



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월24일
(11) 등록번호 10-2024066
(24) 등록일자 2019년09월17일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/28 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7016995</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년11월21일
심사청구일자 2016년10월13일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년06월20일</p> <p>(65) 공개번호 10-2014-0108235</p> <p>(43) 공개일자 2014년09월05일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/002876</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/076580
국제공개일자 2013년05월30일</p> <p>(30) 우선권주장
61/563,128 2011년11월23일 미국(US)
61/654,401 2012년06월01일 미국(US)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Molecular Immunology, Vol. 46, pp. 1718-1726 (2009.03.09.)
JP07285883 A*
Vaccine, Vol. 21, pp. 514-520 (2003.)
Molecular Immunology, Vol. 46, pp. 1718-1726(2009.03.09.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
비오벤 쓰리 리미티드
버뮤다 에이치엠 11 헤밀턴 처치 스트리트 2 클라렌던 하우스
찰튼 키이스 알란
영국 에이비25 3유엑스 애버딘 자메이카 스트리트 5
돈트 에릭
벨기에 비-9150 바젤 루펠몬데스트라트 166</p> <p>(72) 발명자
찰튼 키이스 알란
영국 에이비25 3유엑스 애버딘 자메이카 스트리트 5
돈트 에릭
벨기에 비-9150 바젤 루펠몬데스트라트 166</p> <p>(74) 대리인
하영욱</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 8 항

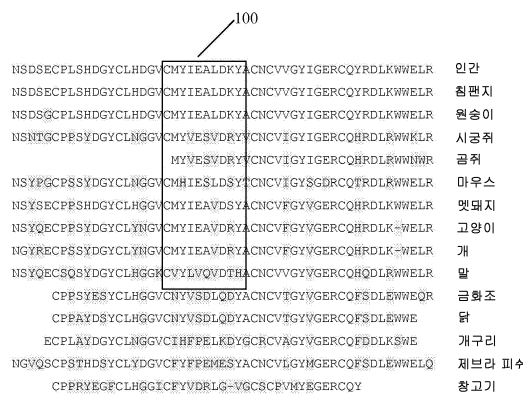
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 재조합 단백질 및 그들의 치료적 용도

(57) 요약

재조합 단백질을 생성하는 면역원성 발현물질 상에 또는 내에 하나 이상의 인간 성장 인자, 중앙 항원, 및/또는 그 수용체 또는 항원결정기를 발현하는 재조합 단백질. 상기 성장 인자, 중앙 항원, 및/또는 수용체, 시퀀스는 단일 발현 또는 적절한 내부 위치 또는 말단의 엔코딩 시퀀스 내에서 2개 이상의 텐덤 반복물질로서 발현될 수 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

콜레라 독소 B (CT-B) 또는 E. coli 열-불안정성 LT B (LT-B) 서브유닛을 포함하는 면역원성 폴리펩티드 시퀀스,

SSGGGSGG (서열번호 8), SSGGGGSGGG (서열번호 9), TSGGGSGG (서열번호 10), TSGGGGSGG (서열번호 11), SSGGGSGGSSG (서열번호 12), GGSGGTSGGGSG (서열번호 13), SGGTSGGGGSGG (서열번호 14), GGSGGTSGGGGSGG (서열번호 15), SSGGGGSGGGSSG (서열번호 16), SSGGGSGGSSGGG (서열번호 17), SSGGGGSGGGSSGGG (서열번호 18), 및 GGSGGTRPSTAATS (서열번호 19)로 이루어진 군에서 선택되는 펩티드 스페이서, 및

상피 성장 인자(EGF)의 중화 도메인을 발현하는 폴리펩티드 시퀀스를 포함하고,

상기 상피 성장 인자(EGF)는 인간 자기 단백질이고,

상기 폴리펩티드 시퀀스는, 상기 펩티드 스페이서에 의해 상기 면역원성 폴리펩티드 시퀀스로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 면역원성 폴리펩티드 시퀀스를 따라 수용체의 적어도 일부를 발현하는 시퀀스를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

IGF-1, IGF-2, FGF1, FGF2, TGF- α , TGF- β , VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF, NGF, EGF, HGF, BMP1~BMP6 및 IL1~IL6으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 성장 인자의 전장 또는 그 일부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 단백질 내에 존재하는 적어도 2개의 서로 다른 성장 인자의 전장 또는 중화 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 단백질 내에 단일 도메인 또는 2개 이상의 텀덤 반복물질로서 하나 이상의 성장 인자의 전장 또는 중화 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

하나 이상의 단일 1가의 멀티머를 함께 혼합하여 제 1 항에 기재된 재조합 단백질을 포함하는 다가의 백신을 조제하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 제제의 조제 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서,

상기 상피 성장 인자(EGF)의 상기 중화 도메인은 상피 성장 인자(EGF)의 B-루프를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 16

제 8 항에 있어서,

상기 적어도 2개의 서로 다른 성장 인자는 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1) 및 상피 성장 인자(EGF)인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 질환의 치료에 이용되는 재조합 단백질 분야에 관한 것이다.

[0002] (관련 출원의 상호참조)

본 출원은 미국 국내 단계 출원이고, 2012년 11월 21일자로 제출된 국제 출원 PCT/IB2012/002876에 대한 우선권을 주장하며, 본 명세서는 그 전체를 참조자료로서 포함한다.

[0003] 본 출원은 2011년 11월 23일자로 제출된 발명의 명칭 "면역 합성 재조합 단백질"의 미국 특허 출원 번호 제 61/563,128호 및 2012년 6월 1일자로 제출된 발명의 명칭 "면역 합성 재조합 단백질"의 미국 특허 출원 번호 제 61/654,401호에 대한 우선권을 주장하며, 본 명세서는 모두 그 전체를 참조문헌으로서 포함한다.

배경 기술

[0004] 암 면역학은 종양 또는 악성 종양 등의 암 세포와 면역 체계 사이의 상호작용에 관한 연구이다. 인간 종양에서는 발현되지만 정상 조직에서는 발현되지 않는 암 특이 항원의 인식 등의 면역 반응의 개시는 특히 흥미롭다. 통상, 악성 세포의 분열 및 증식을 제어하는 방법은 이들 항원을 분리하여 면역 체계에 의해 비자기 항원으로서 인식될 수 있도록 그것들을 제시함으로써 특정 면역 반응을 유도하는 것이다.

[0005] 현재, 규명된 성장 인자는 상당수 있지만, 대부분은 다른 질환 상태와 관련되어 있을뿐만 아니라 각종 암에 있어서의 세포 증식의 중요한 매개체인 것으로 보여진다. 통상, 성장 인자는 세포 표면에 위치한 성장 인자 수용체의 그룹에 의해 제한되어 인식되는 수용성 혈청 단백질이다. 특정 성장 인자는 하나의 수용체에 특이적이거나, 다양한 친화력으로 하나 이상의 관련된 수용체와 밀접하게 결합할 수 있다. 마찬가지로, 일부 수용체는 단일 성장 인자 리간드에만 결합하지만, 통상 다른 수용체는 다른 친화성을 갖는 복수의 관련된 성장 인자와 다시 결합할 수 있다. 자연 수용체와 결합시에 수용체의 세포질 도메인은 인산화되고, 이것이 하나 이상의 유전자의 전사 조절을 야기하여 궁극적으로는 세포 주기 및 세포 증식으로 확대되는 세포내 신호 전달 캐스케이드를 개시한다.

[0006] 성장 인자 및 그것의 수용체는 성장, 발달 및 수복의 통상의 방법의 필수 성분이며, 그것들의 조직 분포 프로파일 및 발현 레벨은 세포 성장을 밀접하게 조절한다. 다수의 연구는 성장 인자가 생체 외(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 모두 각종 세포 유형의 증식을 자극시킬 수 있는 것을 나타내고 있다(Cohen S., Carpenter G., PNAS USA 72, 1317, 1975, Witsch E 등: Physiology: 25(2):85-101, (2010)). 또한, 특정 성장 인자는 일부 암 세포주의 증식을 자극하는 것으로 나타났고, 예를 들면 상피 성장 인자(EGF)는 비소세포 폐암종 세포를 자극시킬 수 있다(Osborne C. K. 등. Can Res. 40, 2. 361(1980)). 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유 아세포 성장 인자(FGF) 및 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 등의 기타 성장 인자는 비소세포 폐암(NSCLC)(Ballas MS, Chachoua A., Onco Targets and Therapy: 4, 43-58(2011)), 전립선암(Cox ME 등; Prostate 69(1):33-40(2009)) 및 유방암(Law J 등, Cancer Res; 68,24: 10238-10346(2008)) 등의 각종 종양학적 질환에 중요하다.

[0007] 악성 세포에서는 높은 레벨의 각종 성장 인자 수용체가 보고되어 있다. 예를 들면, 상피 성장 인자 수용체(EGFR)는 폐, 유방, 방광, 난소, 외음부, 결장, 폐, 뇌 및 식도암 등의 상피 유래 악성 종양에서 비정상적으로 높은 레벨로 검출되었다. 종양 성장의 조절에 있어서, 성장 인자 및 그것의 수용체의 역할은 알려져 있지 않지만, 종양 세포에서의 성장 인자 수용체의 발현이 비정상적인 증식으로 이어지는 오토크라인 성장 촉진의 메커니즘을 제공하는 것이 제시되어 있다 (Schlessinger J., Schreiber A. B., Levi A., Liberman T., Yarden Y. Crit. Rev. Biochem. 1983, 14(2) 93-111). 또한, Liao Y 등; Hum Pathol 36(11): 1186-1196(2005) 및 Cox ME 등; Prostate: 69(1) 33-40 (2009)에는 전이성 전립선암에서 증가되는 성장 인자 및 섬 수용체의 역할에 대해서 기재되어 있다.

[0008] 암 치료에 있어서, 성장 인자 시그널링을 목적으로 하는 하나의 치료 전략은 관련된 특정 수용체/수용체에 대하여 단클론 항체를 이용하는 등의 수동적 면역 요법이 이용되고 있다. 이러한 연구는 리간드의 결합을 억제시킬 수 있는 수용체에 대한 항체의 특이적 인식이 악성 세포의 미토겐 자극에 미치는 영향을 억제시킬 수 있는 것이 설명되어 있다(SATO J. D., 등. Methods in Enzymology, vol.146 63-81쪽, 1987). 그러나, 통상 쥐 유래 항체는 항 인간-마우스 항체(HAMA)를 생성하여 단일 투여로 제한될 수 있다.

[0009] 다른 치료 전략은 종양에 대한 성장 인자의 증식 효과를 억제하는 분자에 대하여 면역 반응을 유도하는데 관여

하는 성장 인자를 함유하는 백신을 이용한 능동 면역 요법이 이용되고 있다. Davila 등의 발명의 명칭 Vaccine Composition Comprising Autologous Epidermal Growth Factor or a Fragment or a Derivative Thereof having Anti-tumor Activity and use Thereof in the Therapy of Malignant Diseases의 미국 특허 제5,984,018호는, 예를 들면 글루테르알데히드(gluterhaldehyde)를 이용하여 화학적으로 함께 접합되는 면역원성(즉, 비인간) 캐리어 단백질과 성장 인자의 혼합물을 함유하는 백신의 사용을 개시한다. 그러나, 임의의 특정 이론에 제한되는 일 없이, 화학적 접합이 백신에 대한 면역 반응을 저해하는 것으로 생각된다.

[0010] 이것은 호스트는 '자기 항원'에 대하여 면역 반응을 생성하지만, 척추 동물의 면역 체계는 이러한 반응이 발생되는 것을 방지하도록 진화되는 것이 요구되기 때문에 기술적으로 해결하기 어려운 과제이다. 강력한 면역 반응은, 예를 들면 T-헬퍼 세포 활성화를 포함하는 자기 항원에 대하여 생성되는 경우에 통상 자가 면역 질환 상태를 야기한다. 수 년 동안, 일부 자가 면역 장애, 예를 들면 루푸스, 다발성 경화증(MS), 당뇨병 등은 호스트 자기 항원결정기를 근사하게 모방하는 면역원성 항원결정기(T-세포 항원결정기)를 포함하는 환경 제제에 초기 노출됨으로써 야기될 수 있는 것으로 추정되고 있다. 이것은 호스트 항원결정기와 교차 반응하는 T-헬퍼 세포의 자극으로 이어질 수 있다. 따라서, 환경 제제에 대한 지속적인 노출은 항자기 면역 반응을 야기할 수 있다 (Albert, L.J., 및 Inman, R.D New England Journal of Medicine, Dec. 30th 2068-2074쪽, 1999). 실제로, 바이러스성 항원이 신경 세포 단백질에 대하여 항-자기 면역 반응을 일으킬 수 있는 것이 설명되어 있다(Levin, M.C. 등, Nature Medicine vol 8 (5) 509-513쪽, 2002).

[0011] Casimiro 등의 발명의 명칭 Method for Treatment of Malignant and Infectious Chronic Diseases의 미국 특허 공개 제2006/0251654호('654 발행)는 캐리어 단백질과 결합하는 악성 또는 전염성 만성 질환과 관련된 자기 항원을 함유하는 백신을 이용하여 피험자가 면역력을 갖게 하는 방법; 면역 조절제를 이용하여 피험자를 치료하는 방법; 및 스텝 1의 백신을 이용하여 피험자가 다시 면역력을 갖게 하는 방법, 및 알루미늄 히드록시드 및 몬타나이드 ISA 51(Seppic, Paris, France)에서 선택되는 적절한 보조제가 개시되어 있다. 불행하게도, 화학적 접합에 의한 백신의 조제는 면역 반응을 저해하는 것으로 생각된다.

[0012] 상술한 백신은 대부분 단백질 생성물의 균일성 및 상동성의 잠재적인 부족 및 제조 방법에서 주로 발생하는 한계치를 나타낸다. 통상, 상술의 백신은 재조합 캐리어 단백질 및 글루테르알데히드를 이용하여 화학적으로 접합되는 인간 유래의 폴리펩티드 혼합물을 포함한다. 불행하게도, 이 반응 시약은 각종 화학기 사이에 공유 가교 결합을 형성할 수 있어 바람직하지 않고, 통상은 매우 이질적인 생성물로 이어진다. 따라서, 얻어진 백신은 여러가지 수의 표적 인간 폴리펩티드(예를 들면, 0, 1, 2, 3 등)가 부착된 캐리어 단백질 분자뿐만 아니라, 다른 원자를 통해 각각 서로 다른 위치 및 다른 방향으로 캐리어와 부착될 수 있는 인간 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 표적 폴리펩티드 및 캐리어 단백질 분자는 그 자체로 접합되어 임상적 효능을 가질 수 없고, 항암 환자의 면역 반응에 기여할 수 없는 각종 호모 멀티머를 야기할 수 있다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 재조합 단백질 및 그것들의 각각의 제조 방법; 재조합 단백질의 특징 및 상기 재조합 단백질을 이용하여, 예를 들면 폐, 유방, 방광, 전립선, 난소, 외음부, 결장, 대장, 소장, 허파, 뇌, 식도, 기타 암 등의 만성 질환 및 기타 질환을 치료하는 치료 방법에 관한 것이다.

[0014] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은, 예를 들면 비브리오 콜레라의 콜레라 독소 B(CT-B) 단백질 또는 합성 등가물의 하나 이상의 시퀀스 및 인간 성장 인자의 하나 이상의 항원결정기의 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 물리적 구조로 접힌 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 면역원성 단백질 분자이다. 상기 성장 인자 또는 그 일부의 발현물질은 다중 부위에서 부위마다 단일 항원 및/또는 항원 분자의 장쇄로서 동시에 존재할 수 있다.

[0015] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은, 예를 들면 비브리오 콜레라의 콜레라 독소 B(CT-B) 단백질 또는 합성 등가물의 하나 이상의 시퀀스 및 하나 이상의 중양 항원 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 물리적 구조로 접힌 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 면역원성 단백질 분자이다. 또한, 상기 재조합 단백질은 하나 이상의 성장 인자 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스, 및/또는 하나 이상의 수용체 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함하여도 좋다.

[0016] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은, 예를 들면 비브리오 콜레라의 콜레라 독소 B(CT-B) 단백질 또는 합성 등가물의 하나 이상의 시퀀스 및 하나 이상의 수용체 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 물리적 구조로 접힌 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 면역원성 단백질 분자이다. 또한, 상기 재조합 단

백질은 하나 이상의 성장 인자 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스, 및/또는 하나 이상의 종양 항원 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함하여도 좋다.

- [0017] 이들 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 종양 항원 또는 그 일부, 수용체 또는 그 일부, 및/또는 성장 인자 또는 그 일부의 발현물질은 다중 부위에 단일 항원 또는 수용체 및/또는 부위마다 항원 또는 수용체 분자의 장쇄로서 동시에 존재할 수 있다.
- [0018] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 종양 항원의 시퀀스는 전립선 특이 항원(PSA) 또는 그 일부의 시퀀스를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 수용체의 시퀀스는 인간 상피 성장 인자 수용체 2(Her2)의 시퀀스 또는 그 일부 및/또는 인간 상피 성장 인자 수용체 3(Her3) 또는 그 일부를 포함할 수 있다.
- [0019] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 성장 인자의 시퀀스는 제조합 단백질 내의 하나 이상의 위치에 EGF의 중화 도메인을 포함하는 EGF의 적절한 코딩 영역의 실질적인 부분 또는 상피 성장 인자(EGF)의 시퀀스를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 성장 인자의 시퀀스는 하나 이상의 성장 인자의 전장 또는 그 일부, 및/또는 EGF, IGF-1, IGF-2, FGF, TGF- β , TGF- α , VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF, NGF, EGF, HGF, BMP1-BMP6 및 IL1-IL6을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 기타 성장 인자 등의 다른 자기 항원을 포함할 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 범위 내에서 성장 인자는 인간 및 비인간종에서 선택될 수 있는 것이 고려된다. 또한, 본 발명의 범위 내에서 상기 성장 인자의 시퀀스는 인간 또는 비인간 성장 인자 중 어느 하나와 실질적으로 유사할 수 있거나, 상기 시퀀스는 그 기능적 부분을 포함할 수 있는 것이 고려된다. 또한, 상기 제조합 단백질은 제조합 면역원성 단백질 시퀀스 내에서 성장 인자의 일부 또는 전부를 기능적으로 모형화 하는데 이용할 수 있는 다른 시퀀스의 하나 이상의 발현물질을 포함할 수 있다. 또한, 하나의 실시형태에 있어서, 부가적인 인접 잔기는 발현되거나 최소 시퀀스에 부가되어 분자의 전체 중화 도메인이 자연 형태로 제시되어 면역 체계의 세포와 액세스될 수 있게 한다.
- [0020] 본 발명의 문맥에 있어서, "중화 도메인"은 특이적 결합쌍, 예를 들면 성장 인자 및 그것의 관련 수용체 중 어느 하나 또는 양쪽의 하나의 영역 또는 영역으로서 규정되고, 여기서 상술된 영역과 특이적 결합쌍의 멤버가 아닌 제 3 분자의 결합은 특이적 결합쌍의 2개의 멤버의 후속 결합을 방지할 수 있다. 상기 제 3 분자는 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 단백질 분자 또는 작은 비단백질 분자일 수 있고, 또한 자연 유래 또는 합성 중 어느 하나이어도 좋다. 통상, 상기 중화 도메인은 결합시에 직접 접촉하는 특이적 결합쌍의 멤버의 영역을 포함하고, 또한 제 3 분자의 결합시에 충분한 입체 장애를 유도하여 상기 특이적 결합쌍의 멤버가 직접 결합되는 것을 방지하는 상기 영역의 안팎의 영역을 포함할 수 있다.
- [0021] 그것의 관련 수용체에 의한 리간드의 특이적 인식은 수용체의 결합 부위와 리간드의 특정 분자 시그니처(항원결정기) 사이의 상호작용에 의해 규정되는 기술분야에서 잘 확립되어 있다. 따라서, 상기 수용체 결합 부위와 결합하거나 반대로 차단되고, 또는 리간드의 인식 항원결정기와 결합하거나 반대로 차단되는 항체는 리간드-수용체 상호작용을 방지할 수 있다. 이러한 항체는 "중화"되는 것으로 설명된다. 본 발명의 맥락에 있어서, 중화 항체는 제조합 단백질의 투여시에 호스트에 의해 생성되는 것이 바람직하고, 따라서 상기 단백질 시퀀스는 수용체 결합에 요구되는 항원결정기가 기능적(원시) 형태로 제시되도록 성장 인자 또는 종양 항원으로부터 유래되는 적합한 시퀀스의 하나 이상 또는 전체를 발현 또는 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 물리적 부위마다 단일 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자 또는 그 일부, 및/또는 종양 항원, 수용체 및 성장 인자 시퀀스의 반복 쇄로서 제시되는 단일 종양 항원, 수용체 및/또는 성장인자의 다중 발현 복제물질(예를 들면, n=1 이상) 이외에, 본 발명에 따른 단백질은 제조합 단백질의 시퀀스 내의 서로 다른 위치에 단쇄 또는 쇄로서 존재하는 2개 이상의 서로 다른 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자의 하나 이상의 항원결정기 또는 결합 부위의 발현물질을 포함할 수 있다.
- [0023] 얻어진 단백질은 제조합 단백질의 시퀀스 내에서 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자 또는 하나 이상의 항원결정기를 발현하는 단일 폴리펩티드 또는 그 결합 부위이어도 좋다. 예시적인 실시형태에 있어서, 제조합 단백질의 시퀀스는 제조합 단백질의 표면 상에 CT-B 시퀀스의 하나 이상의 부분을 발현시키고, 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자 발현물질 또는 하나 이상의 항원결정기의 발현물질 또는 그 결합 부위를 자연 형태로 제시한다.
- [0024] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 단백질 제제를 조제하는 방법이 개시되어 있다. 이 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 방법은 1종 이상의 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자 또는 그 일부를 포함하는 제조합 단백질을 포함하는 다가의 백신을 조제하는 하나 이상의 단일 1가 또는 다가의 모노머를 조립하는 방법을 포함한다.

