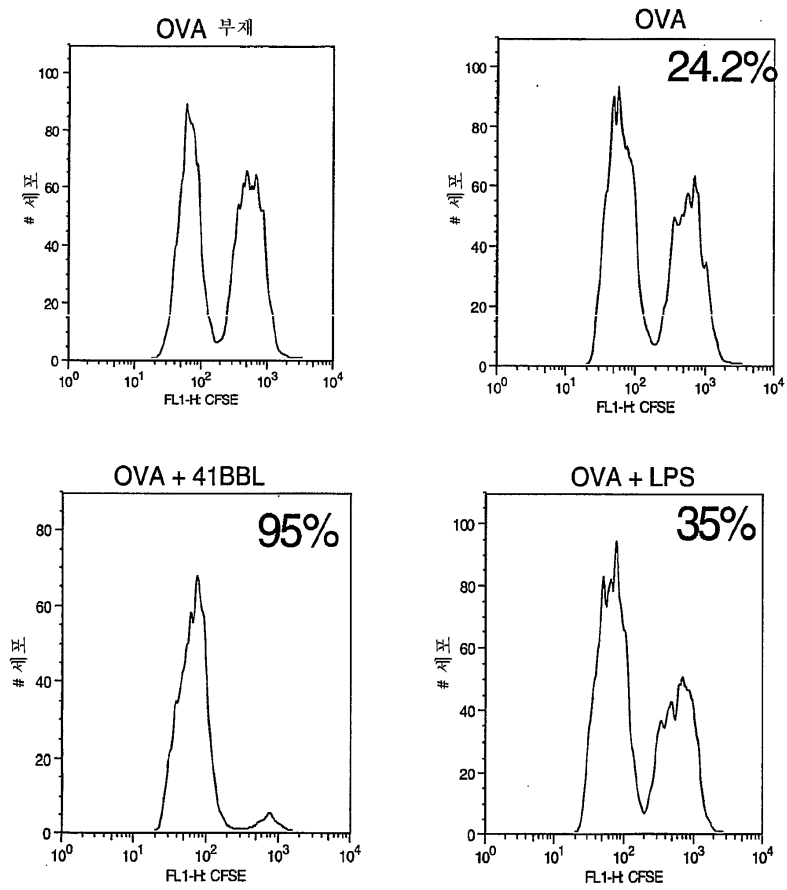
도면23



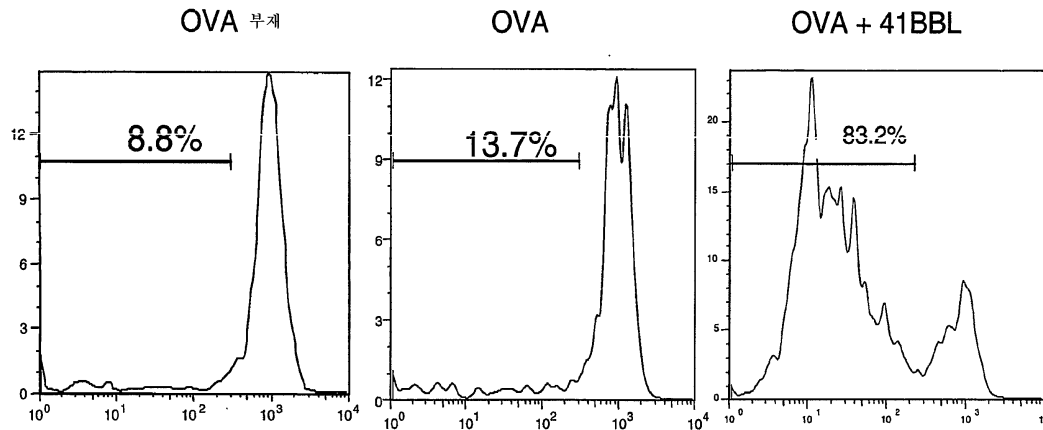
도면24



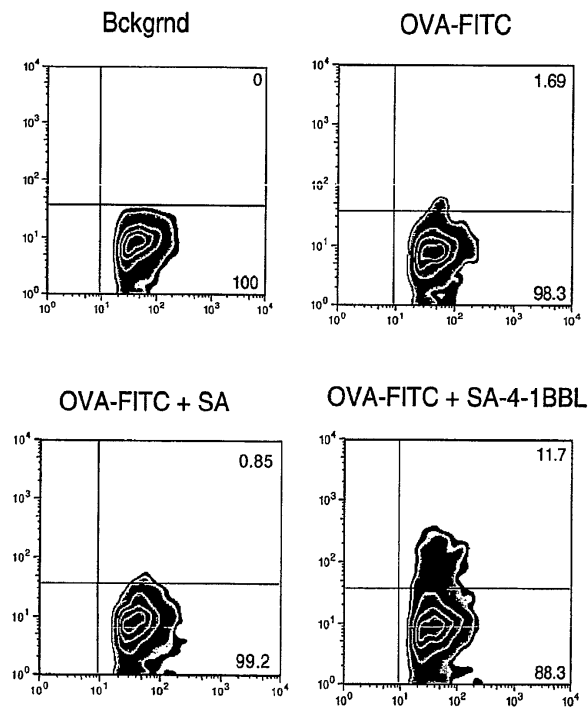
도면25



도면26



도면27



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH FOUNDATION, INC.

<120> IMMUNOSTIMULATORY COMPOSITIONS AND METHODS

<130> 060592-0139



<140> PCT/US06/046662

<141> 2006-12-07

<150> 60/748,177

<151> 2005-12-08

<150> 60/771,179

<151> 2006-02-06

<150> 60/799,643

<151> 2006-05-12

<150> 60/863,173

<151> 2006-10-27

<160> 22

<170> Patent In Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide construct

<400> 1

accctgtgt aaagccgct ttccaaatg tataaaaccg agagcatctg gccaatgtgc 60  
atcagttgtg gtcagcagca aaatcaagt aatcatctca gtgcaactaa aggggggatc 120  
cgatctcaat atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gccittgttg gcctctcgt 180  
cgggagatct catcatcacc atcaccatat caccggcacc tggtaacaacc agctcggctc 240  
gaccttcate gtgaccgctg gcgccgatgg cgcctgacc ggaacctacg agtcggcctg 300  
cggcaacgcc gagagccgt acgtcctgac cggtcgttac gacagcgcgc cggccaccga 360  
cggcagcggc accgccctcg gttggacggt ggcttgaag aataactacc  
gcaacgcca 420  
ctccgcgacc acgtggagcg gccagtacgt cggcggcgcc gaggcgagga tcaacacca 480  
gtggctgctg acctccggcg ccaccgagcg caacgcctgg aagtccacgc tggcggcca 540  
cgacaccttc accaaggtga agccgtccgc cgcctcaagc gaattccaac gatctacca 600  
ggccaacca gcagcacatc ttacaggagc caacgccagc ttgataggtg ttggtggacc 660  
tctgttatgg gagacacgac ttggcctggc cttcttgagg ggcttgacgt atcatgatgg 720  
ggccctgggt accatggagc ccggttacta ctatgtgtac tccaaagtgc agctgagcgg 780  
cgtgggctgc ccccaggggc tggccaatgg cctcccacatc  