- [0025] 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 환자를 치료하는 방법이 개시되어 있다. 이 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 방법은 하나 이상의 1가 또는 다가의 백신, 하나의 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자, 합성 단백질을 백신 접종 당일 또는 백신 접종 기간에 격일 또는 여러 회에 나눠서 환자에게 투여하는 방법을 포함한다.
- [0026] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 환자를 치료하는 방법이 개시되어 있다. 이 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 방법은 하나 이상의 1가 또는 다가의 백신, 하나의 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자, 합성 단백질을 약학적으로 허용될 수 있는 보조제를 포함하는 캐리어로 환자에게 투여하여 면역 반응을 촉진하는 방법이 포함된다.
- [0027] 본 발명에 기재된 실시형태는 참조되는 도면의 그림으로 나타나고, 이것은 예시적인 것이고 제한적인 것을 의미하지 않으며, 참조부호는 유사한 부분 또는 해당하는 부분을 의미하는 것으로 한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 생물종의 범위에서 EGF 분자의 시퀀스 및 구조의 표를 나타내는 도면이다.
- 도 2는 EGF 중화 도메인을 포함하는 인간 EGF 분자의 구조의 실시형태를 나타내는 도면이다.
- 도 3은 EGF 중화 도메인을 포함하는 EGF 분자의 시스테인쌍의 단순화 라인 구조의 실시형태를 나타내는 도면이다.
- 도 4는 EGF 중화 도메인을 정확한 형태로 제시하는 EGF 분자의 최소 시퀀스의 실시형태를 나타내는 도면이다.
- 도 5는 EGF 중화 도메인을 발현하는 변형 합성 분자 구조의 실시형태를 나타내는 도면이다.
- 도 6은 rHuEGF와 결합하는 mAb10825 및 mAb10827에 대하여 450nm에서 흡광도(OD)를 측정된 막대 그래프를 나타내는 도면이다.
- 도 7은 rHuEGF와 결합하는 mAb10825 및 mAb10827과 중화 도메인으로부터 유래되는 유리 가용성 펩티드를 비교한 막대 그래프를 나타내는 도면이다.
- 도 8은 ELISA 플레이트로 직접 흡착되는 6 EGF-CT-B 합성 단백질과 항-EGF 중화 도메인 mAb10827의 결합의 막대 그래프를 나타내는 도면이다.
- 도 9는 항 래빗-CT-B 항체에 의해 캡처되는 6 EGF-CT-B 합성 단백질과 항-EGF 중화 도메인 mAb10827의 결합의 막대 그래프를 나타내는 도면이다.
- 도 10은 원시(비열수) 조건 하에서 SDS겔 상에 6 1가의 항체 EGF-CT-B 단백질을 전기영동하고, 항-CT-B 항체를 이용하여 검출하는 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.
- 도 11은 2 전장 EGF 시퀀스(E2) 또는 2개의 부분 EGF 시퀀스(B2) 중 어느 하나를 포함하는 합성 EGF-CT-B 단백질과 항-EGF 중화 도메인 mAb10827의 결합의 막대 그래프를 나타내는 도면이다.
- 도 12는 2가의 합성 EGF-CT-B 단백질을 비변성 SDS-PAGE겔 상에 전기영동하는 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.
- 도 13은 2개의 전장 EGF 시퀀스(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 14는 2개의 EGF 중화 도메인 시퀀스(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 15는 EGF 중화 도메인 Cys6-Cys31(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 EGF 분자의 2개의 부분 시퀀스를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 16은 원시 CT-B 단백질의 멀티머리제이션에 대한 pH 변화의 효과를 나타내는 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다. 상기 겔의 오른쪽 샘플은 겔 분석 전에 하기에 나타내는 pH에서 5분 동안 배양하였다. 왼쪽의 샘플은 하기에 나타내는 pH에서 5분 동안 배양하고, 이어서 겔 분석 전에 pH7.0까지 중화시켰다.
- 도 17은 EGF 및 CT-B를 발현시키는 시퀀스를 포함하는 구성체 T1-T6, E2 및 B2의 표를 나타내는 도면이다.
- 도 18은 E2 및 B2 구성체의 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.

- 도 19는 EGF 및 CT-B를 발현하는 시퀀스를 포함하는 구성체 E2, E2N 및 E2C를 나타내는 도면이다.
- 도 20은 EGF 및 CT-B를 발현하는 시퀀스 및 연장된 아미노산 링커를 함유하는 구성체를 나타내는 도면이다.
- 도 21은 E2, E2N 및 E2C 구성체의 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.
- 도 22는 연장된 아미노산 링커를 포함하는 다수의 N-말단 구성체의 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.
- 도 23은 연장된 아미노산 링커를 포함하는 다수의 C-말단 구성체의 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.
- 도 24는 IGF1(밀줄), EGF(밀줄 및 이탤릭체) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 25는 단일 재조합 단백질 상에 IGF, EGF 및 CTB 시퀀스가 동시에 존재하는 것을 설명하는 캡처 ELISA의 막대 그래프를 나타내는 도면이다. 막대 A 및 막대 B는 항-EGF 항체에 의해 캡처되고, 막대 C는 항-IGF에 의해 캡처되었다. 단백질은 다음과 같이 검출되었다; A 항-CTB, B 항-IGF 및 C 항-CTB.
- 도 26은 Hu-IGF1 시퀀스(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 27은 IGF-CTB 및 EGF-CTB의 헤테로올리고머가 검출되는 캡처 ELISA의 막대 그래프를 나타내는 도면이다. 샘플은 모두 CTB에 IGF C-말단을 포함한다. 샘플 A 및 샘플 B는 CTB에 EGF C-말단을 포함하고, 샘플 B 및 샘플 D는 CTB에 EGF N-말단을 포함한다. 샘플 A 및 샘플 B는 항-EGF 항체에 의해 캡처되어 IGF가 검출되는 한편, 샘플 C 및 샘플 D는 항-IGF 항체에 의해 캡처되어 EGF가 검출되었다.
- 도 28(a-e)은 a) TGF-베타1, b) FGF2, c) HGF(NK1), d) IGF 1/2 및 e) VEGF-A/C(VEGF-C 시퀀스(밀줄 및 이탤릭체))의 성장 인자 시퀀스(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 29는 CTB 시퀀스와 함께 하나 이상의 성장 인자로부터 유래되는 시퀀스를 포함하는 다양한 범위의 키메라 재조합 단백질의 캡처 ELISA의 막대 그래프를 나타내는 도면이다. 각각의 경우에 있어서, 재조합 단백질은 시퀀스 중 하나에 대해 특이적인 항체에 의해 캡처되고, 이어서 다른 시퀀스에 대해 특이적인 항체에 의해 다음과 같이 검출되었다.
- HGF 및 TGF B1은 α -HGF 및 α -TGF B1 항체에 의해 캡처되어 CTB가 검출되었다.
- FGF2는 α -CTB 항체에 의해 캡처되어 FGF2가 검출되었다.
- VEGF A/C는 (i) α -VEGF-A 항체 및 (ii) α -VEGF-C 항체에 의해 캡처되고, CTB는 양쪽의 경우에서 검출되었다.
- IGF1/2는 양쪽의 경우에서 α -IGF1에 의해 캡처되고, (i) α -CTB 항체 및 (ii) α -IGF2 항체에 의해 검출되었다.
- 도 30은 주로 펜타머의 재조합 단백질의 존재를 설명하는 도 28a에 따른 원시 재조합 TGF B1-CTB 단백질의 SDS-PAGE겔의 웨스턴 블롯을 나타내는 도면이다.
- 도 31은 a) TGF-B1 시퀀스(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스, 및 b) TGF-베타2 수용체 리간드 결합 도메인 시퀀스(밀줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타내는 도면이다.
- 도 32는 TGF-베타-R2 및 CTB 시퀀스를 모두 함유하는 재조합 단백질의 캡처 ELISA의 막대 그래프를 나타내는 도면이다. 상기 그래프는 양쪽의 시퀀스가 편향되지 않고 양쪽 방향으로 동시에 결합될 수 있는 것을 설명한다.
- 도 33은 TGF-베타 및 CTB로부터 유래되는 시퀀스를 함유하는 재조합 단백질이 TGF 베타 수용체 2 및 CTB의 리간드 결합 도메인으로부터 유래되는 시퀀스를 함유하는 재조합 단백질과 결합할 수 있는 것을 나타내는 도면이다.
- 도 34는 면역화 후, r-IGF에 대한 1/100 희석의 그룹 1 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.
- 도 35는 면역화 후, r-EGF에 대한 1/100 희석의 그룹 2 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.
- 도 36은 면역화 후, r-EGF에 대한 (a) 1/100 및 (b) 1/8 희석의 그룹 3 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.
- 도 37은 면역화 후, r-IGF에 대한 (a) 1/100 및 (b) 1/8 희석의 그룹 3 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내

는 도면이다.

도 38은 면역화 후, r-EGF에 대한 (a) 1/100 및 (b) 1/8 희석의 그룹 4 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.

도 39는 면역화 후, r-IGF에 대한 (a) 1/100 및 (b) 1/8 희석의 그룹 4 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.

도 40은 면역화 후, r-IGF에 대한 1/8 희석(1/100의 샘플 178 제외)의 그룹 5 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.

도 41은 면역화 후, a) r-IGF 및 b) rHu-EGF에 대한 1/100 희석의 그룹 6 마우스 혈청의 IgG 항체 반응을 나타내는 도면이다.

도 42는 모노-강글리오시드 GM1, 콜레라 독소 서브-유닛 B의 자연 결합 파트너의 구조를 나타내는 도면이다.

도 43은 고체 지지체(피어스)에 접합되는 시판의 D-갈락토오스의 구조를 나타내는 도면이다.

도 44는 CTB 발현 벡터에 의해 형질전환된 E. coli 세포의 3개의 균주의 배양 상등액(배지)으로부터 rCTB를 정제하는 SDS-PAGE겔을 나타내는 도면이다: 레인 1은 사이즈 마커를 나타낸다. 레인 2, 레인 5 및 레인 8은 원배양 상등액을 나타낸다. 레인 3, 레인 6 및 레인 9는 원주면세포질 분획을 나타낸다. 레인 4, 레인 7 및 레인 10은 용리된 정제 CTB를 나타낸다. 레인 11은 IMAC에 의해 정제된 히스티딘-태그 CTB를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 명세서에는 재조합 단백질 또는 백신에 대한 상세한 실시형태가 개시되어 있지만, 상기 개시된 실시형태는 단지 예시적인 것이고, 여러가지 형태로 실시될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 본 명세서에 개시된 특정 기능의 상세한 설명은 제한적으로 해석되는 것은 아니지만, 단지 청구 범위에 대한 기초자료 및 당업자를 이해시키기 위한 대표적인 기초자료로서 여기에 개시된 각종 재조합 단백질이 이용된다.

[0030] 본 발명은 면역원성 재조합 단백질의 구성요소로서 최대수의 성장 인자 항원결정기, 종양 항원 항원결정기 및/또는 수용체 결합 부위의 제시를 개선시키기 위해 동종의 재조합 단백질을 제공한다. 하나의 예시적인 실시형태에 있어서, 콜레라 독소 B(CT-B), 및 인간 상피 성장 인자(EGF), 종양 항원 및/또는 수용체의 전부 또는 일부를 발현하는 재조합 단백질이 개시되어 있다. 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 단백질은 공지의 면역원성 단백질을 기초로 하여 모형화하는 기타 면역원성 재조합 단백질을 발현할 수 있다. 이러한 재조합 단백질은 인간 면역 체계에 매우 면역원성이 있는 폴리펩티드의 발현물질일 수 있는 것이 본 발명의 범위 내에서 고려된다. 바람직하게는, 상기 재조합 단백질은 키메라 단백질에 부가적인 성질, 예를 들면 고발현 수율 및 제조의 용이성, 경구 안정성 및 장에서부터 혈류까지의 교차능, 및/또는 인체에서 검증된 안전한 사용성을 부여한다.

[0031] 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에 기재된 재조합 단백질은 총 분자량의 함수로서, 표적 자기 항원으로부터 유래되는 단백질 시퀀스를 고비율로 포함 또는 발현할 수 있다. 이것은, 예를 들면 다중 성장 인자 항원결정기를 함유하는 거대 단백질 모형을 이용함으로써 달성될 수 있다. 이들 성장 인자 항원결정기는 단일 성장 인자의 전부 또는 일부의 다중 복제물질, 또는 하나 이상의 서로 다른 성장 인자의 전부 또는 일부의 복제물질일 수 있다.

[0032] 본 발명에 따라서, 성장 인자 항원결정기의 발현물질은 실질적으로 자연 형태가 유지되도록 접혀져 상기 항원결정기에 대하여 강력한 호스트 면역 반응을 유도하는 방식으로 호스트 면역 체계의 성분에 제시될 수 있다. 재조합 단백질의 도메인을 지지하는 항원결정기를 모형화하는 적합한 자연 단백질 모형의 예로는 콜레라 독소 B 서브유닛, E. coli 열-불안정성 LT 및 LT-II 엔테로톡신 B 서브유닛, 베라톡신, 백일해 독소, 캄필로박터 제주니 엔테로톡신, 시가 독소, 리스테리아 독소, 파상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, 수막염균I 외막 단백질, 박테리오파지 외피 단백질, 아데노바이러스 및 기타 바이러스성 외피 단백질이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다. 또한, 상기 단백질의 비자기 성분은 감소될 수 있다. 최소한, 비자기 시퀀스는 약 9, 10, 11개 이상의 아미노산 길이를 포함하고, 적어도 하나의 인간 T-세포 항원결정기를 전부 또는 부분적으로 포함할 수 있다. 또한, 비자연 '합성' 폴리펩티드는 전체 단백질에 면역원성을 부여하는 요구를 충족시켜 상기 호스트 면역 체계에 성장 인자, 수용체, 종양 항원 또는 그 항원결정기를 적절하게 제시하게 하도록 이용될 수 있다.

[0033] 예시적인 실시형태에 있어서, 재조합 단백질의 도메인을 지지하는 항원결정기는 폴리펩티드 시퀀스가 자연 유래 인지 합성인지의 여부에 따라 적절한 화학적/환경적 조건 하에서 올리고머의 멀티머로 자기 조립되거나, 또는

다른 조건 하에서 모노머로 감소되는 능력을 가질 수 있다. 이상적으로는, 멀티머리제이션 도메인은 각각의 수의 서브유닛, 예를 들면 다이머, 트리머, 테트라머, 펜타머 등의 안정한 멀티머로 조립되어 균일한 사이즈의 생성물을 생성할 수 있다. 자연 폴리펩티드의 예로는 류신 지퍼, 락 리프레서 단백질, 스트렙트아비딘/아비딘, 콜레라 독소 B 서브유닛, 기타 AB₅ 독소의 B 서브유닛, 슈도모나스 트리머리제이션 도메인, 및 바이러스성 캡시드 단백질이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다.

- [0034] 본 발명에 따른 재조합 단백질은 성장 인자 또는 그 일부, 세포 내 수용체 또는 그 일부, 종양 항원 또는 그 일부인지의 여부는 만성 질환 또는 항암과 관련된 성장 인자 및 수용체에 대한 세포의 광범위한 경로, 또한 상기 합성 단백질 내에서 종양 항원이 가장 널리 이용될 수 있는 고품종 종양과 관련이 있다. 상기 단백질은 재조합 단백질의 형태이고, 예를 들면 유방, 폐, 방광, 난소, 외음부, 결장, 허파, 뇌, 대장, 소장, 머리 및 목, 및 식도암 등의 만성 질환을 치료하는데 유용할 수 있다. 상기 질환에 있어서, 서로 다른 종양 항원이 발현되어 다중 세포 내의 수용체 및 성장 인자가 과잉으로 발현될 수 있기 때문에, 후술하는 단백질은 상기 질환과 관련된 복수의 세포 내 경로에 대하여 하나 이상의 서로 다른 종양 항원, 하나 이상의 서로 다른 수용체 또는 성장 인자를 함유할 수 있다. 이들 단백질을 "다가"라고 부른다.
- [0035] 예시적인 실시형태에 있어서, 하나 이상의 상피 성장 인자(EGF) 중화 도메인을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 상기 단백질은 재조합 단백질의 형태이고, 만성 질환, 예를 들면 유방, 폐, 방광, 난소, 외음부, 결장, 허파, 뇌, 대장, 머리 및 목, 식도암을 치료하는데 유용할 수 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 EGF 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0036] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 섬유아세포 성장 인자(FGF)를 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 FGF 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0037] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 형질전환 성장 인자 베타 1(TGF-β 1)을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 하나의 예시적인 실시형태에 있어서, 단백질은 TGF-β 1 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0038] 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 형질전환 성장 인자-베타 1(TGF-β 1)을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 TGF-β 1 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0039] 하나의 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1)을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 IGF-1 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0040] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 간세포 성장 인자(HGF)를 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 HGF 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0041] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1) 및 하나의 인슐린 유사 성장 인자를 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 IGF-1 시퀀스, IGF-2 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0042] 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 하나의 혈관 내피 성장 인자-A(VEGF-A) 및 하나의 혈관 내피 성장 인자-C(VEGF-C)를 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 VEGF-A 중화 도메인 시퀀스, VEGF-C 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다.
- [0043] 발현 또는 포함되는 HuEGF의 적절한 코딩 영역을 결정하기 위하여, 생물종의 범위에서 EGF 분자의 시퀀스 및 구조가 분석된다. 생물종의 범위에서 EGF 분자의 시퀀스 및 구조를 나타내는 표를 도 1을 참조하여 설명한다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 박스(100)는 생물종의 범위에서 EGF 분자의 시퀀스의 일부를 포함하고, 상기 EGF 분자의 중화 도메인 항원결정기를 나타낸다. 서로 다른 종의 EGF 분자의 중화 도메인 항원결정기 사이에 현저한 보존량이 있는 한편, 종 사이에도 상당한 차이가 있다. 특히, 생체 내(in vivo) 연구에 있어서, 하나의 중화 도메인(박스 표시된 시퀀스(100))은 영양류에서는 완전히 보존되어 있지만, 설치류 및 다른 종에서는 차이가 있다. 마찬가지로, 상기 EGF 분자의 다른 시퀀스는 3차 구조의 차이와 동등하다.

- [0044] 예시적인 실시형태에 따라서, EGF 중화 도메인을 포함하는 인간 EGF 분자의 구조를 도 2를 참조하여 설명한다. 상기 EGF 분자는 Cys6, Cys14, Cys20, Cys31, Cys33 및 Cys42를 포함하는 6개의 시스테인 잔기를 함유한다. 상기 6개의 시스테인 잔기는 EGF 분자의 접힘을 결정하는데 중요하다. 상기 EGF 중화 도메인(200)(역평행 β-시트로서 도시함)은 두쌍의 분리 디설피드 연결 시스테인, Cys6-Cys20 및 Cys14-Cys31에 의해 구속되어 있다. 상기 두쌍의 디설피드 연결 시스테인, Cys6-Cys20 및 Cys14-Cys31은 이들 두쌍이 EGF 중화 도메인(200)을 정확한 형태로 제시하는 EGF 분자의 최소 시퀀스 또는 최소 펩티드를 규정하기 때문에 중요하다.
- [0045] 예시적인 실시형태에 따라서, EGF B-루프(200)를 포함하는 EGF 분자의 시스테인쌍의 단순화 라인 구조를 도 3을 참조하여 설명한다. 도 3에 나타난 바와 같이, Cys6은 Cys20에 연결되고, Cys14는 Cys31에 연결되고, Cys33은 Cys42에 연결되어 있다. 상기 EGF B-루프(200)는 Cys20과 Cys31 사이에 위치하고 있다. 따라서, 도 4에 나타난 바와 같이, EGF 중화 도메인(200)을 정확한 형태로 제시하는 EGF 분자의 최소 시퀀스 또는 최소 펩티드(400)는 Cys6-Cys31의 시퀀스이다.
- [0046] 예시적인 실시형태에 따라서, EGF 중화 도메인을 포함하는 EGF 분자의 적어도 일부를 발현하는 본 발명에 따른 변형 재조합 단백질 분자의 구조는 도 5를 참조하여 설명한다. 단일 변이 또는 변경은 EGF 분자의 Cys33이 Cys33을 Ala33으로 변경하는 변형 합성 분자를 생성하여 Cys33을 제거함으로써 모든 가능한 오접힘(mis-folding) 문제를 방지하게 한다.
- [0047] 알라닌은 기능적 특성의 측면에서 상당히 '중성'이고, 글리신으로부터 떨어져 가장 짧은 측쇄를 갖기 때문에 이용된다. 따라서, 알라닌은 변형 재조합 단백질에 임의의 비원시 특성을 부여할 가능성이 가장 작은 잔사로 간주된다. 잠재적으로는 임의의 다른 잔기가 사용될 수 있지만, 거의 변경시키지 않는 것이 본 발명의 범위 내에서 고려된다.
- [0048] 예시적인 실시형태에 있어서, EGF 분자의 일부는 Met21-Ala30 잔기로 규정되는 영역에서부터 전체 EGF 시퀀스까지 이용될 수 있다. 상기 재조합 EGF-CT-B 단백질의 발현에 선택되는 시퀀스는, 예를 들면 EGF 시퀀스 전체 및 상기 맥락에서 중화 도메인으로서 규정된 중화 도메인의 정확한 제시에 필요하다고 생각되는 영역을 각각 포함하고, 이것을 달성하기 위해 필요하다고 간주되지 않은 EGF의 다른 부분은 포함하지 않는다.
- [0049] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 혈관 내피 성장 인자-A(VEGF-A)의 중화 도메인을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 VEGF-A 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 VEGF-A 시퀀스는 성숙 단백질의 시퀀스 Cys57-Cys104를 포함하는 중화 도메인을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, VEGF-A의 시퀀스는 Val14 및 Lys108까지 연장된 하나 이상의 인접 잔기를 포함할 수 있다.
- [0050] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, TGF-베타 수용체II의 리간드 결합 도메인을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 TGFβ-RII 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다. 상기 TGFβ-RII 시퀀스는 Thr23과 Gln166 사이에 세포 외 도메인의 임의의 시퀀스를 포함할 수 있다.
- [0051] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, HGF 수용체(c-Met)의 리간드 결합 도메인을 발현하는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 단백질은 HGF 수용체 시퀀스 및 CT-B 시퀀스를 발현 또는 포함하는 재조합 단백질이다. 바람직하게는, 상기 HGF 수용체 시퀀스는 Lys27과 Leu515 사이에 세포 외 SEMA 도메인의 임의의 시퀀스를 포함할 수 있다.
- [0052] 실시예 I: ELISA 프로토콜
- [0053] 본 발명에 따른 EGF-CT-B 합성 단백질 등의 재조합 단백질이 정확한 형태로 EGF의 B-루프를 표시할 수 있는지의 여부를 결정하기 위하여, EGF 수용체와 EGF의 결합을 블로킹하는 것으로 알려져 있는 시판의 2종의 단일 클론 항체(Santa Cruz Antibodies, 카다로그 번호 10825 및 10827)를 입수하였다. 임의의 특정 이론에 제한되는 없이, 잔기 Met21-Ala30에 의해 규정된 영역을 통해 EGF 수용체와의 결합이 부분적으로 달성되는 것으로 다수의 소스에 의해 추정된다.
- [0054] 예시적인 실시형태에 있어서, ELISA에서 1μg/ml 및 2μg/ml 농도의 mAb10825 및 mAb10827이 재조합 EGF(rEGF) 단백질을 결합하는데 사용되었고, 흡광도(OD)는 450nm에서 측정되었다. 그 결과를 도 6을 참조하여 막대 그래프로 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, rEGF는 ELISA 플레이트로 흡착될 때에 자연 형태를 유지하고, mAb10825 또는 mAb10827 중 어느 하나가 1μg/ml이면 양호한 시그널을 얻기에 충분하다.

- [0055] 잔기 Met21-Ala30의 인식을 평가하기 위하여, 플레이트를 약 1 μ g/ml의 단백질(rEGF) 약 100 μ l/웰로 코팅하고, 약 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 상기 플레이트를 PBS-0.5% Tween(PBST) 약 200 μ l/웰로 2회 세정하고, 이어서 약 200 μ l PBS로 2회 세정하였다. 상기 플레이트를 PBS-2% 밀크 파우더(MPBS) 약 200 μ l/웰로 블로킹하고, 약 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 동안 배양하였다. 이어서, 상기와 같이 플레이트를 PBST로 2회 세정하고, PBS로 2회 세정하였다. 약 1 μ g/ml 또는 약 2 μ g/ml의 시험 항체 약 100 μ l를 첨가하고, 실온(RT) 부근에서 1시간 동안 배양하였다. 상술한 바와 같이, 플레이트를 다시 세정하였다. 두번째로, 약 1/1000 희석의 항체(HRP-labeled anti-mouse Fc-specific, Sigma product code A0168)를 약 100 μ l/웰로 첨가하고, 실온 부근에서 약 1시간 동안 배양하였다. 상기와 같이, 상기 플레이트를 다시 세정하고, 색이 현상될 때까지(통상, 약 5~10분) Sureblue TMB 기질 약 100 μ l/웰로 현상하였다. 1M H₂SO₄ 약 50 μ l/웰로 반응을 정지시키고, 플레이트를 450nm에서 판독하였다.
- [0056] 또한, 경쟁적 결합 ELISA를 행하였다. 2차 ELISA에 있어서, 각각의 mAb10825 및 mAb10827 항체와 rEGF의 결합은 목적의 항원결정기(펩티드 시퀀스 MYIEALDKYA) 또는 대조군의 비관여 펩티드(펩티드 시퀀스 SLAGSSGALSK)에 대응하는 유리 가용성 펩티드의 존재 하에서 평가되었다. 약 1 μ g/ml의 mAb 10825와 약 1 μ g/ml의 표적 항원결정기에 대응하는 유리 가용성 펩티드, 약 1 μ g/ml의 mAb 10827과 약 1 μ g/ml의 유리 가용성 펩티드 Met21-Ala30, 약 1 μ g/ml의 mAb 10825와 약 1 μ g/ml의 대조군의 비관여 펩티드, 및 약 1 μ g/ml의 mAb 10827과 약 1 μ g/ml의 대조군의 비관여 펩티드 약 100 μ l/웰을 이용한 ELISA를 행하였다.
- [0057] 흡광도(OD)를 450nm에서 측정하였다. 그 결과를 도 7을 참조하여 막대 그래프로 나타내었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 2개의 항체, mAb 10825 및 mAb10827 중에서 mAb10827 항체는 Met21-Ala30 중화 항원결정기와 결합하고, mAb10825 항체는 Met21-Ala30 중화 항원결정기와 결합하지 않는 것이 명백하다. 상기 mAb10825 항체는 잔기 Met21-Ala30에 의해 규정된 영역에 구조적으로 근사한 EGF 영역을 블로킹하여 수용체 결합을 입체적으로 방해함으로써 중화되는 것으로 추정된다. 따라서, 상기 mAb10827 항체는 원시 상태의 rEGF 중화 항원결정기 Met21-Ala30과 결합하여 합성 EGF-CT-B 백신 전구체의 하기 분석에 이용된다.
- [0058] 실시예 II: EGF 중화 항원결정기 제시
- [0059] CT-B 시퀀스의 말단에 EGF를 발현하는 재조합 단백질 EGF-CT-B 백신이 EGF 도메인의 임의의 바람직한 고유 특성에 방해가 되는지, 또는 영향을 미치는지의 여부, 구체적으로는 EGF Met21-Ala30 항원결정기의 정확한 구조적 제시 및 적절한 물리 화학적 조건 하에서 멀티머(헵타머)로 조립되는 CT-B 모노머의 능력을 결정하기 위하여, N(시험 1~시험 3) 또는 C-말단(시험 4~시험 6) 중 어느 하나의 CT-B 시퀀스 상에 전체 EGF 코딩 영역을 발현하는 6개의 재조합 단백질이 생성된다.
- [0060] 시험 1 및 시험 4는 CT-B 도메인 상에 직접 전장 EGF 시퀀스를 발현하는 재조합 단백질 EGF-CT-B 백신을 포함한다. 시험 2 및 시험 5는 짧은 3 아미노산 펩티드 시퀀스에 의해 CT-B 도메인으로부터 분리되는 전장 EGF 시퀀스를 발현하는 합성 EGF-CT-B 백신을 포함한다. N-말단에서 EGF 시퀀스를 발현하는 재조합 단백질 EGF-CT-B 백신은 3 아미노산 펩티드 시퀀스로서 SerGlyGly를 포함하고, KpnI 제한 부위를 포함한다. C-말단에서 EGF 시퀀스를 발현하는 재조합 단백질 EGF-CT-B 백신은 3 아미노산 펩티드 시퀀스로서 SerSerGly를 포함하고, XhoI 제한 부위를 포함한다.
- [0061] 시험 3 및 시험 6은 짧은 5 아미노산 펩티드 시퀀스에 의해 CT-B 도메인으로부터 분리되는 전장 EGF 시퀀스를 발현하는 재조합 단백질 EGF-CT-B를 포함한다. N-말단에서 EGF 시퀀스를 발현하는 재조합 단백질 EGF-CT-B는 5 아미노산 펩티드 시퀀스로서 GlyGlySerGlyGly를 포함하고, KpnI 제한 부위를 포함한다. C-말단에서 EGF 시퀀스를 발현하는 합성 EGF-CT-B는 5 아미노산 펩티드 시퀀스로서 SerSerGlyGlyGly를 포함하고, XhoI 제한 부위를 포함한다. 상기 짧은 3 및 5 아미노산 펩티드 시퀀스는 모두 CT-B 시퀀스로부터 성장 인자 도메인까지 거리를 제공하고, 또한 다른 하나에 대하여 하나의 도메인의 이동 자유도가 임의의 잠재적인 입체 장애를 감소시키게 한다.
- [0062] 6개의 재조합 단백질 EGF-CT-B는 각각 박테리아 발현 벡터(pIMS147)로 클로닝되고, 합성 재조합 EGF-CT-B 단백질은 E. coli의 주변세포질에서 발현되고, C-말단 6xHis 태그를 포함함으로써 정제될 수 있다. 재조합 EGF-CT-B의 시퀀스는 각각 발현, 정제되고, 단백질 겔/브래드포드 검정에 의해 정량되었다.
- [0063] 각각의 6개의 재조합 EGF-CT-B 단백질의 EGF 중화 항원결정기 Met21-Ala30의 제시는 ELISA에 의해 결정되었다. 하나의 말단 EGF 도메인을 포함하는 재조합 EGF-CT-B 단백질은 ELISA 플레이트 상에 고정되었다. 상기 EGF Met21-Ala30 항원결정기는 mAb 10827 항체(Santa Cruz)에 의해 검출되었다.
- [0064] 상기 ELISA 플레이트는 합성 EGF-CT-B 6-His 정제 단백질의 연속 2배 희석액으로 코팅되고, 약 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C

에서 배양되었다. 상술한 바와 같이, 상기 플레이트를 약 2% MPBS로 세정하여 블로킹하였다. 세정은 각 웰에 약 200 μ l PBS 또는 PBST를 피펫팅(pipetting)하고, 플레이트를 반전시켜 웰이 비워지도록 두드리고, 반복하는 것을 포함한다. 이어서, 약 1 μ g/ml의 mAb10827 항체를 모든 웰에 첨가하고, 실온 부근에서 약 1시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 한번 더 세정하고, 항 마우스 호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP)를 웰에 첨가하고, 약 1시간 동안 더 배양하였다. 상기 플레이트를 다시 세정하고, SureBlue TMB를 사용하여 현상하였다.

[0065] SureBlue TMB 기질을 첨가하면, 2차 항체와 효소적으로 접합되는 HRP는 청색 생성물을 수득하도록 기질을 처리한다. 상기 색 강도가 충분한 레벨에 도달한 것으로 판단될 때까지 반응을 관찰하고, 모니터링하였다. (1차 항체를 함유하지 않은 대조군 웰에서 색이 나타나기 시작하면, 이 시점에서 반응을 정지시킨다). HRP 활성을 파괴시키는 약 50 μ l H₂SO₄를 첨가함으로써 반응을 정지시킨다. 또한, 청색에서 황색으로 반응 생성물의 색이 변경된다. 이어서, 이것은 약 450nm의 흡광도에서 플레이트 판독기로 측정될 수 있다.

[0066] 상기 결합 ELISA의 결과는 도 8을 참조하여 막대 그래프로 나타낸다. 각 제제에서 EGF-Met21-Ala30 항원결정기가 원시 형태로 제시되어 면역 체계의 성분과 액세스될 수 있는 것을 설명하는 도 8에 나타낸 바와 같이, mAb10827 항체는 6개의 재조합 EGF-CT-B 6-His 정제 단백질과 모두 결합될 수 있었다.

[0067] 합성 재조합 EGF-CT-B 단백질이 EGF 도메인 및 CT-B 시퀀스의 발현물질을 포함하는 것을 확인하기 위하여, 도 9에 나타낸 바와 같이 2차 ELISA를 행함으로써 재조합 단백질이 플레이트 상에 직접 흡착되기 보다는 항 래빗-CT-B 항체(Antibodies On-Line)를 이용하여 캡처되었다. 이 '캡처' 항체는 원시 CT-B에 특이적이기 때문에, 상기 검정은 검출된 EGF 중화 도메인이 정확하게 접힌 CT-B 도메인을 포함하는 거대 재조합 단백질의 성분인 것을 설명한다.

[0068] 실시예 III: EGF-CT-B 단백질 멀티머 조립

[0069] 모노머의 서브유닛으로부터 멀티머의 조립에 있어서 CT-B 유래 재조합 단백질의 말단에 성장 인자를 포함하는 구조적 도메인의 발현 효과를 조사하기 위하여, 시험 1~시험 6의 합성 단백질이 원시 조건(비감압, 비열수) 하에서 SDS-PAGE겔 상에 전기영동되었다. 이어서, 상기 합성 재조합 EGF-CT-B 단백질이 전기 블롯팅에 의해 니트로셀룰로오스막으로 이동되고, 항 래빗-CT-B 항체(실시예 II에서 상술된 바와 같이)를 이용하여 탐침되었다. 2차 HRP-표지 항 래빗 항체의 결합은 오토라디오그래프 필름 상에서 ECL 기질을 이용하여 발광된 광에 의해 검출되었다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 웨스턴 블롯은 합성 EGF-CT-B 모노머 단백질이 CT-B 도메인을 통해 멀티머로 조립될 수 있는 것을 나타내는 고분자량 CT-B의 존재를 확인한다.

[0070] 별도의 실험에 있어서, 원시(비열수 또는 비감압) CT-B 단백질의 듀플리케이트 샘플을 pH1.0~7.0의 다른 pH값 범위에서 5분 동안 배양하였다. 배양 후, 각각의 듀플리케이트 샘플 중 하나를 1시간 동안 pH7.0으로 중성화시켰다. 이어서, 샘플을 모두 SDS-PAGE겔 상에 전기영동하고, 웨스턴 블롯하고, 단백질을 항-CTB 항체로 검출하였다(도 16). 이것은 i) CTB 펜타머는 5분 동안 pH 3.0 이하에서 모노머로 감소되고, ii) 중성 pH로의 복귀는 펜타머의 형성을 복원한다는 것을 설명한다. 종래, 적합한 링커(~16kDa의 분자량)를 통해 카멜리드 항체 결합 부위 및 태그에 융합되는 CT-B 단백질을 포함하는 키메라 단백질은 기능적으로 활성 펜타머를 형성하게 할 수 있다는 것이 설명되어 있다(Li 등, 2009 Molecular Immunology 46; 1718-1726).

[0071] 실시예 IV: 2가의 합성 EGF-CT-B 단백질

[0072] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 시험 2 및 시험 5에서 설명된 바와 같이 i) 3개의 아미노산 시퀀스에 의해 CT-B 유전자로부터 분리된 전장 EGF 유전자는 N- 및 C-말단 양쪽에서 발현되고(E2로 표시), 또는 상기와 같이 ii) Met21-Ala30 중화 항원결정기를 포함하는 절단 EGF가 CT-B 유전자의 말단 양쪽에서 발현되어(B2로 표시) 2개의 부가 합성 재조합 EGF-CT-B 단백질이 생성되었다. 상술한 바와 같이, 재조합 단백질은 모두 E. coli 발현 벡터 pIMS147로 클로닝되었다. 상술한 바와 같이, 재조합 EGF-CT-B 단백질은 모두 발현 및 정제되고, 정확하게 접힌 CT-B 도메인의 제시 및 EGF 중화 항원결정기 Met21-Ala30의 정확한 형태의 제시에 대하여 검정되었다. 그 결과를 도 11을 참조하여 막대 그래프로 나타내었다. 도 11에 나타낸 바와 같이, E2 및 B2 재조합 EGF-CT-B 단백질은 모두 CT-B 도메인 및 항체와 액세스할 수 있도록 표시되는 적어도 하나의 기능적으로 정확한 EGF Met21-Ala30 항원결정기를 모두 포함한다.

[0073] 또한, 분석은 먼저 샘플을 열수시키지 않고, pH7.0의 비변성 SDS-PAGE겔 상에 정제된 E2 및 B2 재조합 EGF-CT-B 단백질의 샘플을 전기영동시키고, 전기 이동을 통해 니트로셀룰로오스막으로 이동시키는 것을 포함한다. 상기 이동된 단백질은 AbOL(Antibodies On-Line) 항-CT-B 래빗 다클론 항체 및 HRP-표지 항-래빗 항체를 이용하여 검출되었다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 웨스턴 블롯은 CT-B 도메인 함유 재조합 단백질이 모두 모노머로서 존

재하고, 또한 다이머, 트리머, 테트라머 및 펜타머를 포함하는 일련의 올리고머의 멀티머로 형성되어 있는 것을 나타낸다.