acccatggac tatacaagcg 840  
cacatcccgc taccgaagg agttagaact gctggtcagt cggcggctcac cctgtggccg 900

ggccaacagc tcccagatct ggtgggacag cagcttcctg ggcggcgtgg tacatctgga 960  
 ggctggggaa gaggtggtgg tccgcgtgcc tggaaaccgc ctggtcagac cacgtgacgg 1020  
 caccaggtcc tatttcggag ctttcatggt ctgaaggctg cggtgacaat gtattttgtg 1080  
 gagggacctc tccaggactc accctcgagt ctagagggcc cttcgaaggt aagcctatec 1140  
 ctaacctctc cctcggcttc gattctacgc gtaccggtca tcatcacat caccattgag 1200  
 tttaaaccgc ctg 1213

<210> 2  
 <211> 307  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic fusion protein

<400> 2  
 Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Ser His His His His His His Ile Thr Gly Thr Trp Tyr  
 20 25 30

Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala  
 35 40 45

Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr  
 50 55 60

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

Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala  
 85 90 95

His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala  
 100 105 110

Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ala Asn  
 115 120 125

Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys

130 135 140

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Glu Phe Gln Arg Ser His Gln Ala Asn Pro  
 145 150 155 160

Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ala Ser Leu Ile Gly Ile Gly Gly  
 165 170 175

Pro Leu Leu Trp Glu Thr Arg Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu  
 180 185 190

Thr Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Thr Met Glu Pro Gly Tyr Tyr Tyr  
 195 200 205