- [0074] 실시예 V: EGF-CT-B 단백질 시퀀스
- [0075] 합성 재조합 EGF-CT-B 단백질 시퀀스의 하나의 실시예를 도 13에 나타낸다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 샘플 시퀀스는 2개의 전장 EGF 시퀀스(밑줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 합성 단백질 시퀀스를 나타낸다.
- [0076] 실시예 VI: EGF-CT-B 단백질 시퀀스
- [0077] 합성 재조합 EGF-CT-B 단백질의 시퀀스의 다른 실시예를 도 14에 나타낸다. 도 14에 나타낸 바와 같이, 샘플 시퀀스는 2개의 EGF 중화 도메인 시퀀스(밑줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 단백질 시퀀스를 나타낸다.
- [0078] 실시예 VII: EGF-CT-B 단백질 시퀀스
- [0079] 재조합 EGF-CT-B 단백질의 시퀀스의 또 다른 실시예를 도 15에 나타낸다. 도 15에 나타낸 바와 같이, 샘플 시퀀스는 EGF 중화 도메인을 포함하는 EGF 분자의 부분 시퀀스(Cys31-Cys6)(밑줄) 및 CT-B 시퀀스(이탤릭체)를 포함하는 단백질 시퀀스를 나타낸다.
- [0080] 실시예 VIII: 링커를 포함하는 EGF-CT-B 단백질 시퀀스
- [0081] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에는 하나 이상의 링커 또는 스페이서를 포함하는 부가 재조합 EGF-CT-B 단백질이 개시되어 있다. 상술의 하나 이상의 실시형태는 하나의 유전자가 바로 다음에 올 수 있도록 CT-B 중 하나 또는 양쪽 말단에 융합되는 EGF를 포함한다. 이들 얻어진 재조합 또는 키메라 단백질은 CT-B에 직접 융합되는 EGF를 포함하는 것이 필수적이다. 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 키메라 단백질의 EGF 및 CT-B 성분은 2개의 도메인 사이에 유연한 스페이서 또는 링커를 형성하는 3 또는 5 아미노산에 의해 효과적으로 분리되어 있다. 하기 링커로서 이용될 수 있는 아미노산은 SSG, SSGGG, SGG, GGSGG 및 GGGGS를 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0082] 상기 링커의 첨가는 입체 장애 등으로부터의 간섭을 감소시키고, CT-B 도메인에 의해 펜타머의 형성에 도움을 줄 수 있다. 또한, 상기 링커는 링커 내에 도입되는 독특한 제한 부위가 유전 구성체의 연속 조작용을 허용하는 것을 가능하게 한다. 이 실시예에 있어서, 도 17에 나타낸 표에 열거된 시퀀스를 갖는 8개의 구성체(T1-T6, E2 및 B2)가 기재되어 있다. 하나의 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 제한 부위는 다음을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다: Xho1, Kpn1, BspE1 및 Spe1.
- [0083] 상기 구성체 T1-T6, E2 및 B2의 웨스턴 블롯 분석을 행하였고, 도 18과 관련하여 후술한다. 도 18에 나타낸 바와 같이, 구성체 E2 및 B2의 웨스턴 블롯은 일부 간섭, 예를 들면 모노머, 다이머, 트리머 등의 각종 올리고머로 이루어지는 단백질 생성을 야기하는 입체 장애 및/또는 기타 간섭 등을 나타내고 있다. 또한, 샘플에 존재하는 단백질의 농도는 원시 CTB 펜타머리제이션에 의존적인 요소이기 때문에 올리고머리제이션에 영향을 미칠 수 있다.
- [0084] 가장 낮은 밴드는 모노머에 해당하고, 그 다음은 다이머 등이다. B2는 절단 EGF를 포함하기 때문에, B2가 웨스턴 블롯 상에서 보다 낮게 나타내어지는 것은 E2보다 작은 것이 명백하다.
- [0085] 올리고머의 수 및 비율은 구성되는 구성체에 따라 변경되지만, 유사한 결과가 구성체 T1-T6에 대해서도 발견된다. 초기에는, 아미노산 링커를 포함하는 N-말단에 EGF를 갖는 단백질이 펜타머를 높은 비율로 제공할 수 있는 것으로 보였다. 그러나, 이후에 펜타머의 비율은 배치에 따라 변경되는 것을 발견하였다.
- [0086] 초기에는 하나 또는 다른 말단의 융합이 펜타머리제이션을 선호하는 것으로 추정되었기 때문에, E2 구성체 이외에 2개의 텐덤 융합물질로 구성되어 있고, 도 19에 나타낸다. 제 1 텐덤 융합(E2N)은 CT-B의 N-말단에 2개의 연속 EGF를 포함한다. 여기서, L-3은 SGG이고, L-4는 GSSG이다. 제 2 융합(E2C)은 CT-B의 C-말단에 2개의 연속 EGF를 포함한다. 여기서, L-3은 SSG이고, L-5는 GGSGG이다.
- [0087] 예시적인 실시형태에 있어서, N-말단 및 C-말단에서의 아미노산 링커 길이는 각 말단의 아미노산 링커가 펜타머만을 획득하는지, 또는 N-말단 또는 C-말단의 하나의 말단의 아미노산 링커가 펜타머를 높은 비율로 획득하는지의 여부를 결정하기 위하여 연장되었다. 도 20을 참조하여, N-말단 또는 C-말단의 아미노산 링커는 각각 구성체 T2/3 및 T4/5를 이용하여 연장되었다. 상기 도시(도 20)는 C-말단 융합 E2C를 의미한다. 이 예시적인 실시예에 있어서, L3은 SSG이고, L5는 SSGGG이고, L8은 SSGGGSGG 이고, L10은 SSGGGSGGG이다. N-말단의 경우에 있어서, 삽입된 링커 스페이서는 약 7 및 9 잔기 길이이었다. 이 실시예에 있어서, 4 링커는 L3은 SGG이고, L5는 GGSGG

이고, L7은 TSGGGSG이고, L9는 TSGGGSGG일 수 있다. 링커-스페이서는 각각 보다 짧은 L3 및 L5 링커로 삽입될 수 있다. 그 결과, L7이 L5로 삽입되거나 L9가 L3으로 삽입된 것은 모두 12 잔기의 링커를 수득하지만, 이것들은 다른 시퀀스(이하, 'a' 및 'b'라고 칭함)를 가질 수 있다. 또한, 도 20에 나타낸 바와 같이 N-말단 링커는 10, 12 및 14 아미노산까지 연장되고, C-말단은 11, 13 및 15 아미노산까지 연장되었다. 이 예시적인 실시예에 있어서, L10은 SSGGGSGSSG이고, L12a는 GSGGTSGGGSG이고, L12b는 SGGTSGGGSGG이고, L14는 GSGGTSGGGSGG이다. 마찬가지로, L11은 SSGGGSGSSG이고, L13a는 SSGGGSGGGSSG이고, L13b는 SSGGGSGGSSGG이고, L15는 SSGGGSGGGSSGG이다.

[0088] 도 21을 참조하여, 상기 텐덤 EGF 융합물질, E2N 및 E2C의 웨스턴 블롯 분석은 본래의 2개의 구성체를 본래의 E2와 비교하여 E2 및 E2C가 모두 다수의 올리고머를 생성하는 것을 설명한다. 또한, E2N은 올리고머를 생성하지만, 제 1 EGF 도메인이 절단 단백질로서 발현되거나, 발현/정제시에 일부 단계에서 쪼개지는 것은 유력한 증거가 있다.

[0089] 또한, 비교 웨스턴 블롯 분석은 연장된 링커를 갖는 1개의 'T' 구성체 상에서 행해졌다(도 22에 나타냄). 상기 링커 연장물질이 T2 및 T3(각각 N-말단 3 aa 링커 및 N-말단 5 aa 링커)으로 이미 명명된 구성체에 도입되는 경우, T2SL(짧은 연장 링커, 즉 L10), T2LL(긴 링커, L12a), T3SL(짧은 링커, L12b) 및 T3LL(긴 링커, L14)가 얻어졌다. 마찬가지로, 상기 N-말단 T5 및 T6 구성체는 T5SL(L11을 가짐), T5LL(L13a를 가짐), T6SL(L13b를 가짐) 및 T6LL(L15를 가짐)이 된다.

[0090] 링커 스페이서가 삽입될 때에, 이들은 실제로 상당히 다른 시퀀스를 제공하는 2개의 방향 중 어느 하나로 클로닝된다. 가능하면, 충분한 클론이 소망하는 방향으로 삽입된 클론을 찾아내기 위해 시퀀싱되었다. T3LL-Rev의 경우에 있어서, 초기에는 바람직한 링커 길이(즉, 14 aa)를 갖지만, '틀린' 방향으로 삽입된 클론만 얻어진다. 적어도 물리적 스페이서로서 작동하는 한, 이들 링커의 정확한 시퀀스가 반드시 필요하지 않은 이유가 설명된다. 상기 T3LL-Rev의 실제 링커 시퀀스는 GSGGTGTRPSTAATS(밑줄=반전부)일 수 있다.

[0091] 도 22에 도시된 웨스턴 블롯에 나타낸 바와 같이, N 및 R은 각각 원시 및 감소/변성 단백질을 의미한다. 2개의 제 1 레인은 펜타머(원시) 및 모노머(감소)로서 야생형 CT-B를 나타낸다. 다른 레인에 나타낸 바와 같이, T3(5 아미노산 링커를 포함함)은 여러가지 사이즈의 소정 올리고머를 생성하지만, 더욱 긴 링커를 갖는 N-말단 구성체는 원시 조건 하에서 주로 펜타머를 생산하는 것을 알 수 있었다.

[0092] 한편, 도 23에 도시된 바와 같이, C-말단 구성체의 웨스턴 블롯은 연장된 링커를 갖는 원시 조건 하에서도 다중 밴드를 생성한다.

[0093] 이 데이터를 기초로 하여, CT-B와 EGF의 텐덤 N-말단 융합은 상당히 흥미로운 것으로 보인다. 또한, 제 1 링커(2개의 EGF 도메인 사이)는 상술의 E2N 구성체에 의한 절단/단백질분해를 방지하고, 다른 성장 인자를 도입할 때에 유연성을 허용하기 위하여 연장된다. 연장된 제 1 링커를 갖는 CT-B와 EGF의 N-말단 융합용 시퀀스는 다음과 같다:

[0094] HHHHHHIEGRNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGVI GERCQYRDLKWWELRGGSGGTSGGGSGGTPQNI TDLCAEY
HNTQIH TLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHDSQ KKAIERMKDTLRIAYL TEAKVEKLCVWNNKTPHAI AAI SMAN

[0095] EGF B-루프 항원결정기를 발현 또는 포함하는 동종의 재조합 단백질은 특정 실시형태와 관련하여 기재 및 도시되어 있지만, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나는 일 없이 많은 변경 및 수정이 당업자에게 명백할 수 있다.

[0096] 실시예 IX: 2중 특이적 IGF1-EGF-CTB 단백질(a)

[0097] 단일 합성 재조합 단백질을 갖는 하나 이상의 성장 인자를 목표로 한 실현가능성을 확립하기 위하여, 실시예 VIII에서 설명된 구성체 E2N으로 클로닝될 수 있도록 짧은 인접 영역을 포함하는 인간 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF1)을 엔코딩하는 유전자가 합성되었다. 즉, N-말단 EGF 유전자는 제한 엔도뉴클레아제 Nco1 및 Xho1로 DNA를 분해함으로써 벡터로부터 절단되었다. 이어서, 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 유사하게 분해된 인간 IGF1 유전자로 교체하였다. 얻어진 DNA 벡터는 재조합 단백질을 설계된 바와 같이 발현시키는 방법으로 필요로 하는 재조합 유전자가 엔코딩되는 것을 확인하기 위하여 시퀀싱되었다. 새로운 재조합 단백질의 시퀀스를 도 24에 나타낸다.

[0098] 이어서, 상술한 벡터의 발현에 의해 생성되는 단백질을 ELISA에 의해 분석하여 포유류의 면역 체계의 성분(즉, 항체)과 성장인자가 모두 동시에 표시될 수 있는 것을 설명하였다. 즉, ELISA 플레이트의 웰을 적절히 희석된 항-CTB 항체로 코팅하고, 이어서 상술한 바와 같이 2% 밀크 파우더를 함유하는 PBS로 블로킹하였다. 상기 제조

합 단백질의 샘플을 플레이트 상에 도포하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 이어서, 세정 후 설명된 바와 같이 준비된 다른 웰을 i) 항 마우스-EGF 항체 AbOL 10827 또는 ii) 항 래빗-인간 IGF1 2 α 항체 중 어느 하나의 1/1000(제조사의 권장사항에 따라)과 함께 배양하였다. 세정 후, 웰을 i) HRP-표지 항 마우스 항체 또는 ii) HRP-표지 항 래빗 항체와 함께 배양하고, 상술한 바와 같이 현상하였다. 도 25에 나타난 바와 같이, 생성된 시그널은 IGF 및 EGF가 모두 원시 배양로 표시되어 있는 것을 확인하였다. 또한, 항-IGF 항체에 의해 생성된 시그널은 IGF, EGF 및 CTB 시퀀스가 발현 벡터의 엔코딩 DNA 시퀀스의 상대적인 위치로 인해 동일한 분자 내에 존재하는 것을 확인하였다.

[0099]

실시예 X: 2중 특이적 IGF1-EGF-CTB 단백질(b)

[0100]

2중 특이적 재조합 단백질이 CBT의 자연 특징을 이용하여 생성되어 올리고머를 형성할 수 있는 것을 설명하기 위하여, 실시예 IX에서 설명된 IGF 유전자를 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용한 PCR에 의해 조작함으로써 EGF 유전자가 교체된 T5 구성체로 클로닝되도록 하였다. 얻어진 재조합 단백질은 CTB 시퀀스에 IGF 시퀀스 C-말단이 포함되고, 3 아미노산 링커에 의해 분리되었다(도 26).

[0101]

상기 재조합 단백질의 샘플은 동일한 (물)량의 i) T2 단백질 및 ii) T5 단백질과 각각 결합되었다. 상기 혼합물은 각각 필요에 따라서 완충된 10mM Tris-HCL를 첨가함으로써 pH3.0으로 조정되었고, 15분 동안 4°C에서 배양하여 임의로 존재하는 올리고머를 분리시켰다. 이어서, 상기 단백질 혼합물을 중화하고, 올리고머리제이션을 촉진하기 위하여 60분 동안 연속 배양하였다. 헤테로-올리고머의 존재를 검출하기 위하여, ELISA 플레이트의 웰은 항 마우스-EGF 항체 또는 항 래빗-IGF 항체 중 어느 하나로 도포되어 블로킹되었다. 세정 후, IGF-CTB/T2 믹스 및 IGF-CTB/T5 믹스를 항-EGF 항체 또는 항-IGF 항체로 도포된 웰에 각각 도포하고, 실온에서 60분 동안 배양하였다.

[0102]

세정 후, 도포되는 항체에 의해 표적되지 않는 성장 인자에 특이적인 항체를 첨가하고, 60분 동안 배양하였다. 따라서, 항 래빗-IGF 항체가 항 마우스-EGF 항체로 도포된 웰에 도포되었고, 그 반대도 동일하게 행해졌다. 결합되지 않는 2 α 항체를 세정하여 제거한 후, HRP-표지 항-마우스 또는 HRP-표지 항-래빗 항체는 2 α 항체를 표적하기 위해 적절하게 도포하였다. 그 결과를 도 27에 나타내고, 항-EGF 도포 항체가 캡처되고, IGF 시퀀스를 함유하는 단백질이 고정될 수 있는 것이 설명되었다. 마찬가지로, 항-IGF 항체가 캡처되어 EGF 시퀀스를 포함하는 단백질을 고정시킬 수 있다. 양쪽의 경우에 있어서, 이것은 양쪽 모두에 존재하는 모노머를 함유하는 IGF 및 EGF의 올리고머리제이션에 의해 야기된다. 또한, 헤테로-올리고머는 성장 인자가 모두 CTB 성분(즉, IGF-CTB 및 T2)의 반대측 말단에 위치하는 경우, 및 성장 인자가 모두 동일한 (C) 말단(즉, IGF-CTB 및 T5) 상에 있는 경우에 형성될 수 있다. 또한, 상기 검정은 다른 방향으로도 행해진다.

[0103]

실시예 XI: 다양한 성장 인자 제시

[0104]

본 발명의 유연성을 더 설명하기 위하여, 하나 이상의 성장 인자 범위로부터 유래되는 부가 시퀀스와 함께 CBT로부터 유래되는 시퀀스를 포함하고, 종래 기술에서 행해진 것으로 알려진 표준법을 이용하여 도 28에 따른 여러가지 사이즈의 도메인 범위를 나타내는 재조합 단백질 패널을 생성하였다. 상기 단백질의 샘플은 각각 E. coli의 유전 구성체의 발현에 의해 조제되고, 각 단백질의 핵사-히스티딘 태그 N-말단을 통해 IMAC를 이용하여 정제되었다. 정제된 재조합 단백질은 ELISA에 의해 검정되어 서로 다른 각각의 시퀀스가 존재하고, 각 시퀀스에 대하여 특이적인 항체를 이용하여 정확하게 표시되는 것을 설명하였다(도 29). 원시 단백질은 mTGF B1 및 CTB로부터 유래되는 시퀀스를 포함하는 재조합 단백질의 샘플 및 웨스턴 블롯 준비에 이용되었다(도 30). 단백질은 α -CTB 항체에 의해 검출되고, 재조합 키메라 단백질이 이용되는 조건 하에서 CTB의 특성을 유지하는 안정한 펜타머를 형성할 수 있는 것으로 나타났다.

[0105]

실시예 XII: 성장 인자 수용체 제시

[0106]

본 발명에서 기재된 방법이 성장 인자 이외의 단백질의 기능 표시에 적용될 수 있다는 것을 설명하기 위하여, 성장 인자 수용체 및 CTB로부터 유래되는 시퀀스를 포함하는 재조합 단백질이 생성되었고, 이러한 시퀀스는 CTB 시퀀스와 접합하여 자연 형태로 존재하는 것으로 나타났다. 인간 TGF-베타1의 단백질 시퀀스를 엔코딩하는 DNA는 종래 기술에서 행해진 것으로 알려진 표준법을 이용하여 DNA를 코딩하는 EGF를 T3LL 클론으로 교체함으로써 CTB 유전자의 상부를 클로닝하였다. 이 구성체는 인간 TGF-베타1 및 CTB 시퀀스를 모두 포함하는 재조합 단백질을 생성하는데 이용되었다(도 31a). 마찬가지로, 인간 TGF 베타 수용체 2의 세포 외 리간드 결합 도메인 및 CTB의 시퀀스를 포함하는 제 2 재조합 단백질이 생성되었다(도 31b).

[0107]

단일 재조합 단백질에 대하여 TGF-베타 R2 및 CTB 시퀀스를 동시에 제시하는 것은 캡처 ELISA에 의해 확립되었

다. 즉, ELISA 플레이트의 웰을 i) 항 마우스-CTB 항체 또는 ii) 항 고트-TGF 베타 R2 항체로 도포하고, 밀크 파우더를 함유하는 PBS로 블로킹하였다. 이어서, 도 31b에 따른 재조합 단백질의 샘플을 웰과 접촉시키고, 약 1시간 동안 배양하였다. 세정 후, 웰을 각각 i) 항 고트-TGF 베타 R2 항체 또는 ii) 항 마우스-CTB 항체와 접촉시키고, 1시간 동안 배양하였다. 세정 후, 웰을 각각 i) HRP-표지 항-쉬프(고트) 항체 및 ii) HRP-표지 항-마우스 항체와 접촉시키고, 1시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 TMB 기질을 이용하여 현상하고, 색 강도를 450nm에서 측정하였다. 상기 검정은 TGF-베타 R2 및 CTB 시퀀스가 모두 동일한 키메라 재조합 단백질에 존재하는 것을 설명하였다(도 32).

[0108] TGF-베타1 및 TGF 베타 R2가 모두 원시 배열의 CTB 시퀀스로 각각 존재하는 것을 설명하기 위하여, TGF 베타1과 그 자연 수용체 사이의 상호작용을 ELISA에 의해 결정하였다. 즉, ELISA 플레이트의 웰을 항 마우스-CTB 항체로 도포하여 블로킹하였다. 이어서, 상기 웰을 도 31a에 나타난 인간 TGF-베타1 및 CTB 시퀀스를 함유하는 재조합 단백질과 접촉시키고, 1시간 동안 배양하였다. 세정 후, 상기 웰을 도 31b에 나타난 인간 TGF-베타R2 및 CTB 시퀀스를 함유하는 재조합 단백질과 접촉시키고, 1시간 동안 배양하였다. 상기 웰을 세정하고, 이어서 항 고트-TGF 베타 R2 항체와 1시간 동안 접촉시켰다. 최종적으로 웰을 세정하고, HRP-표지 항-쉬프(고트) 항체와 약 1시간 동안 접촉시켰다. 상기 플레이트를 TMB 기질로 현상하고, 450nm에서 판독하였다. 도 33은 2개의 재조합 단백질은 상호작용에 의해 결합되는 자연 수용체-리간드를 재생성할 수 있고, 검정에 이용되는 항-수용체 항체에 의해 방해되지 않는 것을 나타낸다.

[0109] 실시예 XIII: 재조합 단백질 제제에 대한 마우스의 면역 반응

[0110] 상기 마우스의 면역 반응에 대한 각종 제제의 효과를 평가하기 위하여, 본 발명에 따른 CBT 및 하나 이상의 성장 인자의 시퀀스를 포함하는 재조합 단백질을 다른 실험군의 마우스에 면역 접종하였다. 각각 6마리의 마우스를 포함하는 6개의 마우스 그룹은 후술하는 스케줄에 따라서 서로 다른 재조합 단백질 제제로 면역 화되었다.

[0111] 특별히 명시하지 않는 한, 마우스는 완충액 75 μ l과 몬타나이드 보조제 75 μ l로 유화시킨 재조합 단백질 25 μ g으로 면역화하였다. 면역원은 0일 및 14일째에 근육주사를 통해 투여하였다. 혈청 샘플은 0일 및 28일째에 채취하고, 접종되는 재조합 단백질 내에 함유된 성장 인자 시퀀스에 대한 IgG 항체의 존재를 분석하였다. 상기 마우스군은 하기 항원으로 면역화되었다.

[0112] 그룹 1: SB1, 도 26에 따른 인간 IGF 및 CTB 시퀀스를 포함하는 몬타나이드 75 μ l로 유화된 재조합 단백질 75 μ l (25 μ g)

[0113] 그룹 2: SB2, 실시예 VIII에 기재된 T3LL로 불리는 인간 EGF 및 CTB 시퀀스를 포함하는 몬타나이드 75 μ l로 유화된 재조합 단백질 75 μ l(25 μ g)

[0114] 그룹 3: SB3, 실시예 IX에 기재되고, 도 24에 따른 IGF, 인간 EGF 및 CTB 시퀀스를 포함하는 몬타나이드 75 μ l로 유화된 재조합 단백질 75 μ l (25 μ g)

[0115] 그룹 4: SB4, IGF-CTB 및 EGF-CTB를 모두 함유하는 올리고머를 포함하고, 실시예 X에 기재된 방법에 의해 결합되는 몬타나이드 75 μ l로 유화된 SB1 37.5 μ l(12.5 μ g) 및 SB2 37.5 μ l(12.5 μ g)

[0116] 그룹 5: SB5, Matrix-M 보조제 20 μ l로 유화된 것을 제외하고 그룹 1과 마찬가지로 SB1 75 μ l(25 μ g)

[0117] 그룹 6: SB6, 몬타나이드 37.5 μ l로 유화된 SB1 37.5 μ l(12.5 μ g), 5분 후에 몬타나이드 37.5 μ l로 유화된 SB2 37.5 μ l(12.5 μ g), 이어서, 다른 위치를 통한 투여.

[0118] 면역화 직전 및 면역화 후 14일째에 혈액 샘플을 채취하고, 재조합 단백질 면역 항원의 성장 인자 성분에 대한 IgG 항체의 존재 및 상대적인 역가를 위해 ELISA에 의해 혈청을 분석하였다. ELISA 플레이트를 시판의 재조합 인간 IGF 또는 EGF 1 μ g/ml 농도로 도포하였다. 블로킹 및 세정 후, 시험 마우스의 혈청을 다양한 희석물로 웰에 도포하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 결합되지 않은 항체 및 기타 단백질을 세정에 의해 제거하고, 결합된 마우스 IgG를 HRP-표지 항-마우스 항체로 검출하였다.

[0119] 그룹 6은 모두 면역원성 재조합 키메라 단백질의 성장 인자 성분에 대하여 특이적 면역 반응이 증가하는 동물을 포함한다. 전반적으로 단지 하나의 성장 인자의 시퀀스가 포함되어 있는 그룹에서 IGF보다 EGF에서 더욱 강한 반응을 보이는 것이 설명되었다(그룹 1 및 그룹 2, 도 34 및 도 35). 특정 이론에 제한되는 일 없이, 이것은 EGF가 15/53 잔기만 다르고, IGF가 4/70 잔기만 다른 마우스와 인간 단백질 사이의 상동성도의 반영일 수 있다. 또한, 동일한 항원에 대하여 그룹 내에서 각각의 동물 사이의 반응 차이는 그룹 사이의 차이보다 큰 경우가 있

다.

- [0120] 마우스 중 하나는 거의 반응하지 않고, 몬타나이드보다 더욱 높은 농도로 스크리닝되는 4개의 다른 샘플이 요구되는 점에서, 보조제로서 몬타나이드보다 Matrix-M를 사용하는 것(그룹 5을 그룹 1과 비교, 도 40 및 도 34)이 더욱 열악한 반응을 야기하였다.
- [0121] 그룹 3, 그룹 4 및 그룹 6은 EGF 및 IGF 시퀀스가 모두 포함된 단백질을 공급받았고, 제제 또는 투여의 차이가 있었다. 그룹 3의 마우스는 각 단백질 분자에 EGF 및 IGF 시퀀스가 모두 포함된 재조합 단백질을 공급받았고, 6마리 중 2마리가 α -IGF 반응을 나타내지 않았지만, 모두 EGF에는 반응하였다(도 36 및 도 37). 또한, 그룹 4 및 그룹 6 마우스는 모두 EGF에 대하여 항체를 생성하였다(도 38, 도 39 및 도 41). 그룹 4 중 1마리는 IGF에 반응하지 않았고, 다른 1마리는 매우 약하게 반응하였다. 그룹 6에 있어서만, EGF 및 IGF 함유 단백질이 각각 다른 위치에 투여되었고, 6마리는 모두 IGF에 대한 반응이 증가하였다.
- [0122] 실시예 XIV: 유전자 단일 단계 정제
- [0123] 본 발명에서 상세하게 설명된 면역원성 재조합 단백질의 일부 또는 전부에 단일 제 1 단계 정제 방법이 적용되는 것이 바람직하다. 상기 정제는 헥사-히스티딘, MBP, F1AG 등의 친화성 태그의 포함이 요구되지 않는 것이 이상적이다. 본 발명의 재조합 단백질은 모두 비브리오 콜레라 CT-B 독소 서브유닛으로부터 유래되는 적어도 일부 시퀀스 또는 합성 기능적 등가물을 포함하는 것과 관련이 있다. 정제는 단클론 또는 다클론 항체의 사용에 의해 달성될 수 있지만, 단클론 항체는 생산 비용이 고가일 것으로 예상된다. 다클론 항체는 보다 저렴하지만, 동일한 동물의 배치 사이 및 각각의 동물 사이에 성능 차이가 나타날 가능성이 있다. 또한, 면역 친화성 정제는 상기 표적 단백질에 불리하게 영향을 미칠 수 있는 표적 단백질을 용리하기 위해 저pH 등의 가혹한 조건이 요구되어 친화성 매트릭스의 재사용을 제한할 수 있다. 또한, 제조 방법에 있어서 부가적인 단백질의 도입을 포함할 수 있어 회피하는 것이 바람직하다.
- [0124] 상기 원시 CT 홀로톡신에 있어서, 노노-강글리오시드 Gm1과 결합하는 독소(도 42)는 기도(respiratory tract) 및 소화관의 상피세포를 포함하는 대부분의 포유류 세포의 표면에서 발견된다. 결합은 CT-B 서브유닛에 의해 영향을 받고, CT-B 올리고머만이 Gm1과 결합한다. 따라서, 적합한 지지체로 고정되는 CTB는 본 발명의 면역원성 재조합 단백질의 정제에 이용될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0125] 그러나, 상기 CTB의 사용은 몇 가지 이유에 대하여 바람직한 방법으로 생각되지 않고, 특히 CTB는 소의 뇌로부터 정제된 재료의 시판품만을 이용할 수 있다. 동물 재료의 사용 및 특히 소의 뇌 조직의 사용은 치료제의 생산에 이용하기에는 적합하지 않다.
- [0126] 상기 CTB와 Gm1의 결합은 2개의 인접한 CTB 서브유닛과 결합하는 분기의 글리코-분자 Gm1 상에 말단 갈락토오스 부위를 포함하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 적합한 고체 지지체에 고정되는 갈락토오스는 본 발명의 재조합 단백질을 정제하는 유전자 수단을 제공할 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 접근 방식의 적용 가능성을 평가하기 위하여, CTB를 엔코딩하는 유전자는 종래 기술에서 행해진 것으로 알려진 기술을 이용한 주변세포질 단백질 회복의 설계된 박테리아 단백질 발현 벡터로 클로닝되어 E. coli 박테리아의 각종 균주로 변형된다. 갈락토오스-세파로오스 수지(도 43)는 Pierce(Pierce 카다로그 번호 20372)로부터 공급받았다. XL1-Blue, BL21 및 TGI E. coli 균주의 CTB-발현 클론 배양액 50ml를 성장시키고, 37°C에서 하룻밤 동안 재조합 CTB를 발현하도록 유도하였다. 상기 세포를 원심분리에 의해 수집하고, CTB의 추출을 위해 정제된 배지를 보관한다. 세포 펠렛(pellets)의 주변세포질 함유량은 배양액당 10ml를 수득하는 종래 기술에서 행해진 것으로 알려진 표준법을 이용한 삼투압 충격법(osmotic shock)에 의해 방출하였다.
- [0127] 상기 갈락토오스 세파로오스 수지는 제조사의 지시에 따라 200mM NaCl, 50mM Tris HCl, 5mM EDTA pH7.5(TEN 완충액)로 세정하였다. NaCl, Tris-HCl pH7.5 및 EDTA를 200mM NaCl, 50mM Tris-HCl 및 5mM EDTA의 최종 농도가 되도록 조건 배지 및 주변세포질 분획에 첨가하였다. 세정된 갈락토오스 세파로오스 0.5ml를 조건 배지 및 주변세포질 분획에 각각 첨가하고, 4°C에서 2-3시간 교반하면서 배양하였다. 상기 수지는 BioRad 컬럼으로 회수하여 빙랭 TEN 완충액 30배드 볼륨으로 세정하였다. 결합된 단백질은 PBS의 1M 갈락토오스 0.5ml로 수지를 재부유(re-suspending)시킴으로써 용리하고, 10분 동안 배양하였다. 상기 컬럼은 폐기하고, 용리액은 분석을 위해 보관하였다. 상기 용리 방법을 수회 반복하고, 분획은 CTB의 존재를 위해 분석되었다. 거의 모든 발현 CTB 단백질이 배지에서 발견되었다. (배지로부터)정제된 CTB를 함유하는 통합 컬럼 용리액과 함께 미리 정제된 조건 배지의 샘플 및 주변세포질 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하여 IMAC에 의해 정제된 His-태그 CTB와 비교하였다(도 44). 고정제 CTB는 가장 고수율로 제공되는 XL1-Blue 세포를 갖는 3개의 균주의 배양 상등액으로부터 얻어지는

것을 확인할 수 있었다(레인 4, 레인 7 및 레인 10). IMAC 정제에서 확인된 것과 순도를 비교하여(레인 11) 유의적인 펜타머 단백질을 포함한다.

- [0128] 추가적인 실시형태
- [0129] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에는 합성 면역원성 재조합 단백질의 구성요소로서 종양 항원 항원결정기의 제시를 개선하고, 그 수를 증가시키는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 백신이 개시되어 있다. 하나의 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에는 폴리펩티드 시퀀스 및 종양 항원의 전부 또는 일부를 발현하는 재조합 단백질로 형성되는 백신이 개시되어 있다.
- [0130] 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에 개시된 재조합 단백질은 총 분자량의 함수로서 종양 항원 및/또는 그 항원결정기로부터 유래되는 단백질 시퀀스를 고비율로 포함 또는 발현할 수 있다. 이들 종양 항원 항원결정기는 단일 종양 항원의 전부 또는 일부의 다중 복제, 또는 하나 이상의 다른 종양 항원의 전부 또는 일부의 복제일 수 있다.
- [0131] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 물리적 구조로 접힌 하나 이상의 시퀀스, 예를 들면 비브리오 콜레라의 콜레라 독소 B(CT-B) 단백질 또는 합성 등가물의 하나 이상의 시퀀스, 및 하나 이상의 종양 항원 및 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 면역원성 단백질 분자이다.
- [0132] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 종양 항원의 시퀀스는 전립선 특이적 항원(PSA) 또는 그 일부의 시퀀스를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 종양 항원은 하기 PSA 및 기타 종양 항원을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 종양 항원의 전장 또는 그 일부를 포함할 수 있다.
- [0133] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에는 면역원성 재조합 단백질의 구성요소로서 수용체 결합 부위의 제시를 개선하고, 그 수를 증가시키는 동종의 재조합 단백질로 이루어지는 단백질이 개시되어 있다. 하나의 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에는 폴리펩티드 시퀀스 및 수용체의 전장 또는 일부를 발현하는 재조합 단백질이 개시되어 있다.
- [0134] 예시적인 실시형태에 있어서, 본 원에 개시된 재조합 단백질은 총 분자량의 함수로서 수용체 및/또는 그 결합 부위로부터 유래되는 단백질 시퀀스를 고비율로 포함 또는 발현할 수 있다. 이들 결합 부위는 단일 수용체의 전부 또는 일부의 다중 복제물질, 또는 하나 이상의 서로 다른 수용체의 전부 또는 일부의 복제물질일 수 있다.
- [0135] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 물리적 구조로 접힌 하나 이상의 시퀀스, 예를 들면 비브리오 콜레라의 콜레라 독소 B(CT-B) 단백질 또는 합성 등가물의 하나 이상의 시퀀스, 및 하나 이상의 종양 항원 및 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 면역원성 단백질 분자이다.
- [0136] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 수용체의 시퀀스는 인간 상피 성장 인자 수용체 2(Her2) 또는 그 일부 및/또는 인간 상피 성장 인자 수용체 3(Her3) 또는 그 일부의 시퀀스를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 수용체는 하기 Her2, Her3 및 기타 수용체를 포함하는 하나 이상의 수용체의 전장 또는 그 일부를 포함할 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0137] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 물리적 구조로 접힌 하나 이상의 시퀀스, 예를 들면 CT-B 또는 합성 변형 이형체(modified variant)의 하나 이상의 시퀀스를 발현하고, 하나 이상의 성장 인자 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스, 하나 이상의 종양 인자 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스, 및 하나 이상의 수용체 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 발현하는 면역원성 단백질 분자이다.
- [0138] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 하나 이상의 성장 인자 또는 그 일부의 발현물질 또는 시퀀스, 및 하나 이상의 종양 항원 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 CT-B 또는 합성 변형 이형체(modified variant), PSA 또는 그 일부, 및 IGF-1 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다.
- [0139] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 하나 이상의 성장 인자 또는 그 일부의 발현물질 또는 시퀀스, 및 하나 이상의 수용체 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 CT-B 또는 합성 변형 이형체, Her2 또는 그 일부, 및 IGF-1 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 CT-B 또는 합성 변형 이형체, Her2 또는 그 일부, Her2 또는 그 일부, 및 PDGF 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다.
- [0140] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 하나 이상의 종양 항원 또는 그 일부의 발현물질 또는

시퀀스, 및 하나 이상의 수용체 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다.

- [0141] 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질은 하나 이상의 성장 인자 또는 그 일부의 발현물질 또는 시퀀스, 및 하나 이상의 수용체 또는 그 일부의 하나 이상의 시퀀스를 포함한다.
- [0142] 상술의 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 단일 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자의 하나 이상의 복제를 발현하는 것 이외에, 물리적 부위마다 단일 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자, 및/또는 경쟁적 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자 시퀀스의 쇠가 제시된다(예를 들면, n=1~10). 또한, 본 발명에 따른 재조합 단백질은 2개 이상의 서로 다른 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자가 재조합 단백질의 시퀀스 내에서 서로 다른 위치에 단일쇄 또는 쇠로서 제시되는 하나 이상의 중화 도메인 또는 결합 부위의 발현을 포함한다. 예를 들면, 재조합 단백질은 단일 항원결정기 또는 결합 부위로서 또는 2개 이상의 텐덤 반복물질로서 2~4개의 서로 다른 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자의 전장 또는 일부, 및/또는 하나 이상의 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자의 전장 또는 일부의 발현물질 또는 시퀀스를 포함할 수 있다.
- [0143] 얻어진 단백질은 재조합 단백질의 시퀀스 내에서 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자, 또는 하나 이상의 항원 결정기 또는 그 결합 부위를 발현하는 단일 폴리펩티드이다. 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질의 시퀀스는 CT-B 시퀀스의 하나 이상의 부분을 발현하고, 항원결정기 또는 그 결합 부위의 적어도 하나 이상의 발현을 포함하는 종양 인자, 수용체 및/또는 성장 인자를 상기 면역원성 재조합 단백질의 표면에 자연 형태로 제시한다.
- [0144] 본 발명에 따라서, 종양 항원 항원결정기, 수용체 결합 부위 및/또는 성장 인자 항원결정기의 발현은 그것들의 자연 형태가 강력한 호스트 면역 반응을 유도하는 방식으로 주로 호스트 면역 체계의 성분을 함유 및 제시하도록 접혀질 수 있다. 바람직한 자연 단백질 모형의 실시예로는 콜레라 독소 B 서브유닛, 리스테리아, 파상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, 박테리오파지 외피 단백질, 아데노바이러스 및 기타 바이러스성 외피 단백질이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다. 또한, 비자연 '합성' 폴리펩티드는 전체 단백질에 대하여 면역원성을 부여하고, 호스트 면역 체계에 대하여 종양 항원 항원결정기, 수용체 결합 부위 및/또는 성장 인자 항원결정기의 적절한 제시를 허용하는 요건을 충족시킬 수 있다.
- [0145] 보조제
- [0146] 본 원에 제공된 특정 예시적인 실시형태는 재조합 단백질 이외에 적어도 하나의 보조제(보조제 활성을 갖는 조성물의 성분을 의미함)를 함유하는 약제학적 조성물을 포함하는 백신 조성물 및 면역학적 보조제 조성물 내에서 본 발명에 따른 재조합 단백질을 포함한다. 이러한 보조제 활성을 갖는 보조제는 인식 면역 체계를 갖는 인간(예를 들면, 인간 환자), 비인간 영장류, 포유동물 또는 기타 고등 진핵 생물 등의 대상에 투여할 때에 면역 반응의 효력 및 지속성을 변화(즉, 통계학적으로 유의한 방식으로 증가 또는 감소, 및 특정 바람직한 실시형태에 있어서는 촉진 또는 증가)시킬 수 있는 조성을 포함한다. 본 원에 개시된 특정 예시적인 실시형태에 있어서, 바람직한 항원 및/또는 항원이 재조합 단백질 내에 함유되고, 하나 이상의 보조제가 투여시에 동시에 투여되거나 또는 시간 및/또는 공간(예를 들면, 서로 다른 해부학적 부위)적으로 분리될 수 있는 바람직한 항원 및 항원에 대하여 직접적으로 면역 반응을 변경, 즉 유도 또는 촉진할 수 있지만, 특정 예시적인 실시형태는 이들에 한정되지 않고, 또한 특정 항원은 포함하지 않지만 하나 이상의 공동 보조제, 이미다조퀴놀린 면역 반응 조절제를 포함할 수 있고 이들에 한정되지 않는 조성물에 있어서의 재조합 단백질의 투여를 고려할 수 있다.
- [0147] 따라서, 상술한 바와 같이 보조제는 QS21 및 QS21 유사체(예를 들면, 미국 특허 제5,057,540호; EP 0 362 279 B1; WO 95/17210), 알룸, 토마틴, 사포닌, 폴리소르베이트 80, 스팬 85 및 스테아릴 티로신 등(이들에 제한되지 않음)의 식물성 알칼로이드, 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-알파, IFN-감마), 이미다조퀴놀린 면역 반응 조절제, 및 더블 스템 루프 면역 조절제(dSLIM, 예를 들면, Weeratna et al, 2005 백신 23:5263)를 포함하는 사포닌 및 사포닌 유사체 등의 보조제의 효과를 갖는 조성물을 포함한다.
- [0148] 사포닌을 포함하는 세제는, 예를 들면 미국 특허 제6,544,518호; Lacaille-Dubois, M 및 Wagner H.(1996 Phytomedicine 2:363-386), 미국 특허 제5,057,540호, Kensil, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12(1-2): 1-55, 및 EP 0 362 279 B1에 알려져 있다. 면역 자극 복합체(Immune Stimulating Complexes(ISCOM S))의 Quil A(사포닌) 분획을 포함하는 미립자구조는 용혈성이고, 백신의 제조에 이용되어 왔다(Morein, B., EP 0 109 942 B1). 이들 구조는 보조제 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(EP 0 109 942 B1; WO 96/11711). 상기 용혈성 사포닌 QS21 및 QS17(Quil A의 HPLC 정제 분획)은 잠재 전신성 보조제로서 설명되어 있고, 그 제조 방법은 미국 특허 제5,057,540호 및 EP 0 362 279 B1에 개시되어 있다. 또한, 전신성 백신에 대한 잠재 보조제로서