Val Tyr Ser Lys Val Gln Leu Ser Gly Val Gly Cys Pro Gln Gly Leu  
 210 215 220

Ala Asn Gly Leu Pro Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Ser Arg  
 225 230 235 240

Tyr Pro Lys Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Arg Arg Ser Pro Cys Gly  
 245 250 255

Arg Ala Asn Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly  
 260 265 270

Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val Arg Val Pro Gly  
 275 280 285

Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala  
 290 295 300

Phe Met Val  
 305

<210> 3

<211> 1268

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide construct

<400> 3

```

catctccagt gcaactaaag gggggatccg atctcaatat gaagtatgc atattactgg 60
ccgtcgtggc ctttgttggc ctctcgctcg ggagatctat ccacgtgacc aaggaagtga 120
aagaagtggc aacgtgtgcc tgtggtcaca atgtttctgt tgaagagctg gcacaaactc 180
gcatctactg gcaaaaggag aagaaaatgg tctgactat gatgtctggg gacatgaata 240
tatggcccga gtacaagaac cggaccatct ttgatatcac taataacctc tccattgtga 300
tcctggctct gcgccatct gacgagggca catacgagtg tgttgttctg aagtatgaaa 360
aagacgcttt caagcgggaa cacctggctg aagtgacgtt atcagtcaaa
getgacttcc 420
ctacacctag tatatctgac tttgaaattc caacttetaa tattagaagg ataatttgc 480
caacctctgg aggttttcca gagcctcacc tctcctgggt ggaaaatgga gaagaattaa 540
atgccatcaa cacaaactgt tcccagaatc ctgaaactga gctctatgct gttagcagca 600
aactggattt caatatgaca accaaccaca gcttcatgtg tctcatcaag tatggacatt 660
taagagtgaa tcagaccttc aactggaata caaccaagca agagagatct catcatcacc 720
atcacatata caccggcacc tggtagaacc agctcggctc gaccttcatc gtgaccgcgg 780
gcgccgacgg cgcctgacc ggaacctacg agtcggcctg
cggcaacgcc gagagccgct 840
acgtcctgac cggtcgttac gacagcgccc cggccaccga cggcagcggc accgccctcg 900
gttggacggt ggcttgaag aataactacc gcaacgccca ctccgagacc acgtggagcg 960
gccagfacgt cggcggcgcc gaggcgagga tcaacaccca gtggtctgtg acctccggcg 1020
ccaccgagge caacgcctgg aagtccacgc tggtcggcca cgacacctc accaaggtga 1080
agccgtccgc cgcctcaagc cgaattctgc agatateccag cacagtggcg gccgctcgag 1140
tctagaggge ccttcgaagg taagectatc cctaaccctc tctcggctct cgattctacg 1200
cgtaccggtc atcateacca tcaccattga
gtttaaaccg gctgatcagc ctgactgtg 1260
ctttctaa 1268
    
```

<210> 4

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic fusion protein

<400> 4

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Ser Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr  
 20 25 30

Leu Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg  
 35 40 45



Ile Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly  
 50 55 60

Asp Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile  
 65 70 75 80

Thr Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu  
 85 90 95

Gly Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys  
 100 105 110

Arg Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro  
 115 120 125

Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg  
 130 135 140

Ile Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp  
 145 150 155 160

Leu Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln  
 165 170 175

Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn  
 180 185 190

Met Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu  
 195 200 205

Arg Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu Arg Ser  
 210 215 220

His His His His His Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly  
 225 230 235 240

Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr  
 245 250 255

Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly

260

265

270

Arg Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly  
 275 280 285

Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr  
 290 295 300

Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr  
 305 310 315 320

Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser  
 325 330 335

Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala  
 340 345 350

Ser Ser Arg Ile Leu Gln Ile Ser Ser Thr Val Ala Ala Ala Arg Val  
 355 360 365

<210> 5

<211> 1294

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide construct

<400> 5

ttcatgcaac taaagggggg atccgatctc aatatgaagt tatgcatatt actggccgtc 60  
 gtggcctttg ttggcctctc gtcggggaga tctcatcacc accatcacca tatcaccggc 120  
 acctggtaca accagctcgg ctcgaccttc atcgtgaccg cgggcccga tggcgcctg 180  
 accggaacct acgagtcggc cgtcggcaac gccgagagcc gctacgtcct gaccggtcgt 240  
 tacgacagcg ccccgccac cgacggcagc ggcaccgcc tgggttgac ggtggcctgg 300  
 aagaataact accgcaacgc ccactccgcg accacgtgga gcggccagta cgtcggcggc 360  
 gccgaggcga ggatcaaac ccagtggctg ttgacctcg gcgccaccga  
 ggccaacgcc 420  
 tggagtgcca cgtgggtcgg ccacgacacc ttcaccaagg tgaagccgtc cgccgcctca 480  
 agcgaattcc geaccgagcc tcggccagcg ctcaaatca ccacctgcc caacctgggt 540  
 acccgagaga ataatgcaga ccaggtcacc cctgtttccc acattggctg ccccaacct 600  
 acacaacagg gctctctgt gttcgccaag ctactggcta aaaaccaagc atcgttgtgc 660

aatacaactc tgaactggca cagccaagat ggagctggga gctcatacct atctcaaggt 720  
 ctgaggtacg aagaagacaa aaaggagttg gtggtagaca gteccgggct ctactacgta 780  
 tttttggaac tgaagctcag tccaacattc acaaacacag  
 gccacaaggt gcagggctgg 840  
 gtctctcttg ttttgaagc aaagcctcag gtagatgact ttgacaactt ggcctgaca 900  
 gtggaactgt tccttgctc catggagaac aagttagtgg accgttctg gactcaactg 960  
 ttgctcctga aggctggcca cgcctcagt gtgggtctga gggcttatct gcatggagcc 1020  
 caggatgcat acagagactg ggagctgtct tatcccaaca ccaccagctt tggactcttt 1080  
 cttgtgaaac ccgacaacc atgggaatga gaactatcct tcttgtgact cctagttgct 1140  
 aagtctctca gctgctatgc tcgagtctag agggcccttc gaaggtaagc ctatccctaa 1200  
 ccctctctc ggtctcgatt ctacgcgtac  
 cggatcatcat caccatcacc attgagttta 1260  
 aaccgctga tcagcctcga ctgtgccttt ctaa 1294

<210> 6  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 fusion protein

<400> 6  
 Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Ser His His His His His His Ile Thr Gly Thr Trp Tyr  
 20 25 30

Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala  
 35 40 45

Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr  
 50 55 60

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

Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala  
 85 90 95

His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala  
 100 105 110

Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ala Asn  
 115 120 125

Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys  
 130 135 140

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Glu Phe Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu  
 145 150 155 160

Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp  
 165 170 175

Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln  
 180 185 190

Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu  
 195 200 205

Cys Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser  
 210 215 220

Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val  
 225 230 235 240

Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser  
 245 250 255

Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu  
 260 265 270

Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu  
 275 280 285

Thr Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg  
 290 295 300

Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val  
 305 310 315 320

Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp

325

330

335

Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys  
 340 345 350

Pro Asp Asn Pro Trp Glu  
 355

<210> 7

<211> 1295

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide construct

<400> 7

```

ttcatgcaac taaagggggg atccgatctc aatatgaagt tatgcatatt actggccgtc 60
gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga tctcatcacc accatcacca taccaccggc 120
acctggtaca accagctcgg ctcgaccttc atcgtgaccg cgggcgccga tggcgcctg 180
accggaacct acgagtcggc cgtcggcaac gccgagagcc gctacgtcct gaccggtcgt 240
tacgacagcg ccccgccacc cgacggcagc ggcaccgcc tcggttggac ggtggcctgg 300
aagaataact accgcaacgc ccaactccgc accacgtgga gcggccagta cgtcggcggc 360
gccgaggcga ggatcaacac ccagtggctg ttgacctccg gcgccaccga
ggccaacgcc 420
tgggaagtcca cgtcggctcg ccacgacacc ttcaccaagg tgaagccgtc cgccgcctca 480
agcgaattcg cctgccctcg ggccgtgtcc ggggctcggc cctcgcccgg ctcccgggcc 540
agcccagac tccgcgaggg tcccagctt tcgcccagc atcccgccgg cctcttggac 600
ctgcggcagg gcatgtttgc gcagctgggt gcccaaatg ttctgctgat cgatgggcc 660
ctgagctggt acagtgacc aggcctggca ggcgtgtccc tgacgggggg cctgagctac 720
aaagaggaca cgaaggagct ggtgtggcc aaggctggag tctactatgt cttcttcaa 780
ctagagctgc ggcgcgtggt ggccggcgag ggctcaggct
ccgtttcact tgcgctgcac 840
ctgcagccac tgcgctctgc tgcctggggc gccgccttgg ctttgaccgt ggacctgcca 900
cccgcctcct ccgaggctcg gaactcggcc ttcggtttcc agggccgctt gctgacctg 960
agtgcgggcc agcgcctggg cgtccatctt cacactgagg ccagggcacg ccatgcctgg 1020
cagcttacc agggcgccac agtcttggga ctcttcggg tgacccccga aatcccagcc 1080
ggactccctt caccgaggtc ggaataacgc ccagcctggg tgcagcccac ctggacagag 1140
tccgaatcct actccatcct ctcgagteta gaggccctt cgaaggtaag cctatcccta 1200
accctcctct cgtctcgtat tctacgcgta
ccggtcatca tcaccatcac cattgagttt 1260
aaaccgctg atcagcctcg actgtgcctt tctaa 1295
    
```