작용하는 QS7(Quil-A의 비용혈성 분획)의 용도가 이들 참조문헌에 기재되어 있다. 또한, QS21의 용도가 Kensil 등(1991. J. Immunology 146:431-437)에 기재되어 있다. QS21과 폴리소르베이트 또는 시클로덱스트린의 결합이 공지되어 있다(WO 99/10008). QS21 및 QS7 등의 QuilA의 분획을 포함하는 미립자 보조체계는 WO 96/33739 및 WO 96/11711에 기재되어 있다. 합성 백신 연구에 이용되어 온 기타 사포닌은 안개꽃(Gypsophila) 및 비누풀(Saponaria) 등의 기타 식물종으로부터 유래되는 것을 포함한다(Bomford 등, Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

[0149] 에스신(Escin)은 본 원에 개시된 실시형태의 보조제 조성물에 이용되는 사포닌과 관련된 또 다른 세정제이다. 에스신은 마로니에 나무(horse chestnut tree, Aesculus hippocastanum)의 씨앗에서 생성되는 사포닌의 혼합물로서 k index(12.sup.th Ed.: entry 3737)에 기재되어 있다. 크로마토그래피 및 정제(Fiedler, Arzneimittelforsch. 4, 213(1953)), 및 이온 교환 수지(Erbring 등, 미국 특허 제3,238,190호)에 의한 분리가 기재되어 있다. 에스신(애신(aescin)으로도 알려져 있음)의 분획은 정제되어 생물학적 활성을 나타낸다(Yoshikawa M, 등 (Chem Pharm Bull(Tokyo) 1996 August; 44(8): 1454-1464)). 또한, 디기토닌(Digitonin)은 또 다른 세제이고, 디기탈리스(Digitalis purpurea)의 씨앗으로부터 유래되고, Gisvold 등, J. Am. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664; 및 Rubenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621에 기재된 방법에 따라서 정제되는 사포닌으로서 Merck index(12th Ed., entry 3204)에 기재되어 있다.

[0150] 본 원에 기재된 특정 실시형태에 따라 이용되는 기타 보조제 또는 공동 보조제는 당업자에게 잘 알려져 있는 폴리머 화합물의 종류를 의미하는 블록 공중합체 또는 생분해성 폴리머를 포함한다. 백신 구성 또는 면역학적 보조제에 포함되어도 좋은 블록 공중합체 또는 생분해성 폴리머의 예로는 Pluronic.RTM.L121(BASF Corp., Mount olive, N.J.; 예를 들면, Yeh 등, 1996 Pharm. Res. 13: 1693 참조)이 포함된다.

[0151] 다른 특정 예시적인 실시형태는 이러한 다른 실시형태에 있어서 공동 보조제 활성을 부여할 수 있고, 이러한 다른 실시형태에 있어서 약제학적으로 허용될 수 있는 캐리어 또는 부형제를 첨가 또는 대체하여 제공할 수 있는 오일을 포함하는 면역학적 보조제를 고려하지만, 이들에 한정되지 않는다. 다수의 적합한 오일이 알려져 있고, 본 발명을 기초로 하는 백신 조성물 및 면역학적 보조제 조성물에 포함하기 위해 선택될 수 있다. 이러한 오일의 실시예로는 스쿠알렌, 스쿠알란, 미네랄 오일, 올리브 오일, 콜레스테롤 및 만니드 모노올레이트가 포함되지만, 예시적인 방법이고, 이들에 한정되지 않는다.

[0152] 또한, 이미다조퀴놀린 면역 반응 조절제 등의 면역 반응 조절제는 당업계에 알려져 있고, 특정 예시적으로 개시된 실시형태에 있어서 보조제 또는 공동 보조제로서 포함될 수 있다.

[0153] 또한, 상술한 바와 같이, 본 원에 기재된 발명에 따른 백신 조성에 이용되는 보조제 또는 공동 보조제 중 하나는 통상적으로 "알룸"이라고 불리는 알루미늄 공동 보조제일 수 있다. 알룸 공동 보조제는 양호한 안정성 기록, 항체 반응 증가, 안정한 항원을 갖기 때문에 이점이 있고, 대량 생산에 비교적 용이하다(Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21:129-148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2:370-383.).

[0154] 약제학적 조성

[0155] 특정 예시적인 실시형태에 있어서, 약제학적 조성은 본 발명에 따른 재조합 단백질을 포함하고, TLR 작용제, 공동 보조제(예를 들면, 사이토카인, 이미다조퀴놀린 면역 반응 조절제 및/또는 dSLIM를 포함함) 등에서 선택되는 본 원에 기재된 하나 이상의 성분 및/또는 재조합 발현 구성체를 약제학적으로 허용될 수 있는 캐리어, 부형제 또는 희석제와 조합하여 포함하는 백신 조성이다.

[0156] 예시적인 캐리어는 사용되는 투여량 및 농도에서는 수용자에게 무독성일 수 있다. 통상, 재조합 단백질을 포함하는 백신은 약 0.01mg/kg~약 100mg/kg 체중이 피내, 피하, 근육내 또는 정맥 경로, 또는 다른 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0157] 호스트의 반응시에 투여 횟수 및 빈도가 의존적인 것은 당업자에게 명백할 것이다. 치료적 사용을 위한 "약제학적으로 허용될 수 있는 캐리어"는 약제학 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들면 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.(A. R. Gennaro edit. 1985)에 기재되어 있다. 예를 들면, 생리적 pH의 멸균 식염수 및 인산염 완충 식염수가 이용될 수 있다. 상기 약제학적 조성물에 보존제, 안정제, 염료 및 향미료도 제공될 수 있다. 예를 들면, 소듐 벤조에이트, 아스코르브산 및 p-히드록시벤조산의 에스테르가 보존제로서 첨가될 수 있다. 또한, 항산화제 및 현탁화제가 사용되어도 좋다.

[0158] 상기 약제학적 조성물은 환자에게 투여되는 조성물로 허용되는 어떠한 형태이어도 좋다. 예를 들면, 상기 조성물은 고체, 액체 또는 가스(에어로졸)의 형태이어도 좋다. 통상의 투여 경로는 경구, 국부, 비경구(예를 들면, 설하 또는 구강), 설하, 직장, 질 및 비강(예를 들면, 분사 방법으로서)을 포함하지만, 제한되지 않는다. 여기

서 사용되는 비경구란 이온 영동 소노포어시스, 수동 경피, 마이크로니들 투여, 및 또한 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내, 해면내(intracavernous), 척수강내(intrathecal), 내이강(intrameatal), 요관내(intraurethral) 주사 또는 투입 방법을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 여기에 기재된 조성물(백신 및 약제학적 조성물을 포함함)은 이온 영동, 마이크로캐비테이션(microcavitation), 소노포어시스(sonophoresis) 또는 마이크로니들에 의해 피내 투여된다.

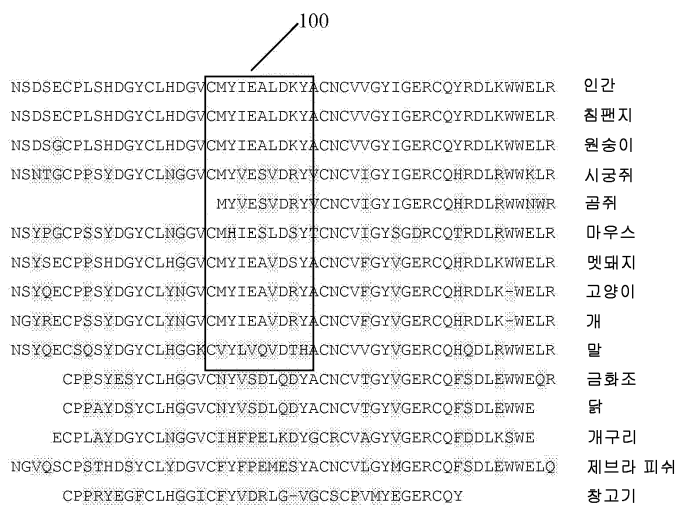
- [0159] 상기 약제학적 조성물은 그 안에 함유되는 활성 성분이 환자에게 조성물을 투여할 때에 생리학적으로 이용될 수 있도록 제제화된다. 환자에게 투여될 조성물은, 예를 들면 정제는 단일 복용 단위일 수 있고, 에어로졸 형태의 본 발명의 하나 이상의 화합물을 함유하는 것은 복수의 복용 단위를 갖는 하나 이상의 복용 단위의 형태를 취할 수 있다.
- [0160] 경구 투여에 있어서는 부형제 및/또는 바인더가 예시될 수 있다. 그 예로는 수크로오스, 카올린, 글리세린, 전분, 텍스트린, 소듐 알지네이트, 카르복시메틸셀룰로오스 및 에틸 셀룰로오스가 있다. 착색제 및/또는 향미료가 예시될 수 있다. 코팅 셸(coating shell)이 사용될 수 있다.
- [0161] 상기 조성물은 엘릭시르(elixir), 시럽, 용액, 에멀전 또는 부유액 등의 액체 형태일 수 있다. 상기 액체는 2개의 예와 같이 경구 투여 또는 주사에 의한 전달에 이용된다. 경구 투여의 경우, 조성물은 감미제, 보존제, 염료/착색제 및 풍미 증진제 중 하나 이상을 함유하는 것이 바람직하다. 주사에 의해 투여하고자 하는 조성물에 있어서는 계면활성제, 보존제, 습윤제, 분산제, 부유제, 완충액, 안정제 및 등장액 중 하나 이상이 포함될 수 있다.
- [0162] 본 원에 이용되는 액상 약제학적 조성물은 용액, 부유액 또는 기타 어떠한 형태인지의 여부에 따라서 다음의 캐리어 또는 부형제: 주사용 물, 식염수, 바람직하게는 생리학적 식염수, 링거액(Ringer's solution), 소듐 클로라이드 등장액 등의 멸균 희석액, 스쿠알렌, 스쿠알란, 미네랄 오일, 만니드 모노올레이트, 콜레스테롤 및/또는 용제 또는 부유액으로서 제공될 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드 등의 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤 등의 향균제; 아스코르브산 또는 소듐 비술파이트 등의 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산 등의 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 등의 완충액 및 소듐 클로라이드 또는 텍스트로오스 등의 장력 보조제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 비경구용 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 시린지 또는 주사액병에 동봉될 수 있다. 주입될 수 있는 약제학적 조성물은 멸균되는 것이 바람직하다.
- [0163] 특정 실시형태에 있어서, 본 발명의 약제학적 또는 백신 조성물은 0.2 μ m 미만의 안정한 수용성 부유제를 포함하고, 인지질, 지방산, 계면활성제, 세제, 사포닌, 불소화 지질 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 더 포함한다.
- [0164] 또한, 백신 또는 약제학적 조성물에는 알루미늄염, 유중수적형(water-in-oil) 에멀전, 생분해성 오일 운반체, 수중유적형(oil-in-water) 에멀전, 생분해성 마이크로캡슐 및 리포솜을 포함하는 전달 운반체 등의 기타 성분을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 이러한 운반체에 이용되는 면역 촉진 물질(공동 보조제)의 예로는 상술한 것 이외에 N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(MDP), 글루칸, IL-12, GM-CSF, 감마 인터페론 및 IL-12가 포함될 수 있다.
- [0165] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 캐리어가 본 발명의 약제학적 조성물에 이용될 수 있지만, 캐리어의 종류는 투여 형태 및 서방성(sustained release)이 요구되는지의 여부에 따라 변경될 수 있다. 피하 주사 등의 비경구 투여에 있어서, 캐리어는 물, 식염수, 알코올, 지방, 왁스 또는 완충액을 포함하는 것이 바람직하다. 경구 투여에 있어서, 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 탈컴, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스 및 마그네슘 카보네이트 등의 상기 캐리어 또는 고체 캐리어 중 어느 하나가 이용될 수 있다. 생분해성 마이크로스피어(예를 들면, 폴리락트산 갈락티드)는 본 발명의 약제학적 조성에 대하여 캐리어로서 이용될 수 있다.
- [0166] 또한, 약제학적 조성물은 완충액 등의 희석액, 아스코르브산 등의 항산화제, 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드, 단백질, 아미노산, 글루코오스, 수크로오스 또는 텍스트린을 포함하는 탄수화물, EDTA 등의 킬레이트제, 글루타치온 및 기타 안정제 및 부형제를 포함할 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 비특이적 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 적절한 희석액으로서 예시된다. 바람직하게는, 희석액으로서 적절한 부형제 용액(예를 들면, 수크로오스)을 이용하여 생성물을 동결건조시킴으로써 제제화할 수 있다.
- [0167] 예시적인 실시형태에 있어서, 상기 재조합 단백질의 도메인을 지지하는 항원결정기 또는 수용체는 폴리펩티드

시퀀스가 자연 유래인지 합성인지의 여부에 따라 적절한 화학적/환경적 조건 하에서 올리고머의 멀티머로 자기 조립되거나, 또는 다른 조건 하에서 모노머로 감소되는 능력을 가질 수 있다. 이상적으로는, 멀티머리제이션 도메인은, 예를 들면 다이머, 트리머, 테트라머, 펜타머 등의 각각의 수의 서브유닛을 갖는 안정적인 멀티머로 조립되어 균일한 크기의 생성물을 생성할 수 있다. 자연 폴리펩티드의 예로는 류신 지퍼, 락 리프레서 단백질, 스트렙타아비딘/아비딘, 콜레라 독소 B 서브유닛, 슈도모나스 트리머리제이션 도메인 및 바이러스성 캡시드 단백질에 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다.

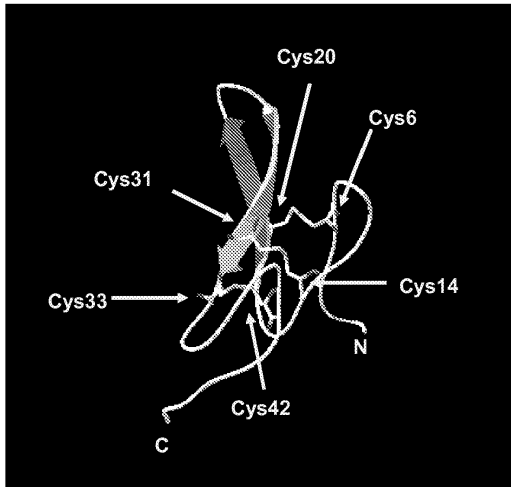
- [0168] 예시적인 실시형태에 있어서, 다가의 분자를 조제하는 방법이 개시되어 있다. 이 예시적인 실시형태에 있어서, 모노머의 서브유닛으로부터 멀티머를 조립하여 하나 이상의 종양 항원, 수용체 및/또는 성장 인자 또는 그 일부를 포함하는 합성 단백질을 형성하는 방법을 포함한다.
- [0169] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 백신 제제를 조제하는 방법이 개시되어 있다. 이 예시적인 실시형태에 있어서, 하나 이상의 단일 1가의 멀티머를 하나 이상의 종양 항원, 수용체, 및/또는 성장 인자 또는 그 일부를 포함하는 재조합 단백질을 포함하는 다가의 백신과 함께 혼합하여 조제하는 방법을 포함한다.
- [0170] 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 환자를 치료하는 방법이 개시되어 있다. 이 예시적인 실시형태에 있어서, 하나 이상의 1가의 항체, 하나의 종양 항원, 수용체, 및/또는 성장 인자, 재조합 단백질을 백신 접종 당일 또는 백신 접종 기간에 격일 또는 여러 회에 나눠서 환자에게 투여하는 방법을 포함한다.
- [0171] 상기 재조합 단백질은 상기 종양 항원, 성장 인자, 및/또는 수용체 중 적어도 하나의 시퀀스 및 CT-B 시퀀스의 전부 또는 일부를 하나 이상 포함 또는 발현하는 것으로 기재되어 있지만, 상기 재조합 단백질은 자연 CT-B 시퀀스 또는 상기 자연 CT-B 시퀀스와 실질적으로 동일한 시퀀스 및/또는 합성 시퀀스를 포함하여도 좋다.
- [0172] 상기 재조합 단백질은 상기 CT-B 시퀀스를 포함 또는 발현하는 것으로 기재되어 있지만, 상기 재조합 단백질은 상기 CT-B 시퀀스의 유도체 또는 상기 CT-B 시퀀스와 실질적으로 동일한 시퀀스를 포함 또는 발현하여도 좋다.
- [0173] 하나 이상의 종양 항원, 성장 인자, 및/또는 수용체를 발현 또는 포함하는 동종의 재조합 단백질은 특정 실시형태와 관련하여 기재 및 설명되어 있지만, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나는 일 없이 당업자에게 많은 변경 및 수정이 있는 것이 명백할 수 있다. 따라서, 본 발명은 상술한 방법론 또는 구성의 상세한 설명에 제한되지 않고, 본 발명의 범위내에서 이러한 변경 및 수정을 포함하고자 한다.