<210> 8

<211> 357

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic fusion protein

<400> 8

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Ser His His His His His His Ile Thr Gly Thr Trp Tyr  
 20 25 30

Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala  
 35 40 45

Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr  
 50 55 60

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

Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala  
 85 90 95

His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala  
 100 105 110

Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ala Asn  
 115 120 125

Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys  
 130 135 140

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Glu Phe Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly  
 165 170 175

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

180                      185                      190  
 Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly  
          195                      200                      205  
 Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr  
          210                      215                      220  
 Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val  
                                  245                      250                      255  
 Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro  
                                  260                      265                      270  
 Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu  
                                  275                      280                      285  
 Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly  
          290                      295                      300  
 Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr  
                                  325                      330                      335  
 Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro  
                                  340                      345                      350  
 Ser Pro Arg Ser Glu  
                                  355

<210> 9

<211> 1334

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide construct

<400> 9

```

catctccagt gcaactaaag gggggatccg atctcaatat gaagttagtc atattactgg 60
ccgtcgtggc ctttgttggc ctctcgctcg ggagatctgc tcctctgaag attcaagctt 120
atitcaatga gactgcagac ctgccatgcc aatttgcaa ctctcaaac caaagcctga 180
gtgagctagt agtattttgg caggaccagg aaaacttggg tctgaatgag gtatacttag 240
gcaaagagaa atitgacagt gttcattcca agtatatggg cgcacaagt ttgtattcgg 300
acagttggac cctgagactt cacaatcttc agatcaagga caagggcttg tatcaatgta 360
tcatcatca caaaaagccc acaggaatga ttcgatcca ccagatgaat
tctgaactgt 420
cagtgttgc taacttcagt caacctgaaa tagtaccaat ttctaataa acagaaaatg 480
tgtacataaa ttgacctgc tcatctatac acggttacc agaacctaa agatgagtg 540
ttttgctaag aaccaagaat tcaactatcg agtatgatgg tattatgcag aaatctcaag 600
ataatgtcac agaactgtac gacgtttcca tcagcttgtc tgtttcatt cctgatgta 660
cgagcaatat gaccatcttc tgtattctgg aaactgaca gacgcggctt ttatcttcac 720
ctttctctat agagcttgag gaccctcagc ctccccaga ccacattct agatctcatc 780
atcacatca ccatatcacc ggcacctggt acaaccagct
cggtcgcacc ttcacgtga 840
ccgcgggcgc cgacggcgcc ctgaccggaa cctacgagtc ggccgtcggc aacgccgaga 900
gccgtactgt cctgaccggt cgttacgaca gcgccccggc caccgacggc agcggcaccg 960
ccctcggttg gacggtggcc tggagaata actaccgaa cgcccactcc gcgaccacgt 1020
ggagcggcca gtacgtcggc ggcgccgagg cgaggatcaa caccagtggt ctgttgacct 1080
ccggcgccac cgaggccaac gcctggaagt ccacgctggt cggccacgac accttcaaca 1140
aggtgaagcc gtccgccgc tcaagccgaa ttctgcagat atccagcaca gtggcggcgc 1200
ctcagtgcta gagggccctt cgaaggtaag
cctatcccta accctctct cggctctgat 1260
tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac cattgagttt aaaccgctg atcagcctcg 1320
actgtgcttt ctaa 1334

```

<210> 10

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic fusion protein

<400> 10

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Ser Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr  
 20 25 30

Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser

35 40 45  
Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu  
50 55 60  
Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met  
65 70 75 80  
Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn  
85 90 95  
Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys  
100 105 110  
Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser  
115 120 125  
Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile  
130 135 140  
Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr  
145 150 155 160  
Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr  
165 170 175  
Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu  
180 185 190  
Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr  
195 200 205  
Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu  
210 215 220  
Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro  
225 230 235 240  
Asp His Ile Pro Arg Ser His His His His His His Ile Thr Gly Thr  
245 250 255

Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp  
 260 265 270

Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser  
 275 280 285

Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly  
 290 295 300

Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg  
 305 310 315 320

Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala  
 325 330 335

Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ala Thr Glu  
 340 345 350

Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys  
 355 360 365

Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ser  
 370 375

<210> 11  
 <211> 158  
 <212> PRT  
 <213> Human papillomavirus

<400> 11  
 Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro  
 1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp  
 20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu  
 35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly  
 50 55 60



Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu  
 85 90 95

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn  
 100 105 110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys  
 115 120 125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met  
 130 135 140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu  
 145 150 155

<210> 12

<211> 151

<212> PRT

<213> Human papillomavirus

<400> 12

Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Thr Lys Leu Pro Asp Leu Cys  
 1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr  
 20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg  
 35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp  
 50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys  
 65 70 75 80

Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu

85

90

95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys Pro  
 100 105 110

Asp Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile  
 115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg  
 130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu  
 145 150

<210> 13

<211> 98

<212> PRT

<213> Human papillomavirus

<400> 13

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln  
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser  
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp  
 35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr  
 50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu  
 65 70 75 80

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

Lys Pro

<210> 14  
 <211> 1303  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 nucleotide construct

<400> 14  
 ccgatctcaa tatgaagtta tgcattatc tggccctcgt ggcctttggt ggccctctcg 60  
 tcgggagatc tcatcatcac catcaccata tcaccggcac ctggtacaac cagctcggct 120  
 cgaccttcat cgtgaccgcg ggcgccgatg gcgccctgac cggaacctac gagtcggcgg 180  
 tcggcaacgc cgagagccgc tacgtcctga ccggctgtta cgacagcgcc cggccaccg 240  
 acggcagcgg caccgcctc ggttggacgg tggcctgga gaataactac cgcaacgccc 300  
 actccgcgac cactgggagc ggccagtacg tcggcggcgc cgaggcgagg atcaacacc 360  
 agtggctgtt gacctcggc gccaccgagg ccaacgcctg gaagtccacg  
 ctggtcggcc 420  
 acgacacctt caccaaggctg aagccgtccg ccgctcaag cgaattcttg gacaagatag 480  
 aagatgaaag gaattctcat gaagatttg tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca 540  
 caggagaaag atccttatcc ttactgaact gtgaggagat taaaagccag ttggaaggct 600  
 ttgtgaagga tataatgtta acaaaagagg agacgaagaa agaaaacagc ttgaaatgc 660  
 aaaaaggatga tcagaatcct caaatgctgg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa 720  
 caacatctgt gttacagtgg gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtaa 780  
 ccctggaaaa tgggaaacag ctgaccgtta aaagacaagg  
 actctattat atctatgccc 840  
 aagtcacctt ctgttccaat cgggaagctt cgagtcaagc tccatttata gccagcctct 900  
 gcctaaagtc ccccggtaga ttcgagagaa tcttactcag agctgcaaat acccagctt 960  
 ccgcaaacc ttgcgggcaa caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag 1020  
 gtgcttcggt gtttgtcaat gtgactgac caagccaagt gagccatggc actggcttca 1080  
 cgtcctttgg ctactcaaa ctctgaacag tgtcaccttg caggagctct aagccgaatt 1140  
 ctgcagatat ccagcacagt ggcggccgct cgagtctaga gggcccttcg aaggtaagcc 1200  
 tatecctaac cctctctcg gtctcgattc  
 tacgcgtacc ggtcatcacc accatcacca 1260  
 ttgagtttaa acccgctgat cagcctcgac tgtgcctttc taa 1303

<210> 15  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 fusion protein

<400> 15  
 Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser

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

Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val  
 225 230 235 240

Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val  
 245 250 255

Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr  
 260 265 270

Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser  
 275 280 285

Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe  
 290 295 300

Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro  
 305 310 315 320

Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro  
 325 330 335

Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His  
 340 345 350

Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu  
 355 360

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

<210> 17



<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17  
Phe Glu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ser  
1 5 10

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18  
Leu Gln Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ser  
1 5 10

<210> 19  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6x His tag

<400> 19  
His His His His His His  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 20

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 21

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu  
1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
1 5