도면

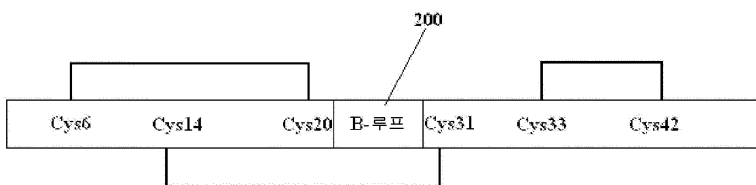
도면1



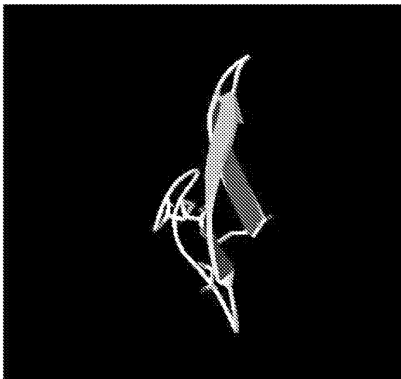
도면2



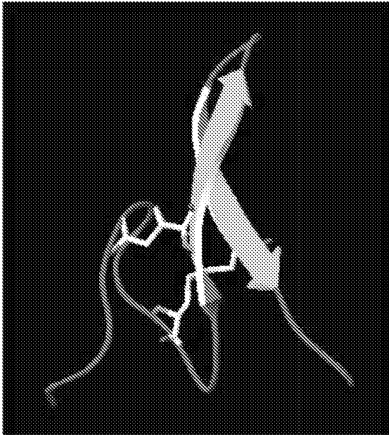
도면3



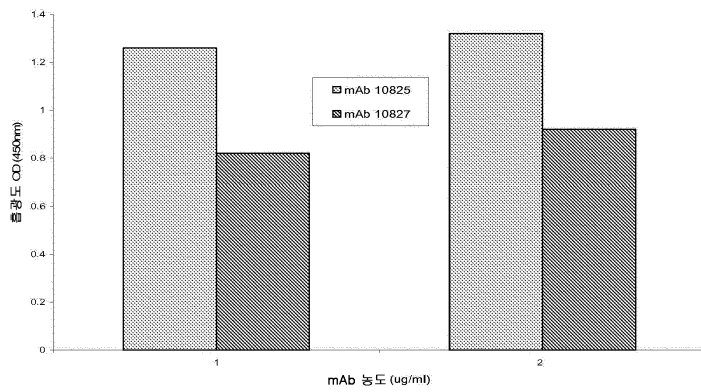
도면4



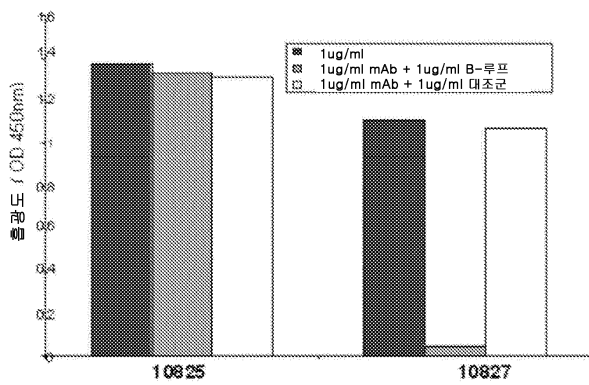
도면5



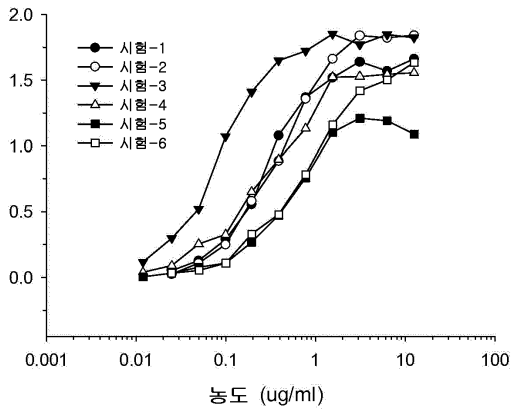
도면6



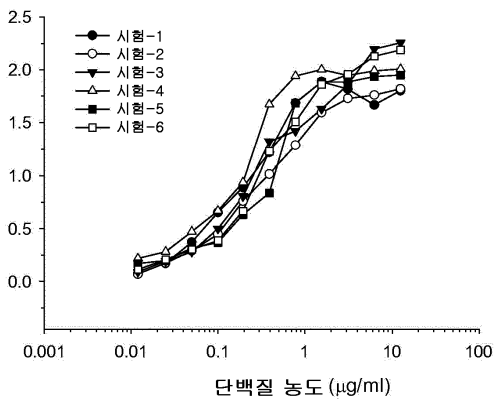
도면7



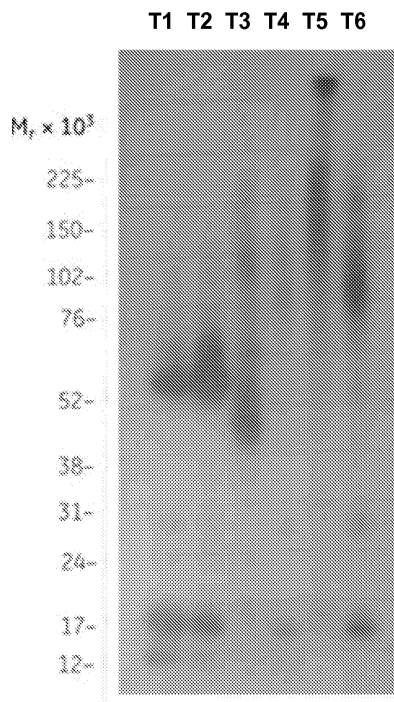
도면8



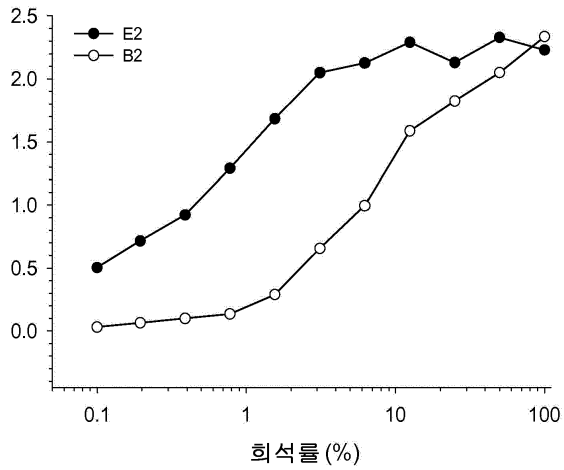
도면9



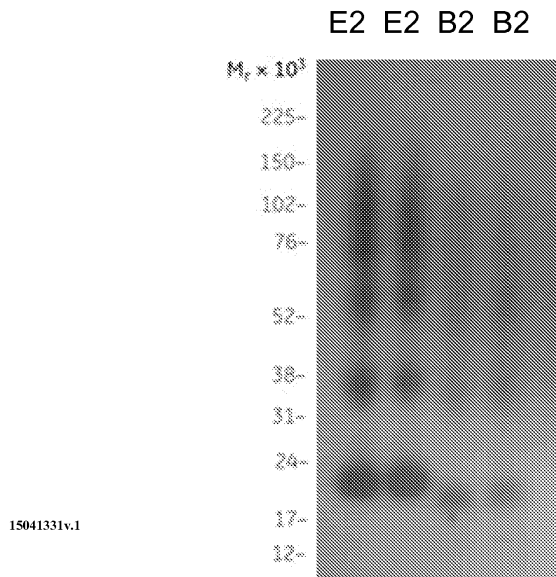
도면10



도면11



도면12



도면13

HHHHHHIEGRNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE
ALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELRSGGTPQN
 ITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFS~~YTESLAGKREMA~~IITFKN
 GATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVE
 KLCVWNNKTPHAIAAISMANSSGNSDSECPLSHDGYCL
HDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWW
ELR

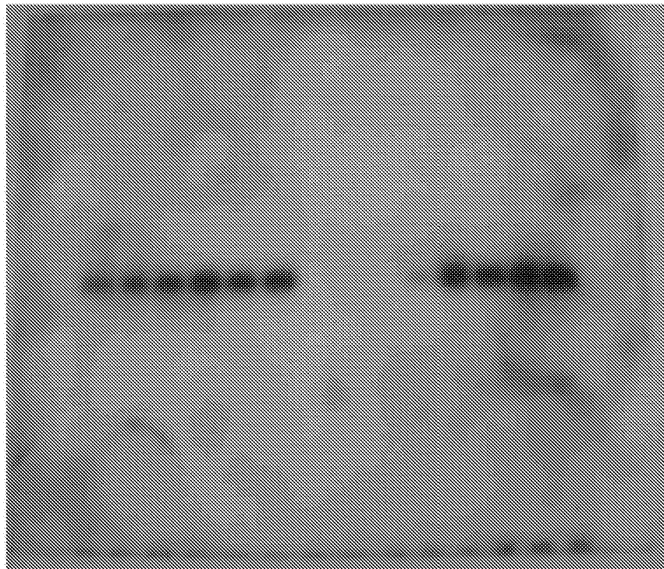
도면14

HHHHHHIEGRCMYIEALDKYSGGTPQNITDLCAE
 YHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQV
 EVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVW
 NNKTPHAIAAISMANSSGCMYIEALDKY

도면15

HHHHHHIEGRCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDK
YACSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAG
 KREMAIITFKNGATFQVEVPQSQHIDSQKKAIERMKDT
 LRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANSSGCPLS
HDGYCLHDGVCMYIEALDKYAC

도면16

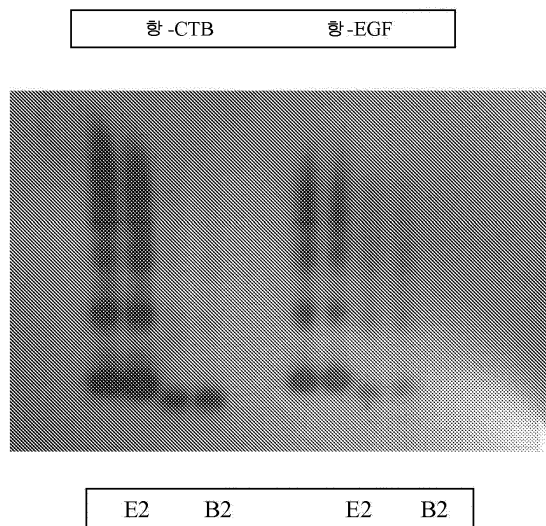


pH	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
복귀	:- {-----pH 7-----}												

도면17

구성체	시퀀스
T1	EGF는 CT-B의 N-말단에 직접 융합된다.
T2	EGF는 CT-B의 N-말단에 융합되고, 3 아미노산 링커에 의해 CT-B로부터 분리된다.
T3	EGF는 CT-B의 N-말단에 융합되고, 5 아미노산 링커에 의해 CT-B로부터 분리된다.
T4	EGF는 CT-B의 C-말단에 직접 융합된다.
T5	EGF는 CT-B의 C-말단에 융합되고, 3 아미노산 링커에 의해 CT-B로부터 분리된다.
T6	EGF는 CT-B의 C-말단에 융합되고, 5 아미노산 링커에 의해 CT-B로부터 분리된다.
E2	CT-B의 양쪽 말단의 전장 EGF는 각각 3 아미노산 링커에 의해 CT-B로부터 분리된다.
B2	CT-B의 양쪽 말단의 절단 EGF(예를 들면, Cys6~Cys31의 EGF 시퀀스)는 각각 3 아미노산 링커에 의해 CT-B로부터 분리된다.

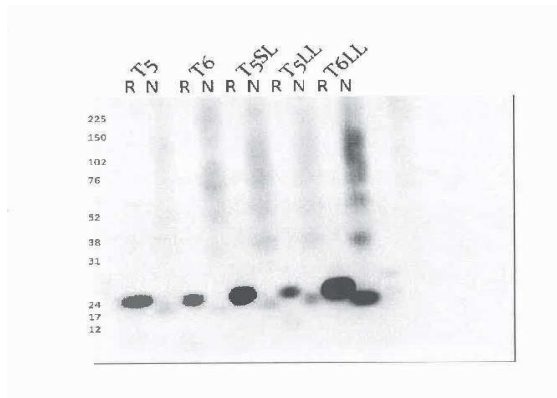
도면18



도면19



도면23

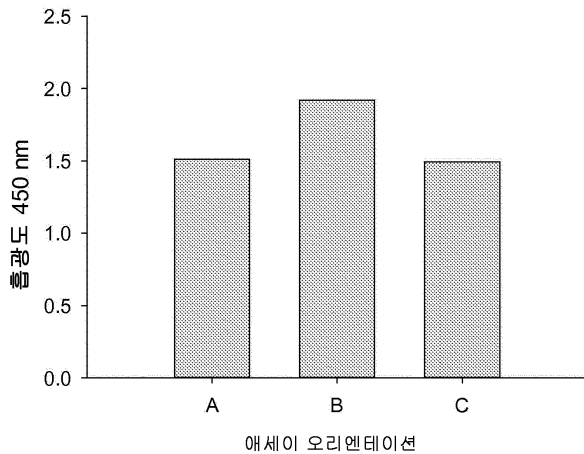


도면24

HHHHHHIEGRGPETLCGAELVDALQFVCGDRGF
 YFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMY
CAPLKPAKSAGSSGNSDSECP~~LS~~HDGYCLHDGVCMYIE
ALDKYACNCVVG~~Y~~IGERCQYRDLKWWELRGGSGGTSG
 GGGGSGTPQ~~NIT~~DLCAEYHNTQ~~IHT~~LNDKIFSYTESLAG
 KREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMKD~~TLR~~
 IAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISM~~AN~~

도면25

캡처 ELISA ‘설계에 의한’ 2중 특이적 키메라 단백질

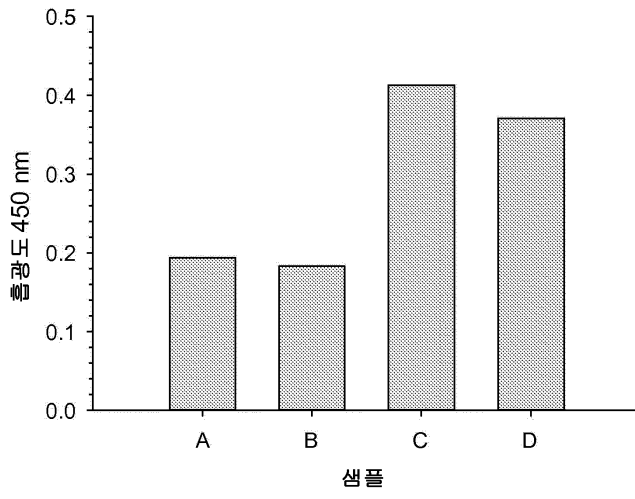


도면26

HHHHHHIEGRTPQ~~NIT~~DLCAEYHNTQ~~IHT~~LNDKIFSYTE
 SLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMK
 DTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISM~~AN~~SSG GP
ETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

도면27

캡처 ELISA '방법에 의한' 2중 특이적 키메라 단백질



도면28

a) mTGF-Beta1
 HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAAIASMAN
 SSGALDTNYCFSSTEKNCCVRLYIDFRKDLGWKWI
HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHN
PGASASPCCVPQALEPLPIVYVYVGRKPKVEQLSNMIV
RSCKCS

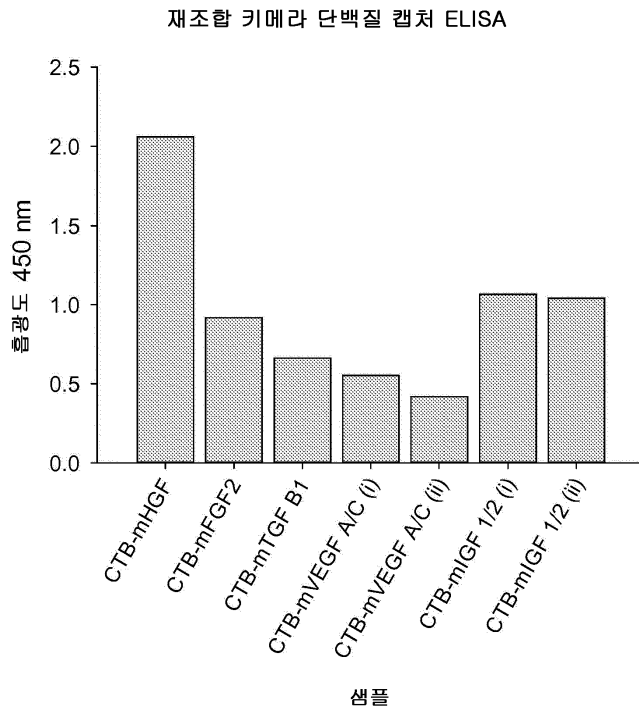
b) mFGF2
 HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTE
 SLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERM
 KDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAAIASMANSSGP
ALPEDGGAAPPGHFKDPKRLYCKNGGFLLRIHPDGR
V DGVREKSDPHVKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLA
MKEDGRLLASKCVTEECFFFERLESNNYNTYRSRKY S
SWYVALKRTGQYKLGSKTGPQKAILFLPMSAKS

c) mHGF
 HHHHHHQKRRNTLHEFKKSAKTTLTKEPLLKIKT
 KKVNSADECANRCIRNRGFTFTCKAFVFDKSRKRCY
WYPFNSMSSGVKKGFGEHFDLYENKDYIRNCIIGKGG
SYKGTVSITKSGIKCOPWNSMIPHEHSFLPSSYRGKDL
QENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIQCSGG
 SGGTSGGGGSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
 YTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAAIASMAN

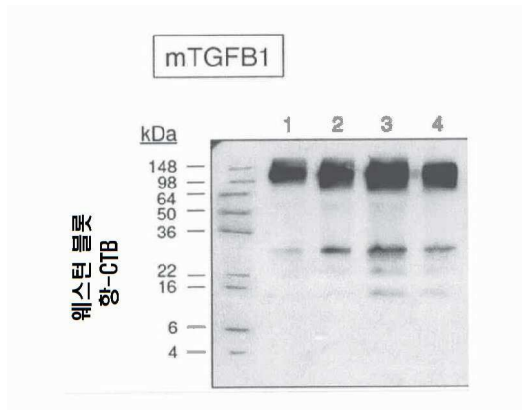
d) mIGF-1/2
 HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAAIASMAN
 SSGGPETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSS
IRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPTKAA
GGSA YGPGETLCGGELVDTLQFVCSDRGFYFSRPSR
ANRRSRGIVECCFRSCDLA LLETYCATPAKSE

e) mVEGF-A/C
 HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAAIASMA
 NSSGVIKFMDVYQORSYCRPIETLVDIFQEYPDEIEYIFK
PSCVPLMRCAGCCNDEALECVPTSESNITMQIMRIKP
HQSQHIGEMSFLQHSRCECRPKKTEILKSIDNEWKTKO
CMPREVCIDVGKEFGAATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNS
EGLOCMNTSTGYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHT
SCRCMS

도면29



도면30



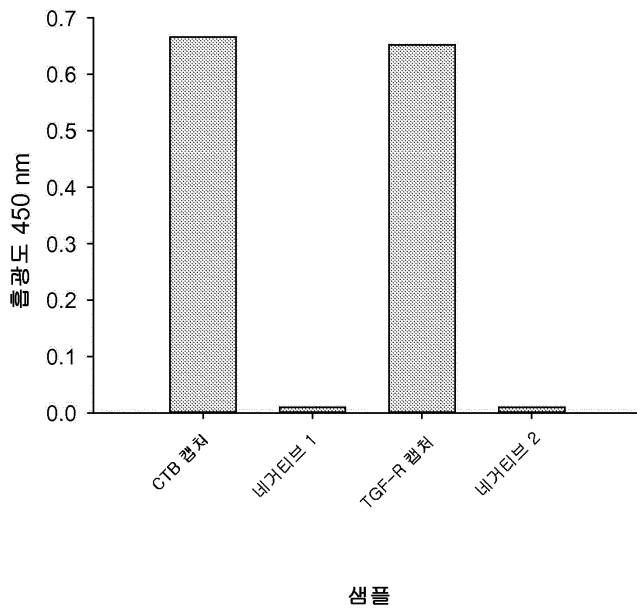
도면31

a) HuTGF-Beta1
 HHHHHH ALDTNYCFSSTEKNCCVRQ LYIDFRKD
LGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL
LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE
QLSNMIVRSCKCSGGSGGTSGGGGGSGTPQNITDLCA
 EYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQ
 VEVPSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWN
 NKTPHAIAAISMAN

b) Hu-TGF-Beta-R2
 HHHHHHIEGRAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSC
 MSNCSITSICEKPEVCVAVWRKNDENITLETVCHDP
 KLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSD
 ECNDNIIFSEGGSGGTSGGGGGSGTPQNITDLCAEYHN
 TQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVP
 SQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTP
 HAIAAISMAN

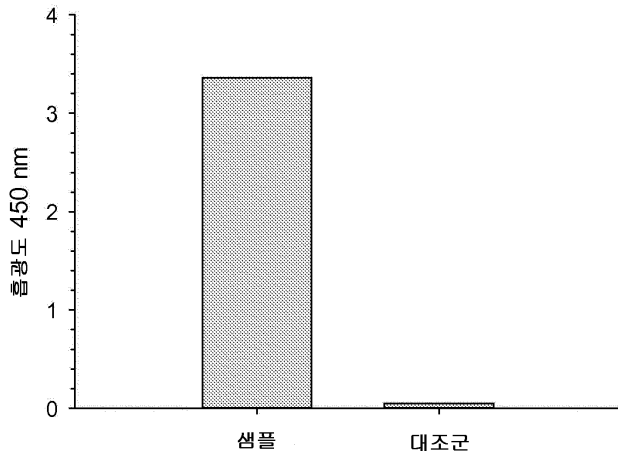
도면32

TGF-베타 수용체 2 캡처 ELISA



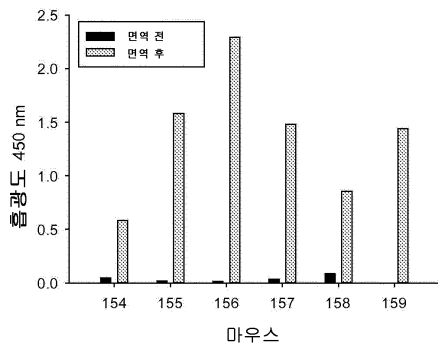
도면33

TGF-베타 수용체 2 시퀀스와
HuTGF-베타 시퀀스의 결합



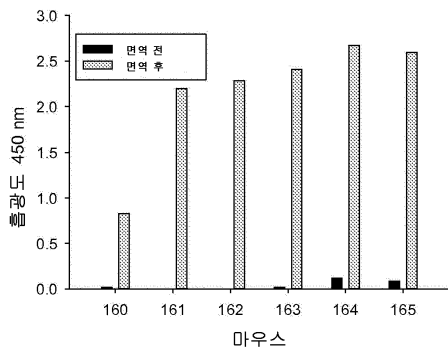
도면34

rhIGF와 1/100 희석의 그룹 1 혈청의 결합



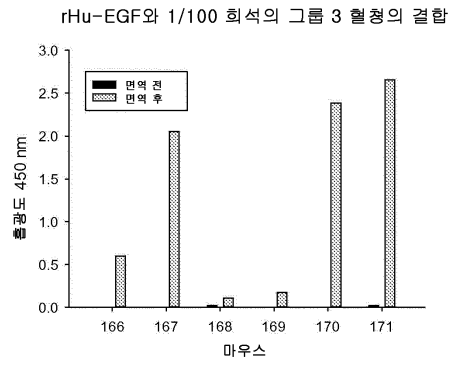
도면35

rhEGF와 1/100 희석의 그룹2 혈청의 결합

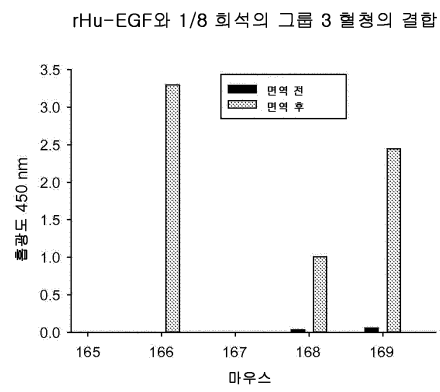


도면36

a)



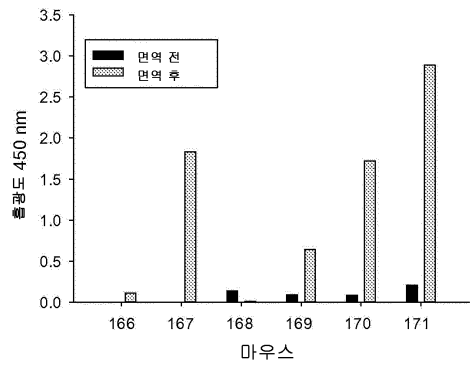
b)



도면37

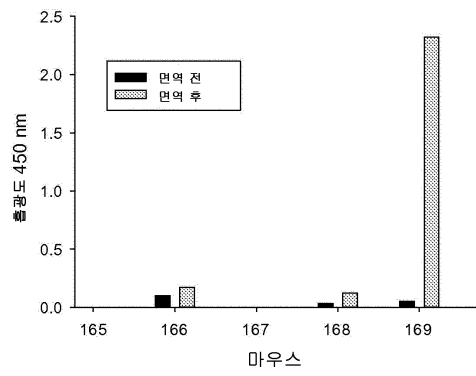
a)

rHu-IGF와 1/100 희석의 그룹 3 혈청의 결합



b)

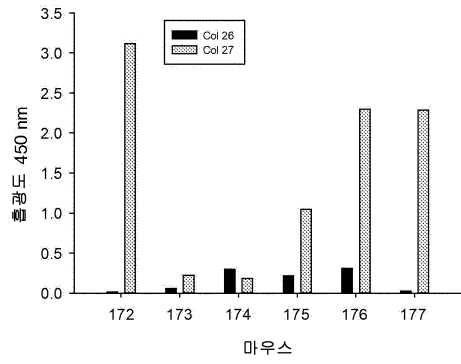
rHu-IGF와 1/8 희석의 그룹 3 혈청의 결합



도면38

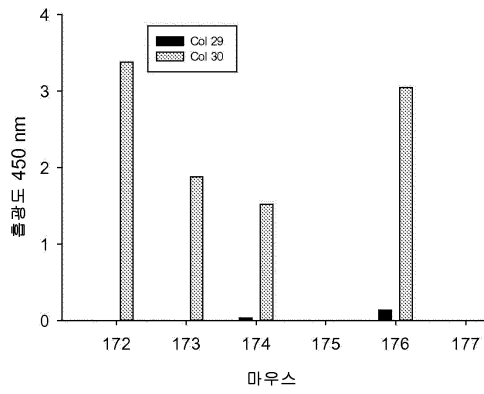
a)

rHu-EGF와 1/100 희석의 그룹 4 혈청의 결합



b)

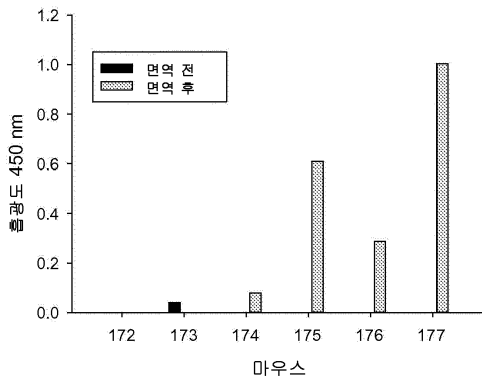
rHu-EGF와 1/8 희석의 그룹 4 혈청의 결합



도면39

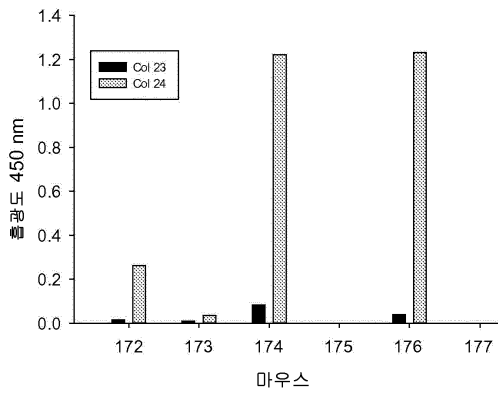
a)

rHu-IGF와 1/100 희석의 그룹 4 혈청의 결합



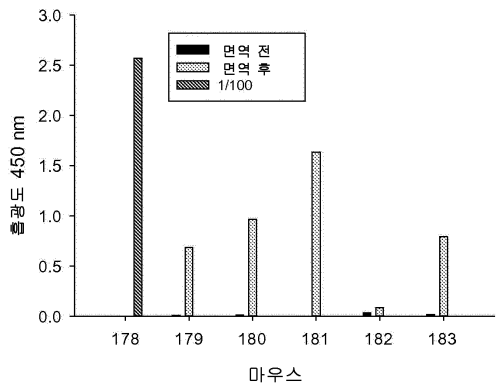
b)

rHu-IGF와 1/8 희석의 그룹 4 혈청의 결합



도면40

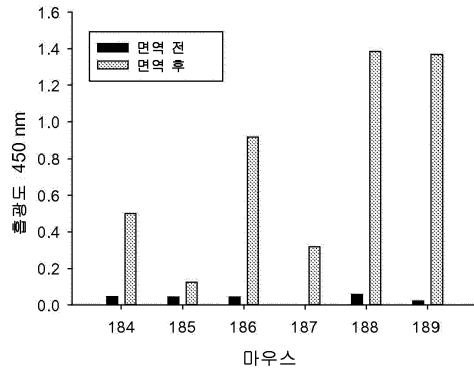
rHu-IGF와 1/8 또는 1/100 희석의 그룹 5 혈청의 결합



도면41

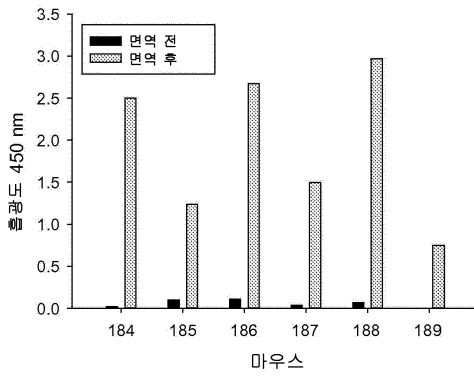
a)

rHu-IGF와 1/100 희석의 그룹 6 혈청의 결합

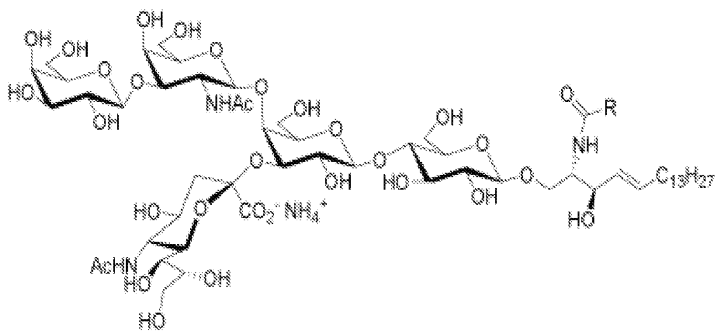


b)

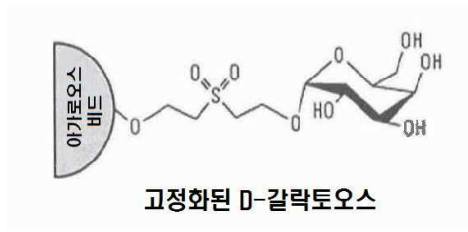
rHu-EGF와 1/100 희석의 그룹 6 혈청의 결합



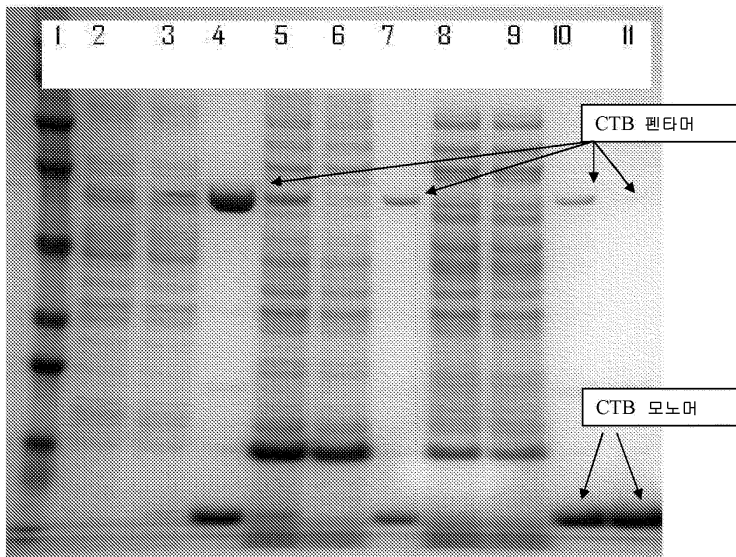
도면42



도면43



도면44



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOVEN 3 LIMITED

<120> RECOMBINANT PROTEINS AND THEIR THERAPEUTIC USES

<130> 73165.4-PCT

<140> PCT/IB2012/002876

<141> 2012-11-21

<150> 61/654,401

<151> 2012-06-01

<150> 61/563,128

<151> 2011-11-23

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 1
 Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala

1 5 10

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 2
 Ser Leu Ala Gly Ser Ser Gly Ala Leu Ser Lys

1 5 10

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 3
 Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 4

Ser Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag"

<400> 5

His His His His His His

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Gly Ser Ser Gly

1
 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 8
 Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 9
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 10
 Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5
 <210> 11
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 11
 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 12
 Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly
 1 5 10
 <210
 > 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 13
 Gly Gly Ser Gly Gly Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 14

Ser Gly Gly Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Gly Gly Ser Gly Gly Thr Arg Pro Ser Thr Ala Ala Thr Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn Ser Asp Ser Glu Cys

1 5 10 15

Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr

20 25 30

Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg Gly
 50 55 60

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

 Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg
 130 135 140
 Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu
 145 150 155 160
 Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile
 165 170 175
 Ser Met Ala Asn
 180
 <210> 21
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

 1 5 10 15
 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30
 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45
 Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 22

<211> 53

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 22

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15
 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30
 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45
 Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 23

<211> 53

<212> PRT

<213> Macaca sp.

<400> 23

Asn Ser Asp Ser Gly Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15

 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30
 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45
 Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 24

<211> 53

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

Asn Ser Asn Thr Gly Cys Pro Pro Ser Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu Asn

1 5 10 15

Gly Gly Val Cys Met Tyr Val Glu Ser Val Asp Arg Tyr Val Cys Asn

 20 25 30

Cys Val Ile Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln His Arg Asp Leu Arg

 35 40 45

Trp Trp Lys Leu Arg

50

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 25

Met Tyr Val Glu Ser Val Asp Arg Tyr Val Cys Asn Cys Val Ile Gly

1 5 10 15

Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln His Arg Asp Leu Arg Trp Trp Asn Trp

 20 25 30

Arg

<210> 26

<211> 53

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Asn Ser Tyr Pro Gly Cys Pro Ser Ser Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu Asn

1 5 10 15

Gly Gly Val Cys Met His Ile Glu Ser Leu Asp Ser Tyr Thr Cys Asn

 20 25 30

Cys Val Ile Gly Tyr Ser Gly Asp Arg Cys Gln Thr Arg Asp Leu Arg

 35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 27

<211> 53

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 27

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

50

<210> 28

<211> 52

<212> PRT

<213> *Felis catus*

<400> 28

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

50

<210> 29

<211> 52

<212> PRT

<213> *Canis lupus*

<400> 29

Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Pro Ser Ser Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu Tyr
 1 5 10 15
 Asn Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Val Asp Arg Tyr Ala Cys Asn

20 25 30
 Cys Val Phe Gly Tyr Val Gly Glu Arg Cys Gln His Arg Asp Leu Lys
 35 40 45

Trp Glu Leu Arg
 50

<210> 30

<

211> 53

<212> PRT

<213> *Equus caballus*

<400> 30

Asn Ser Tyr Gln Glu Cys Ser Gln Ser Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu His
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Cys Val Tyr Leu Val Gln Val Asp Thr His Ala Cys Asn
 20 25 30

Cys Val Val Gly Tyr Val Gly Glu Arg Cys Gln His Gln Asp Leu Arg
 35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg
 50

<210> 31

<211

> 48

<212> PRT

<213> *Taeniopygia guttata*

<400> 31

Cys Pro Pro Ser Tyr Glu Ser Tyr Cys Leu His Gly Gly Val Cys Asn
 1 5 10 15
 Tyr Val Ser Asp Leu Gln Asp Tyr Ala Cys Asn Cys Val Thr Gly Tyr
 20 25 30

Val Gly Glu Arg Cys Gln Phe Ser Asp Leu Glu Trp Trp Glu Gln Arg
 35 40 45

<210> 32

<211> 46

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 32

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

<210> 33

<211> 47

<212> PRT

<213> Xenopus sp.

<400> 33

Glu Cys Pro Leu Ala Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu Asn Gly Gly Val Cys

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

<210> 34

<211> 53

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 34

Asn Gly Val Gln Ser Cys Pro Ser Thr His Asp Ser Tyr Cys Leu Tyr
 1 5 10 15

 Asp Gly Val Cys Phe Tyr Phe Pro Glu Met Glu Ser Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30
 Cys Val Leu Gly Tyr Met Gly Glu Arg Cys Gln Phe Ser Asp Leu Glu
 35 40 45
 Trp Trp Glu Leu Gln
 50

<210> 35

<211> 38

<212> PRT

<213> Branchiostoma sp.

<400> 35

Cys Pro Pro Arg Tyr Glu Gly Phe Cys Leu His Gly Gly Ile Cys Phe
 1 5 10 15

Tyr Val Asp Arg Leu Gly Val Gly Cys Ser Cys Pro Val Met Tyr Glu
 20 25 30

Gly Glu Arg Cys Gln Tyr
 35

<210> 36

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 36

His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn Ser Asp Ser Glu Cys
 1 5 10 15

Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg Ser
 50 55 60

Gly Gly Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn
 65 70 75 80

Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser
 85 90 95

Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe Lys Asn Gly Ala

100 105 110
 Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn
 115 120 125

Asn Lys Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn Ser Ser
 130 135 140
 Gly Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys
 145 150 155 160
 Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys
 165 170

<210> 39

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 39

His His His His His His Ile Glu Gly Arg Gly Pro Glu Thr Leu Cys
 1 5 10 15
 Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly
 20 25 30
 Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala
 35 40 45
 Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu
 50 55 60

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

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

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

Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala
 180 185

<210> 41

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 41

His His His His His His Ile Glu Gly Arg Thr Pro Gln Asn Ile Thr
 1 5 10 15
 Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp
 20 25 30

Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala
 35 40 45

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

 Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala
 100 105 110
 Asn Ser Ser Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu
 115 120 125
 Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu
 130 135 140
 Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys
 145 150 155 160

 Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys
 165 170 175
 Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro
 180 185 190
 Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val
 195 200 205
 Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser
 210 215 220

Cys Lys Cys Ser

225

<210> 42

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

165 170 175
 Asp Ile Pro Gln Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Thr Ser Gly Gly Gly
 180 185 190
 Gly Ser Gly Gly Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr
 195 200 205

His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr
 210 215 220
 Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe Lys Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser
 245 250 255
 Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr
 260 265 270

Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr
 275 280 285
 Pro His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn
 290 295

<210> 44
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 44

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

polypeptide"

<400> 45

His His His His His His Ile Glu Gly Arg Thr Pro Gln Asn Ile Thr
 1 5 10 15
 Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp
 20 25 30
 Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala
 35 40 45
 Ile Ile Thr Phe Lys Asn Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly
 50 55 60

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

 Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp
 130 135 140
 Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys
 145 150 155 160
 Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala Leu Glu Cys Val Pro Thr Ser Glu
 165 170 175
 Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln
 180 185 190

 His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Ser Arg Cys Glu Cys Arg
 195 200 205
 Pro Lys Lys Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
 210 215 220
 Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
 225 230 235 240

Gly Ala Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 245 250 255

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 260 265 270

Ser Thr Gly Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 275 280 285

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 290 295 300

Cys Arg Cys Met Ser
 305

<210> 46

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 46

His His His His His His Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
 20 25 30

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
 35 40 45

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
 50 55 60

Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
 85 90 95

Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
 100 105 110

Arg Ser Cys Lys Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Thr Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr

130 135 140

His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Ser Gln His Ile Asp Ser Gln

180 185 190

Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu

195 200 205

Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro

210 215 220

His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn

225 230

<210> 47

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 47

His His His His His His Ile Glu Gly Arg Ala Val Lys Phe Pro Gln

1 5 10 15

Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys

20 25 30

Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln

35 40 45

Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu

