



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월17일
(11) 등록번호 10-0838507
(24) 등록일자 2008년06월10일

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7008507
(22) 출원일자 2002년06월28일
심사청구일자 2005년12월28일
번역문제출일자 2002년06월28일
(65) 공개번호 10-2002-0084424
(43) 공개일자 2002년11월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/035568
국제출원일자 2000년12월28일
(87) 국제공개번호 WO 2001/47541
국제공개일자 2001년07월05일

(30) 우선권주장
60/173,390 1999년12월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

해당사항 없음.

전체 청구항 수 : 총 31 항

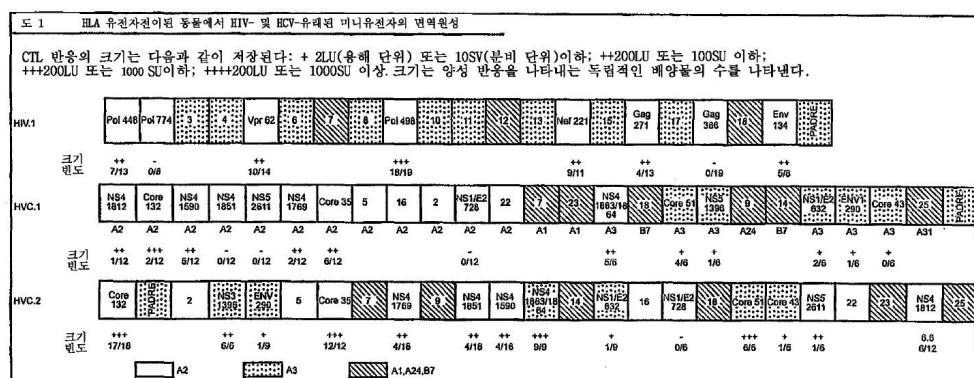
심사관 : 이선희

(54) 최적화된 미니유전자 및 이에 의해 암호화된 웹타이드

(57) 요약

본 발명은 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 자세하게는, 본 발명은 폴리에피토프 백신 및 증가된 면역원성을 제공하는 이러한 백신을 설계하는 방법에 관한 것이다. 특정 양태로서, 폴리에피토프 백신은 상기 작제물의 최적화된 면역원성을 제공하는 미니유전자에 의해 암호화된다.

대표도



(72) 발명자

리빙스톤브라이언디

미국캘리포니아주92129샌디에고카코코드13555

베이커테니스마리

미국캘리포니아주92126

샌디에고카미니토라바#2111575

뉴만마크제이

미국캘리포니아주92009

칼스바드센이사밸스트리트6603에이

(81) 지정국

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

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

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

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

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

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 인간 백혈구 항원(HLA) I형 세포독성 T 림프구(CTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프(motif) 또는 슈퍼모티프(supermotif)를 함유하는 2개 이상의 에피토프를 선택하는 단계; 및
- (ii) 상기 2개 이상의 CTL 에피토프를 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 CTL 에피토프 중 하나 이상의 C-말단에, 라이신(K), 아르기닌(R), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 시스테인(C) 및 트레오닌(T)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 CTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 도입시키는 단계
를 포함하는, 최적화된 멀티에피토프 폴리펩타이드의 제조 방법.

청구항 2

- (i) 인간 백혈구 항원(HLA) II형 헬퍼 T 림프구(HTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 2개 이상의 에피토프를 선택하는 단계; 및
- (ii) 상기 2개 이상의 HTL 에피토프를 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 HTL 에피토프 중 하나 이상의 C-말단에, 글리신(G), 프롤린(P) 및 아스파라긴(N)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 도입시키는 단계
를 포함하는, 최적화된 멀티에피토프 폴리펩타이드의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기가 G, P 및 N으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 5개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기가 GPGPG인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기가 A 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기가 K, R, N, G 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드에 포함되는 HLA 에피토프의 C-말단에 인접한 HLA 에피토프의 N-말단 잔기를 K, R, N, G 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 잔기로 치환시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입될 에피토프를, 형성되는 접합 에피토프의 수를 최소화하는 순서를 제공하도록 초기에 분류하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

- (i) 멀티에피토프 폴리펩타이드를 세포내로 도입시키는 단계; 및

(ii) 멀티에피토프 폴리펩타이드가, 당해 멀티에피토프 폴리펩타이드내에 포함된 모든 에피토프가 HLA 프로세싱 경로에 의해 생성되도록 HLA 프로세싱 경로에 의해 프로세싱되는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제2항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입될 에피토프를, 형성되는 접합 에피토프의 수를 최소화하는 순서를 제공하도록 초기에 분류하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

다수의 HLA 에피토프 펩타이드, 및 라이신(K), 아르기닌(R), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 시스테인(C) 및 트레오닌(T)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 다수의 플랭킹 또는 스페이서 아미노산을 포함하며, 이때

- 상기 HLA 에피토프 펩타이드가 8 내지 13개의 아미노산 길이의 HLA I형 에피토프 펩타이드이고,
- 상기 플랭킹 또는 스페이서 아미노산의 조합이 하나 이상의 HLA 에피토프 펩타이드 사이에 위치하고,
- 상기 플랭킹 또는 스페이서 아미노산이 1 내지 약 8개의 아미노산 길이이고,
- 하나 이상의 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 조합이 다른 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 조합에 포함되는 아미노산 서열과는 상이한 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는, 폴리에피토프 작제물.

청구항 17

제16항에 있어서, HLA 에피토프 펩타이드가 다수의 HLA 에피토프 핵산에 의해 암호화되고 플랭킹 또는 스페이서 아미노산이 다수의 플랭킹 또는 스페이서 핵산에 의해 암호화된 폴리에피토프 작제물.

청구항 18

제1항에 있어서,

(i) 인간 백혈구 항원(HLA) II형 헬퍼 T 림프구(HTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 2개 이상의 에피토프를 선택하는 단계; 및

(ii) 상기 2개 이상의 HTL 에피토프를 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 HTL 에피토프 중 하나 이상의 C-말단에, 글리신(G), 프롤린(P) 및 아스파라긴(N)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 도입시키는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제2항에 있어서,

- (i) 인간 백혈구 항원(HLA) I형 세포독성 T 림프구(CTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 2개 이상의 에피토프를 선택하는 단계; 및
(ii) 상기 2개 이상의 CTL 에피토프를 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 CTL 에피토프 중 하나 이상의 C-말단에, K, R, N, Q, G, A, S, C 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 CTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 도입시키는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 10개 이상의 CTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 20개 이상의 CTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 30개 이상의 CTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 40개 이상의 CTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 10개 이상의 HTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 20개 이상의 HTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 30개 이상의 HTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 멀티에피토프 폴리펩타이드가 40개 이상의 HTL 에피토프를 함유하는 방법.

청구항 28

- (i) 인간 백혈구 항원(HLA) I형 세포독성 T 림프구(CTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 에피토프를 암호화하는 2개 이상의 핵산 서열을 선택하는 단계; 및
(ii) 상기 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열을 멀티에피토프 폴리뉴클레오타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열 중 하나 이상의 C-말단에, 라이신(K), 아르기닌(R), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 시스테인(C) 및 트레오닌(T)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 CTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 도입시키는 단계

를 포함하는, 최적화된 멀티에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 제조 방법.

청구항 29

- (i) 인간 백혈구 항원(HLA) II형 헬퍼 T 림프구(HTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프

를 함유하는 에피토프를 암호화하는 2개 이상의 핵산 서열을 선택하는 단계; 및

(ii) 상기 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열을 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열 중 하나 이상의 C-말단에, 글리신(G), 프롤린(P) 및 아스파라гин(N)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 도입시키는 단계

를 포함하는, 최적화된 멀티에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 제조 방법.

청구항 30

제2항에 있어서,

(i) 멀티에피토프 폴리펩타이드를 세포내로 도입시키는 단계; 및

(ii) 멀티에피토프 폴리펩타이드가, 당해 멀티에피토프 폴리펩타이드내에 포함된 모든 에피토프가 HLA 프로세싱 경로에 의해 생성되도록 HLA 프로세싱 경로에 의해 프로세싱되는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제18항에 있어서, 2개 이상의 CTL 에피토프 및 2개 이상의 HTL 에피토프를 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 CTL/HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 스페이서를 상기 2개 이상의 CTL과 상기 2개 이상의 HTL 에피토프 사이에 도입시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제19항에 있어서, 2개 이상의 HTL 에피토프 및 2개 이상의 CTL 에피토프를 멀티에피토프 폴리펩타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 CTL/HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 스페이서를 상기 2개 이상의 CTL과 상기 2개 이상의 HTL 에피토프 사이에 도입시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제28항에 있어서,

(i) 인간 백혈구 항원(HLA) II형 헬퍼 T 림프구(HTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 에피토프를 암호화하는 2개 이상의 핵산 서열을 선택하는 단계; 및

(ii) 상기 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열을 멀티에피토프 폴리뉴클레오타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열 중 하나 이상의 C-말단에, G, P 및 N으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 도입시키는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제29항에 있어서,

(i) 인간 백혈구 항원(HLA) I형 세포독성 T 림프구(CTL) 에피토프인, HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 에피토프를 암호화하는 2개 이상의 핵산 서열을 선택하는 단계; 및

(ii) 상기 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열을 멀티에피토프 폴리뉴클레오타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 상기 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열 중 하나 이상의 C-말단에, K, R, N, Q, G, A, S, C 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 CTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 플랭킹 또는 스페이서 아미노산 잔기 1개 이상을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 도입시키는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열 및 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열을 멀티에피토프 폴리뉴클레오타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 CTL/HTL 접합 에피토프의 발생을

차단하는 스페이서를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열과 상기 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열 사이에 도입시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열 및 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열을 멀티에피토프 폴리뉴클레오타이드 내로 도입시키고, 이러한 도입 과정 동안에 CTL/HTL 접합 에피토프의 발생을 차단하는 스페이서를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 2개 이상의 CTL 에피토프-암호화 핵산 서열과 상기 2개 이상의 HTL 에피토프-암호화 핵산 서열 사이에 도입시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

명세서

- <1> <관련 출원에 대한 상호 참조>
- <2> 본 출원은 본원중 참고로 인용된 1999.12.28일자로 출원된 미국 가출원번호 60/173,390에 대하여 우선권을 주장한다.
- <3> <연방정부의 지원을 받은 연구 및 개발하에 연구된 본 발명의 권리에 관한 설명>
- <4> 본 발명은 연방정부의 보조기금으로 연구한 것이다. 따라서, 미국 정부는 본 발명에 관하여 일부 권리를 갖고 있다.

배경기술

- <5> 본 발명은 생물학 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 폴리에피토프 백신 및 증가된 면역원성을 제공하는 상기 백신을 설계하는 방법에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 폴리에피토프 백신은 최적화된 면역원성의 작제물을 제공하는 미니유전자(minigene)에 의해 암호화된다.
- <6> 멀티에피토프("미니유전자") 백신에 관한 기술은 현재 개발되고 있는 기술이다. 다수의 에피토프에 대하여 동시에 면역 반응을 유도할 수 있는 기술에 관한 몇몇 연구가 각각 개발되었다. 예를 들어, 다수의 T 세포 특이성에 대하여 반응을 유도하고 검출할 수 있었다. 둘란 등[Doolan et al., *Immunity*, Vol. 7(1):97-112(1997)]은 자연 상태에서 단독 공여체 유래의 PBMC를 사용하여 17가지 정도의 많은 P. 팔시파럼 (*P. falciparum*) 에피토프에 대한 기억(recall) T 세포 반응을 동시에 검출하였다. 이와 유사하게, 베르토니와 동료[J Clin Invest, Vol. 100(3):503-13(1997)]는 단독 공여체 중에서 12개의 상이한 HBV 유래의 에피토프에 대한 동시적 반응을 검출하였다. 멀티에피토프 DNA 미니유전자 백신에 의한 면역화시, 다중 T 세포 반응을 유도한 여러 실례가 보고되었다. 예를 들어, 모든 에피토프가 면역원성 및/또는 항원성인 약 10개의 MHC I형 에피토프로 이루어진 미니유전자 백신이 보고되었다. 구체적으로, 9개의 EBV 유래의 에피토프로 이루어진 미니유전자 백신[Thomson et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.92(13):5845-9(1995)], 7개의 HIV 유래의 에피토프로 이루어진 미니유전자 백신[Woodberry et al., J. Virol., Vol.73(7):5320-5(1999)], 10개의 쥐 유래의 에피토프로 이루어진 미니유전자 백신[Thomson et al., J. Immunol., Vol.160(4):1717-23(1998)] 및 10개의 종양 유래의 에피토프로 이루어진 미니유전자 백신[Mateo et al., J. Immunol., Vol. 163(7):4058-63(1999)]은 활성적인 것으로 밝혀졌다. 또한, HBV 및 HIV에서 유래하는 9개의 상이한 HLA-A2.1- 및 A11- 제한된 에피토프를 암호화하는 멀티에피토프 DNA 플라스미드는 모든 에피토프에 대하여 CTL을 유도함이 밝혀졌다[Ishioka et al., J. Immunol., Vol. 162(7):3915-25(1999)].
- <7> 따라서, 다수의 MHC I형(즉, CTL) 에피토프를 함유하는 미니유전자 백신이 설계될 수 있으며, 모든 에피토프에 대하여 제시(presentation)되고 인식(recognition)될 수 있다. 하지만, 멀티에피토프 작제물의 면역원성은 많은 변수들에 의해 상당한 영향을 받는 것으로 보이며, 그 수는 지금까지 알려지지 않고 있다. 예를 들어, 여러 백신 작제물에서 발현되는 동일한 에피토프의 면역원성(또는 항원성)은 수 등급의 차이가 날 수 있다. 따라서, 멀티에피토프 백신 작제물을 최적화하기 위한 전략을 확인할 필요가 있다. 이러한 최적화는 유효한 면역 반응의 유도 및 궁극적으로 임상 효능 측면에서 중요한 문제이다. 따라서, 본 발명은 다수의 에피토프를 포함하는 폴리에피토프 백신의 항원성 및 면역원성을 최적화하는 방법 및 이 방법에 따라 생성된 최적화된 폴리에피토프 백신, 특히 미니유전자 백신을 제공하는 것이다.
- <8> 다음 문단에서는 MHC I형 및 II형 분자와 관련하여 미니유전자 면역원성, 에피토프 프로세싱(processing) 및 항

원 제시 세포(APC)에서의 제시에 잠재적으로 영향을 미치는 주요 변수 몇 가지에 대하여 간략히 검토하고자 한다.

<9> <면역우성>

<10> 복합적인 외래 병원균에 의해 암호화되는 수천개의 가능한 펩타이드들 중에서, MHC I형 항원에 결합할 수 있고, 그 결과 T 세포에 의해 인식될 수 있는 펩타이드 형태를 이루는 펩타이드는 소량뿐이다. 멀티에피토프 백신 개발에 명백한 잠재적 영향력이 있는 이 현상을 면역우성(immunodominance)이라 한다[Yewdell et al., Annu Rev Immunol., 17:51-88(1999)]. 면역우성에 영향을 미치는 주요 변수에는 몇가지가 있다. 본 명세서에서는, 세포 내 프로세싱의 결과로서 정성적 측면과 정량적 측면에서 모두 적당한 펩타이드의 생성에 영향을 미치는 변수에 대하여 설명할 것이다.

<11> <접합(junctional) 에피토프>

<12> 접합 에피토프는 2가지 다른 에피토프의 병렬시 생성되는 에피토프를 의미한다. 이 새로운 에피토프는 제1 에피토프 유래의 C-말단부와 제2 에피토프 유래의 N-말단부로 이루어진다. 접합 에피토프의 제조는, I형 및 II형의 제한된 에피토프들 모두에 대하여 멀티에피토프 미니유전자 백신을 설계함에 있어 다음과 같은 이유로 중요한 문제가 된다. 첫째, 일반적으로 HLA 유전자전이된(transgenic) 실험 동물을 가지고 면역원성을 시험하는, 인간 에피토프로 이루어지거나 또는 인간 에피토프를 포함하는 미니유전자를 개발할 때, 쥐 에피토프의 생성은 바람직하지 않은 면역우성 효과를 나타낼 수 있다. 둘째, 인간 HLA I형 또는 II형 분자에 대한 의도하지 않은 새로운 에피토프의 생성은, 백신 수용체에서, 표적에 의해 유도된 T 세포 반응인 종양이나 감염된 세포에 의하여 발현되지 않는 새로운 T 세포 특이성을 유도할 수 있다. 이러한 반응은 정의상으로는 관련이 없고 효력이 없는 것이며 원치 않는 면역우성 효과를 나타내어 심지어 역효과를 초래할 수도 있다.

<13> 접합 에피토프의 존재는 다양한 여러 실험 상태에서 상세하게 보고되어 있다. 제프터(Gefter)와 동료들은, 2가지 상이한 II형 제한된 에피토프를 병치하고 선상에서 함께 합성한 시스템에서 그 효과를 처음으로 입증하였다 [Perkins et al., J. Immunol., Vol. 146(7):2137-44(1991)]. 이 효과는 매우 분명하여 이 새로운 접합 에피토프에 의해 그 에피토프들의 면역계 인식이 완전히 "침묵"될 수 있다[Wang et al., Cell Immunol., Vol.143(2):284-97(1992)]. 또한, 접합 에피토프에 대하여 유도된 헬퍼 T 세포가, HLA-A2 제한된 HBV 유래의 면역우성 CTL 에피토프와 범발성(universal) 과상풍 톡소이드 유래의 HTL 에피토프로 이루어진 합성 리포펩타이드에 의한 면역화의 결과로서 인체에서 관찰되었다[Livingston et al., J. Immunol., Vol.159(3):1383-92(1997)]. 따라서, 접합 에피토프의 생성은 폴리에피토프 작제물의 설계시에 고려해야 하는 주요 문제이다.

<14> 본 발명은 이러한 문제를 해결하고 접합 에피토프의 발생을 없애거나 최소화하는 방법을 제공한다.

<15> <플랭킹(flanking) 영역>

<16> I형 제한된 에피토프는 복잡한 과정에 의해 생성된다[Yewdell et al., Annu. Rev. Immunol., 17:51-88(1999)]. 엔도프로테아제, 및 액소프로테아제에 의한 잠재적 트리밍(trimming)과 관련된 제한적 단백분해작용에 이어서 항원 프로세싱 연관 트란스포터(TAP) 분자에 의해 소포체(ER) 막을 통해 전좌가 일어난다. 항원성 펩타이드 및 이의 전구체 생성에 관여하는 주요 세포질 프로테아제 복합체는 프로테오좀이고[Niedermann et al., Immunity, Vol.2(3):289-99(1995)], 또한 CTL 전구체의 ER 트리밍도 증명되었다[Paz et al., Immunity Vol.11(2):241-51(1999)]. 에피토프의 C 말단 및 N 말단에 직접 접해 있는 잔기들이 에피토프 생성 효율에 영향을 미치는지의 여부는 오랫동안 논쟁의 대상이 되어왔다.

<17> 프로세싱된 에피토프의 수율과 이용가능성은 면역원성을 측정하는데 있어서 주요 변수로서 관여하며, 따라서 면역 반응 정도가 MHC에 의해 결합되고 T 세포 인식으로 나타나는 에피토프 양에 정비례할 수 있다는 점에서 전반적인 미니유전자 효능에 주요 영향을 미칠 수 있다는 것이 분명하다. 몇몇 연구를 통해 그 증거가 제시되었다. 예를 들어, 바이러스 특이적인 CTL의 유도가 에피토프 밀도와 거의 비례하는 것으로 관찰되었다[Wherry et al., J. Immunol., Vol.163(7):3735-45(1999)]. 또한, 예비프로세싱된 최적 에피토프를 암호화하는 재조합 미니유전자는 자연상태의 전장 단백질에 의해 관찰되는 양보다 다량의 에피토프 발현을 유도하는데 사용되었다[Anton et al., J. Immunol., Vol. 158(6):2535-42(1997)]. 일반적으로, 미니유전자에 의한 초회자극(priming)은 일부 예외도 보고되었지만[Iwasaki et al., Vaccine, Vol.17(15-16):2081-8(1999)], 전체 항원에 의한 초회자극보다 더 효과적인 것으로 밝혀졌다[Restifo et al., J. Immunol., Vol.154(9):4414-22(1995); Ishioka et al.,

J. Immunol., Vol. 162(7):3915-25(1999)].

<18>

연구 초기에는 에피토프내에 존재하는 잔기[Hahn et al., J.Exp.Med., Vol. 176(5):1335-41(1992)]가 주로 면역 원성을 조절하는 것으로 추정되었다. 이와 유사한 결론이 대부분 비관련 유전자 또는 동일 유전자이지만 다른 위치에 있는 에피토프의 이식에 바탕을 둔 다른 연구들을 통해 얻어졌다[Chimini et al., J.Exp.Med., Vol. 169(1):297-302(1989); Hahn et al., J.Exp.Med., Vol. 174(3):733-6(1991)]. 그러나, 다른 실험들[Dei Val et al., Cell, Vol. 66(6):1145-53(1991); Hahn et al., J.Exp.Med., Vol. 176(5):1335-41(1992)]은, CTL 에피토프에 직접 인접해 있는 잔기들이 인식에 직접 영향을 미칠 수 있음을 암시하였다[Couillin et al., J.Exp.Med., Vol. 180(3):1129-34(1994); Bergmann et al., J.Viro., Vol. 68(8): 5306-10(1994)]. 미니유전자 백신의 경우에는 논란이 재개되었다. 샤크트리와 동료[참조 문헌: Shastri et al., J.Immunol., Vol. 155(9):4339-46(1995)]는 T 세포 반응이 N-말단 플랭킹 잔기를 변화시켜도 크게 영향을 받지 않지만 C 말단 플랭킹 잔기 하나를 추가하면 그 반응이 억제된다는 것을 발견하였다. 가장 급격한 억제는 C 말단 플랭킹 잔기로서 이소로이신, 로이신, 시스테인 및 프롤린에 의해 관찰되었다. 이에 반해, 질리아디 등[참조 문헌: Gileadi et al., Eur.J.Immunol., Vol. 29(7):2213-22(1999)]은 마우스 인플루엔자 바이러스 에피토프의 N 말단에 위치한 잔기들의 작용에 의한 현저한 효과를 보고하였다. 한편, 베르그만과 동료들은 방향족 잔기, 염기 잔기 및 알라닌 잔기가 효과적으로 에피토프 인식을 지원하는 반면, G 및 P 잔기는 강하게 저해한다는 것을 발견하였다[참조 문헌: Bergmann et al., J.Immunol., Vol. 157(8):3242-9(1996)]. 이에 반해, 리폴리스[참조 문헌: Lippolis et al., J.Viro., Vol. 69(5):3134-46(1995)]는 플랭킹 잔기의 치환에 인식에 영향을 미치지 않는다고 결론을 내렸다. 하지만, 여기에서는 프로테오좀 특이성에 영향을 미치지 않을 정도의 다소 보존적인 치환만이 시험되었다.

<19>

이러한 영향의 특이성, 일반적으로 천연의 에피토프의 특이성은 프로테오좀 특이성과 대략적으로 상관관계가 있는 것으로 보인다. 예를 들면, 프로테오좀 특이성은 염기성 아미노산 다음에 절단작용을 나타낸다는 점에서 부분적으로 트립신과 유사하다[Niedermann et al., Immunity, Vol. 2(3):289-99(1995)]. 그럼에도 불구하고, 소수성 잔기와 산성 잔기의 카르복실 부위도 또한 효과적으로 절단할 수 있다. 이러한 특이성과 일관되는 것으로, 셔만(Sherman)과 동료들은 p53 에피토프의 C 말단 다음 위치에서 R에서 H로의 돌연변이가 프로테오좀을 매개로 한 단백질의 프로세싱에 영향을 미친다는 것을 발견하였다[Theobald et al., J.Exp.Med., Vol. 188(6):1017-28(1998)]. 다른 몇몇 연구[Hanke et al., J.Gen.Viro., Vol. 79(Pt1):83-90(1998); Thomson et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 92(13):5845-9(1995)]에서는 최소 에피토프들로 미니유전자를 제작할 수 있어서, 플랭킹 영역을 이용한 추가 최적화가 가능할 지라도 그 플랭킹 서열들이 필요하지는 않을 것이라고 시사하였다.

<20>

종합하여 보면, HLA I형 에피토프에 있어서 CTL 에피토프의 프로세싱 및 제시에 미치는 플랭킹 영역의 영향은 아직 밝혀져 있지 않다. 또한, 플랭킹 영역의 변화에 따른 효과는 미니유전자 백신에 대해서 체계적으로 분석이 실시된 바 없다. 따라서, 일반적으로 인간 I형에 의해 제한된 에피토프를 암호화하는 미니유전자 백신을 이용하는 분석법이 요구되고 있다. 이에, 본 발명은 이와 같은 분석법을 제공하며, 이에 따라서 면역원성과 항원성이 최적화된 폴리에피토프 백신 제작물, 및 이러한 제작물을 설계하는 방법을 제공한다.

<21>

HLA II형 웨타이드 복합체도 또한 HLA I형 프로세싱과는 상이한 복잡한 일련의 과정의 결과로서 생성된다. 그 프로세싱 경로는 불변쇄(Ii)와의 결합 과정, 특정 구역으로의 수송 과정, Ii의 CLIP로의 분해 과정 및 HLA-DM에 의해 촉매화된 CLIP의 제거 과정을 포함한다[Blum et al., Crit. Rev.Immunol., Vol. 17(5-6): 411-7(1997); Arndt et al., Immunol. Res., Vol. 16(3): 261-72(1997)]. 이 때, 일반적으로 각종 카텝신이 매우 중요한 역할을 하며, 특히 카텝신 S와 L은 Ii 분해에 중요한 역할을 한다[Nakagawa et al., Immunity, Vol. 10(2):207-17(1999)]. 그러나, 기능적 에피토프의 생성 면에서 볼 때, 상기 과정은 다소 선택성이 떨어지는 것으로 나타나며[Chapman H.A., Curr.Opin.Immunol., Vol. 10(1):93-102(1998)], 다양한 크기의 웨타이드가 MHC II형에 결합할 수 있다[Hunt et al., Science, Vol. 256(5065): 1817-20(1992)]. 가능성 있는 웨타이드 대부분 또는 전부가 생성되될 수 있는 것으로 나타난다[Moudgil et al., J.Immunol., Vol. 159(6): 2574-9(1997) 및 Thomson et al., J.Viro., Vol. 72(3):2246-52(1998)]. 따라서, 플랭킹 영역의 문제에 비하여, 접합 에피토프의 생성이 일부 특정 구체예에서는 보다 더 심각한 문제일 수 있다.

<22>

발명의 개요

<23>

본 발명은 폴리에피토프 백신의 효능을 최적화하는데 유용한 변수들에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폴리에피토프 제작물 및 이 제작물을 암호화하는 핵산(미니유전자)에 관한 것이다.

- <24> 일 관점으로서, 본 발명은 다수의 HLA 에피토프를 포함하고 HLA I형 프로세싱 경로에 제시되는 폴리에피토프 작제물을 설계하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 결합 에피토프의 수를 최소화하기 위하여 다수의 HLA 에피토프를 분류하는 단계; (ii) 폴리에피토프 작제물에 포함되는 HLA 에피토프의 C+1 위치에 K, R, N, Q, G, A, S, C 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 플랭킹 아미노산 잔기를 도입시키는 단계; (iii) CTL 또는 HTL 결합 에피토프의 발생을 차단하는 아미노산 스페이서 잔기 1개 이상을 폴리에피토프 작제물에 포함되는 2개의 에피토프 사이에 도입시키는 단계; 및 (iv) 결합 에피토프의 수가 최소이고 아미노산 스페이서 잔기 수도 최소이며 각 HLA 에피토프에 대한 C+1 위치에서 K, R, N, Q, G, A, S, C 또는 T의 수는 최대인 1개 이상의 폴리에피토프 작제물을 선택하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 스페이서 잔기는 공지된 HLA II형의 1차 앵커(anchor) 잔기가 아닌 잔기 중에서 각각 선택된다. 특정 구체예에서, 스페이서 잔기의 도입은 HTL 에피토프가 발생되지 않도록 한다. 이러한 스페이서는 종종 G, P 및 N으로 이루어진 그룹으로부터 각각 선택되는 5개 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 구체예에서, 스페이서는 GPGPG이다.
- <25> 일부 구체예에서, 스페이서 잔기의 도입은 CTL 에피토프의 발생을 차단하고, 이러한 스페이서는 A 및 G로 이루어진 그룹으로부터 각각 선택되는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 아미노산 잔기이다. 종종, 플랭킹 잔기가 CTL 에피토프의 C+1 위치에 도입되며, 플랭킹 잔기는 K, R, N, G 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- <26> 일부 구체예에서, 플랭킹 잔기는 스페이서 서열에 인접하게 위치한다. 본 발명의 방법은 또한 폴리에피토프 작제물에 포함되는 HLA 에피토프의 C 말단에 인접한 HLA 에피토프의 N 말단 잔기를 K, R, N, G 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 잔기로 치환시키는 것을 포함할 수도 있다.
- <27> 본 발명의 방법은 또한 폴리에피토프 작제물의 구조를 예측하는 단계, 및 추가로 최대 구조를 가진 1 이상의 작제물, 즉, HLA 프로세싱 경로를 통해 프로세싱되어 당해 작제물에 의해 포함되어지는 모든 에피토프를 생성하는 1 이상의 작제물을 선택하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- <28> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 청구의 범위 제1항 내지 제9항에 기재된 방법을 사용하여 제조한 폴리에피토프 작제물을 제공한다. 종종, 폴리에피토프 작제물에 의해 포함되어지는 에피토프들은 미니유전자에 의해 암호화되기도 한다. 바람직한 구체예에서, 미니유전자에 의해 암호화된 폴리에피토프 작제물은 도 9에 도시한 바와 같은 HIV-TT, HIV-DG 또는 HIV-TC이다.
- <29> 용어 정의
- <30> 본 발명은 다음 정의를 참조하면 보다 잘 이해될 수 있다.
- <31> 본 명세서 전반에 기술된 "결합 데이터" 결과는 종종 "IC₅₀"으로 나타낸다. IC₅₀은 결합 분석에서 대조 웨타이드의 결합 억제율이 50%인 웨타이드의 농도를 의미한다. 분석이 진행되는 조건에 따라(즉, HLA 단백질과 표지된 웨타이드 농도를 제한함), 이 값은 K_D값과 비슷해진다. 결합을 측정하는 분석법은 예를 들어 PCT 공개번호 WO94/20127 및 WO94/03205에 상세하게 설명되어 있다. IC₅₀값은 분석 조건이 변화하고 사용되는 특정 시약(예, HLA 제제 등)에 따라 종종 급격하게 변화할 수 있다. 예를 들어, HLA 분자의 초과 농도는 소정 리간드의 외견상 측정된 IC₅₀을 증가시킬 것이다. 또는, 결합은 대조 웨타이드에 대한 상대적 값으로 나타낸다. 특정 분석법의 민감도가 다소 차이가 있게되면, 시험된 웨타이드의 IC₅₀은 다소 변화할 수 있지만, 대조 웨타이드에 상대적인 결합은 크게 변하지 않을 것이다. 예를 들어, 대조 웨타이드의 IC₅₀을 10배 증가시키는 조건하에서 진행된 분석에서는 시험 웨타이드의 IC₅₀ 값도 10배 이동할 것이다. 따라서, 모호함을 없애기 위해 웨타이드가 결합제로서 우수한지, 보통인지, 불량인지 또는 음성인지를 IC₅₀값에 기초하여 표준 웨타이드의 IC₅₀값과 비교하여 평가한다. 또한, 결합은 다른 분석 시스템, 예컨대 살아있는 세포(예, Ceppellini et al., Nature 339:392, 1989; Christnick et al., Nature 352:67, 1991; Busch et al., Int. Immunol. 2:443, 1990; Hill et al., J. Immunol. 147:189, 1991; del Guercio et al., J. Immunol. 154:685, 1995), 세정제 용해물을 사용하는 무세포 시스템(예, Cerundolo et al., J. Immunol. 21:2069, 1991), 고정화된 정제 MHC(예, Hill et al., J. Immunol. 152, 2890, 1994; Marshall et al., J. Immunol. 152:4946, 1994), ELISA 시스템(예, Reay et al., EMBO J. 11:2829, 1992), 표면 플라스몬 공명(예, Khilko et al., J. Biol. Chem. 268:15425, 1993); 고유속의 용해상(High flux soluble phase) 분석법(Hammer et al., J. Exp. Med. 180:2353, 1994) 및 I형 MHC 안정화 또는 어셈

블리의 측정(예, Ljunggren et al., *Nature* 346:476, 1990; Schumacher et al., *Cell* 62:563, 1990; Townsend et al., *Cell* 62:285, 1990; Parker et al., *J. Immunol.* 149:1896, 1992)을 사용하는 분석 시스템으로 측정할 수 있다.

<32> "카르복실 말단" 또는 "카르복실 말단 위치"라는 에피토프내 잔기 위치의 표시는 웨타이드의 카르복실 말단에 가장 근접한 에피토프의 말단부에 있는 잔기 위치를 의미하는 것으로서, 하기 기재되는 바와 같은 통상적인 명명법을 사용하여 표시하였다. "C+1"은 에피토프의 C 말단 잔기 바로 다음의 잔기 또는 위치, 즉 에피토프의 C 말단에 접한 잔기를 의미한다. 폴리에피토프 작제물의 카르복실 말단에서 존재하는 에피토프의 "카르복실 말단 위치"는 사실상 폴리웨타이드의 카르복실 말단부에 상응하거나 상응하지 않을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 최적화된 폴리에피토프 작제물에 이용되는 에피토프는 모티프(motif)-함유 에피토프이고, 이 에피토프의 카르복실 말단은 특정 모티프에 상응하는 1차 앵커 잔기들에 따라 규정지어진다.

<33> "아미노 말단" 또는 "아미노 말단 위치"라는 에피토프내 잔기 위치의 표시는 웨타이드의 아미노 말단에 가장 근접한 에피토프의 말단부에 있는 잔기 위치를 의미하는 것으로서, 하기 기재되는 바와 같은 통상적인 명명법을 사용하여 표시하였다. "N-1"은 에피토프의 아미노 말단부(위치 번호 1)에서 에피토프에 직접 인접한 잔기 또는 위치를 의미한다. 폴리에피토프 작제물의 아미노 말단부에서 존재하는 에피토프의 "아미노 말단 위치"는 사실상 폴리웨타이드의 아미노 말단부에 상응하거나 상응하지 않을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 최적화된 폴리에피토프 작제물에 이용되는 에피토프는 모티프-함유 에피토프이고, 이 에피토프의 아미노 말단은 특정 모티프에 상응하는 1차 앵커 잔기들에 따라 규정지어진다.

<34> "컴퓨터" 또는 "컴퓨터 시스템"은 일반적으로 프로세서, 1개 이상의 정보 저장/검색 장치, 예컨대 하드 드라이브, 디스크 드라이브 또는 테이프 드라이브; 1개 이상의 입력 장치, 예컨대 키보드, 마우스, 터치 스크린, 또는 마이크로폰; 및 디스플레이 구조를 포함한다. 또한, 컴퓨터는 네트워크와 연결되는 통신 채널을 포함할 수 있다. 이러한 컴퓨터는 전술한 것 보다 더 많거나 적은 시스템을 포함할 수 있다.

<35> 본 명세서에 사용된 "작제물"이란 일반적으로 자연에 없는 조성물을 의미한다. 작제물은 합성 기법, 예컨대 재조합 DNA 제조 및 발현 또는 핵산이나 아미노산의 화학적 합성 기법으로 제조할 수 있다. 또한, 작제물은 한 물질에 다른 물질을 첨가하거나 병합하여 제조할 수 있으며, 그 결과물은 그 형태로는 자연에서 발견되지 않는 것이다. "폴리에피토프 작제물"은 복수의 에피토프를 포함한다.

<36> "교차반응성 결합"은 웨타이드가 1 이상의 HLA 분자에 의해 결합된 것을 나타내고, 동의어는 축퇴성 결합이다.

<37> "잠복 에피토프(cryptic epitope)"는 분리된 웨타이드로 면역화시 반응을 유도하지만, 그 에피토프를 함유하는 본래의 전체 단백질을 항원으로 사용한 경우에 당해 반응은 시험관내에서 교차반응성이 아니다.

<38> "우성 에피토프(dominant epitope)"는 천연의 전체 항원으로 면역화시 면역 반응을 유도하는 에피토프이다(예컨대, Sercarz, et al., *Annu. Rev. Immunol.* 11:729-766, 1993). 이러한 반응은 분리된 웨타이드 에피토프와 시험관내에서 교차반응성이다.

<39> 특정 아미노산 서열에 있어서, "에피토프"는 특정 면역글로불린에 의한 인식에 관여하는 아미노산 잔기의 세트, 또는 T 세포의 경우에는 T 세포 수용체 단백질 및/또는 주조직적합성 복합체(MHC) 수용체에 의한 인식에 필요한 잔기이다. 생체내 또는 시험관내 면역 시스템 환경에서 에피토프는 1차, 2차 및 3차 웨타이드 구조와 같은 분자와 전하의 집합적인 특징으로서, 면역글로불린, T 세포 수용체 또는 HLA 분자에 의해 인식되는 부위를 형성한다. 본 명세서 전반에서 에피토프와 웨타이드는 상호교환적으로 사용되었다. 또한, 본 발명의 에피토프를 포함하면서 이 보다 큰 분리 또는 정제된 단백질 또는 웨타이드 분자 역시 본 발명의 범위에 속하는 것이다.

<40> "플랭킹 잔기(flanking residue)"는 에피토프 다음에 위치하는 잔기이다. 플랭킹 잔기는 에피토프의 N 말단 또는 C 말단에 인접한 위치에 도입되거나 삽입될 수 있다.

<41> "면역원성 웨타이드" 또는 "웨타이드 에피토프"는 웨타이드가 HLA 분자에 결합하여 CTL 및/또는 HTL 반응을 유도하도록 대립형질-특이적 모티프(motif) 또는 슈퍼모티프(supermotif)를 포함하는 웨타이드이다. 따라서, 본 발명의 면역원성 웨타이드는 적당한 HLA 분자에 결합한 다음, 면역원성 웨타이드가 유래하는 항원에 대한 세포독성 T 세포 반응 또는 헬퍼 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

<42> 본 명세서에서 "불규칙 유사체"는 소정의 투여량에 대한 반응의 증가, 또는 동일한 반응을 얻는데 필요한 양이 적은 점으로 평가했을 때, 특정 T 세포에 대한 효능이 증가된 웨타이드를 의미한다. 불규칙 유사체의 잇점은 항원이 보다 효능이 있는 것이거나 또는 경제적일 수 있다(동일한 효과를 얻는데 보다 소량이 요구된다)는 점

등이다. 또한, 변형된 에피토프는 항원 특이적인 T 세포 무반응성(T 세포 내성)을 극복할 수 있을 수도 있다.

<43> "인간 백혈구 항원" 또는 "HLA"는 인간의 I형 또는 II형 주조직적합성 복합체(MHC) 단백질이다[예컨대, Stites, et al., IMMUNOLOGY, 8th Ed., Lange Publishing, Los Altos, CA(1994)].

<44> 본 명세서에 사용된 "HLA 슈퍼타입 또는 HLA 패밀리"는 공유된 웨타이드에 결합하는 특이성에 근거하여 분류한 HLA 문자 세트를 의미한다. 특정 아미노산 모티프를 보유하는 웨타이드에 대하여 다소 유사한 결합 친화성을 공유하는 HLA I형 문자는 상기 HLA 슈퍼타입으로 분류된다. HLA 슈퍼패밀리, HLA 슈퍼타입 패밀리, HLA 패밀리 및 HLA xx 유사 문자(여기에서 xx는 특정 HLA 타입을 의미한다)는 동의어이다.

<45> 본 명세서에 사용된 HLA I형 문자에 대한 "고친화성"이란 용어는 IC_{50} 또는 K_D 값이 50nM 이하인 결합력을 의미하고; "중친화성"은 IC_{50} 또는 K_D 값이 약 50nM 내지 약 500nM 사이인 결합력을 의미한다. HLA II형 문자에 대한 결합과 관련하여 "고친화성"은 IC_{50} 또는 K_D 값이 100nM 이하인 결합력을 의미하고; "중친화성"은 IC_{50} 또는 K_D 값이 약 100nM 내지 약 1000nM 사이인 결합력을 의미한다.

<46> " IC_{50} "은 결합 분석에서 대조 웨타이드의 결합성이 50% 억제되는 웨타이드의 농도이다. 이 분석이 진행되는 조건이 제시된다면(즉, HLA 단백질과 표지된 웨타이드의 농도를 제한하면) 이 값은 K_D 값과 거의 비슷하다.

<47> 2 이상의 웨타이드 서열과 관련하여 "동일한" 또는 "동일성%"는, 비교창 상에서 최대 상응성이 얻어지도록 비교하여 정렬하였을 때, 서열 비교 알고리듬을 사용하거나 또는 수동 정렬과 육안 조사에 의해 측정한 경우 동일하거나 동일한 아미노산 잔기의 일정 비율을 갖는 2 이상의 서열 또는 준서열을 의미한다.

<48> 폴리에피토프 작제물의 특정 위치, 예컨대 에피토프의 C 말단에 인접하여, C 말단 측에 아미노산 잔기를 "도입"한다는 것은 목적 잔기가 특정 위치, 예컨대 에피토프에 인접하게 위치하거나 또는 유해한 잔기가 에피토프의 C 말단에 인접하게 위치하지 않도록 다수의 에피토프를 배열하는 것을 포함한다. 이 용어는 또한 아미노산 잔기, 바람직하게는 선호되거나 중간인 아미노산 잔기를 특정 위치에 삽입하는 것을 포함한다. 아미노산 잔기는 또한 아미노산 잔기간의 치환에 의해 서열에 도입될 수도 있다. 이러한 치환은 예를 들어 공동계류증인 U.S.N. 09/260,714(99년 1월 3일 출원) 및 출원번호 PCT/US00/19774에 기술된 동족화(analoging) 원칙에 따라 이루어지는 것이 바람직하다.

<49> "분리된" 또는 "생물학적으로 순수한"이란 용어는 자연 상태에서 발견될 때는 통상적으로 수반되는 성분이 거의 없는 물질을 의미한다. 본 발명에 따라 분리된 웨타이드는 원위치(*in situ*) 환경에서 통상적으로는 웨타이드와 결합되어 있는 물질을 포함하지 않는 것이 바람직하다.

<50> "연결(link)" 또는 "결합(join)"은 비제한적으로 재조합 융합, 공유 결합, 이황화 결합, 이온 결합, 수소 결합 및 정전기 결합을 비롯하여 웨타이드를 기능적으로 연결하기 위한 당해 기술 분야에 공지된 모든 방법을 의미한다.

<51> "주조직적합성 복합체" 또는 "MHC"는 생리학적 면역 반응에 관여하는 세포 상호작용의 조절에 주요 역할을 하는 유전자 집단이다. 인간에 있어서, MHC 복합체는 HLA 복합체로도 알려져 있다. MHC 및 HLA 복합체에 대한 상세한 설명은 문헌 [Paul, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3rd Ed. Raven Press, New York, 1993]을 참조하라.

<52> 본 명세서에 사용된 "웨타이드의 중간"은 아미노 말단도 카르복실 말단도 아닌 웨타이드내의 위치이다.

<53> 본 명세서에 사용된 "최소수의 접합 에피토프"는 접합 에피토프의 수가 무작위 선택 기준을 사용하여 작제할 수 있는 것보다 적은 수를 의미한다.

<54> "모티프"란 용어는 소정 길이의 웨타이드, 일반적으로 I형 HLA 모티프인 경우에는 약 8개 내지 약 13개 아미노산의 웨타이드, II형 HLA 모티프의 경우에는 약 6개 내지 약 25개 아미노산의 웨타이드 내에서 특정 HLA 문자에 의해 인식되는 잔기의 패턴을 의미한다. 웨타이드 모티프는 일반적으로 각 인간 HLA 대립형질에 의해 암호화되는 각 단백질마다 상이하고 1차 및 2차 앵커 잔기의 패턴도 상이하다.

<55> "음성 결합 잔기" 또는 "유해 잔기"는 웨타이드 에피토프내의 특정 위치(일반적으로 1차 앵커 위치는 아님)에 존재하는 경우, 그 웨타이드의 상응하는 HLA 문자에 대한 웨타이드의 결합 친화성을 감소시키는 아미노산이다.

<56> 폴리에피토프 작제물을 "최적화"하는 것은 접합 에피토프의 발생을 최소화하기 위하여 에피토프를 분류하고, 에피토프의 C 말단이나 N 말단에 접한 플랭킹 잔기를 삽입한 뒤, 스페이서 잔기를 삽입하여 접합 에피토프의 발생

을 더욱 차단하거나 플랭킹 잔기를 제공함으로써 작제물의 면역원성이나 항원성을 증가시키는 것을 의미한다. 최적화된 폴리에피토프 작제물의 면역원성 또는 항원성의 증가는 최적화 변수에 기초하여 작제하지 않은 폴리에피토프 작제물과 비교하여 측정하고, 당해 기술 분야에 공지된 분석법, 예컨대 유전자전이된 동물에서의 면역원성의 측정, ELISPOT, 인터페론 감마 방출 분석, 테트라미 염색, 크롬 방출 분석 및 수지상 세포 상에서의 제시분석법을 사용한다.

- <57> "펩타이드"란 용어는 본 명세서에서는 "올리고펩타이드"와 상호교환적으로 사용되고 있으며, 일반적으로 플랭킹 아미노산의 α -아미노기와 카르복실기 사이의 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된, 일반적으로 L-아미노산인 일련의 잔기를 의미한다. 본 발명의 바람직한 CTL 유도성 펩타이드는 길이가 13개 잔기 이하이고 보통 약 8개 내지 약 11개 잔기, 바람직하게는 9개 또는 10개 잔기로 이루어진 것이다. 바람직한 HTL 유도성 올리고펩타이드는 길이가 약 50개 이하인 잔기, 일반적으로 약 6개 내지 약 30개 잔기로 구성되고, 보다 일반적으로 약 12개 내지 25개, 흔히 약 15개 내지 20개 잔기로 구성된 것이다.
- <58> "PanDR 결합 펩타이드 또는 PADRE™ 펩타이드"는 1가지 이상의 HLA II형 DR 분자에 결합하는 분자 패밀리의 구성원이다. PADRE™ 패밀리의 분자를 한정하는 패턴은 HLA II형 슈퍼모티프로 간주될 수 있다. PADRE는 대부분의 HLA-DR 분자에 결합하여 시험관내 및 생체내 인간 헬퍼 T 림프구(HTL) 반응을 자극한다.
- <59> "약제학적 허용성"은 일반적으로 비독성, 불활성 및/또는 생리학적으로 적합한 조성물을 의미한다.
- <60> "HLA I형 프로세싱 경로에 제시된다"라는 것은 폴리에피토프 작제물이 주로 HLA I형 프로세싱 경로에 의해 처리되도록 세포에 도입되는 것을 의미한다. 일반적으로, 폴리에피토프 작제물은 이 작제물을 암호화하는 발현 벡터에 의해 세포로 도입된다. 이러한 미니유전자에 의해 암호화된 HLA II형 에피토프는 II형 분자상에 제시되기도 하지만 II형 프로세싱 경로로 에피토프가 진입되는 기작은 분명하지 않다.
- <61> "1차 앵커 잔기" 또는 "1차 MHC 앵커"는 면역원성 펩타이드와 HLA 분자 사이에 접촉점을 제공하는 것으로 이해되는, 펩타이드 서열을 따라 특정 위치에 있는 아미노산이다. 소정 길이의 펩타이드 내에 있는 1개 내지 3개, 일반적으로 2개의 1차 앵커 잔기는 일반적으로 면역원성 펩타이드의 "모티프"를 나타낸다. 이 잔기들은 HLA 분자의 펩타이드 결합 홈에 밀착 상태로 위치하며, 이들의 측쇄는 결합 홈 자체의 특정 포켓 속에 묻히는 것으로 이해하고 있다. 일 구체예에서, 예를 들어 HLA I형 에피토프의 1차 앵커 잔기는 위치 2(아미노 말단 위치에서부터) 및 본 발명에 따른 9-잔기 펩타이드 에피토프의 카르복실 말단 위치에 위치한다. 각 모티프 및 슈퍼모티프에 대한 1차 앵커 위치는 예를 들어 PCT/US00/27766 또는 PCT/US00/19774의 표 I 및 III에 기술되어 있다. 또한, 1차 앵커 위치에 있는 특정 잔기의 존재 유무를 변화시켜 유사체 펩타이드를 제조할 수 있다. 이러한 유사체는 특정 모티프 또는 슈퍼모티프를 포함하는 펩타이드의 결합 친화성을 변화시키는데 사용한다.
- <62> "무차별 인식"은 다양한 HLA 분자 상태에서 상이한 펩타이드가 동일한 T 세포 클론에 의해 인식되는 경우 나타난다. 무차별 인식 또는 결합은 교차반응성 결합과 동의어이다.
- <63> "방어 면역반응" 또는 "치료적 면역반응"은 감염 인자 유래의 항원이나 종양 항원에 대한 CTL 및/또는 HTL 반응을 의미하는 것으로서, 일부 방식에서는 질병 증상, 부작용 또는 진행을 예방하거나 또는 적어도 부분적으로는 저지한다. 면역반응은 또한 헬퍼 T 세포의 자극에 의해 촉진되는 항체 반응을 포함할 수 있다.
- <64> "잔기"라는 용어는 아미드 결합 또는 아미드 결합 모사체에 의해 펩타이드 전구단백질(protein) 내로 도입되는 아미노산 또는 아미노산 유사체를 의미한다.
- <65> "2차 앵커 잔기"는 펩타이드 결합에 영향을 미칠 수 있는 펩타이드내 1차 앵커 위치 이외의 다른 위치에 있는 아미노산이다. 2차 앵커 잔기는 한 위치에서 아미노산의 무작위적인 분포에 의해 예상될 수 있는 것 보다 훨씬 높은 빈도로 결합된 펩타이드 중에서 나타난다. 2차 앵커 잔기는 "2차 앵커 위치"에 존재한다고 할 수 있다. 2차 앵커 잔기는 고친화성 또는 중친화성 결합 펩타이드들 중에서 보다 많은 빈도로 존재하는 잔기, 또는 고친화성 또는 중친화성 결합과 관련이 있는 다른 잔기로 확인할 수 있다. 예를 들어, 유사체 펩타이드는 이러한 2차 앵커 위치에 있는 특정 잔기의 존재 유무를 변화시켜 제조할 수 있다. 이와 같은 유사체는 특정 모티프 또는 슈퍼모티프를 포함하는 펩타이드의 결합 친화성을 미세하게 조정하는데 사용한다. "고정된 펩타이드"란 용어는 때로 유사체 펩타이드를 나타내는데 사용하였다.
- <66> "에피토프를 분류(sorting)한다"라는 것은 폴리에피토프 작제물내에 에피토프의 순서를 결정하거나 설계하는 것을 의미한다.
- <67> "스페이서"는 접합 에피토프의 발생을 차단하기 위하여 폴리에피토프 작제물 내의 두 에피토프 사이에 삽입되는

서열을 의미한다. HLA II형 에피토프의 경우, 스페이서는 길이가 5개 이상인 아미노산이고, 스페이서 서열내의 아미노산 잔기, 예컨대 G, P 또는 N은 일반적으로 HLA II형 모티프의 1차 앵커 잔기로 알려진 것이 아니다(예컨대, PCT/US00/19774).

<68> "아우성(subdominant) 에피토프"는 에피토프를 포함하는 전체 항원으로 면역화시키는 경우, 거의 또는 전혀 반응을 일으키지 않는 에피토프이지만, 이를 위한 반응이 분리된 웨타이드로 면역화시킴으로써 수득될 수 있고, 이러한 반응(침복 에피토프의 경우와는 다름)은, 전체 단백질이 시험관내에서 반응을 기억시키는데 사용되는 경우 탐지된다.

<69> "슈퍼모티프"는 2종 이상의 HLA 대립형질에 의해 암호화된 HLA 분자가 공유하고 있는 웨타이드 결합 특이성이다. 바람직하게는, 슈퍼모티프-보유 웨타이드는 2종 이상의 HLA 항원에 의해 고친화성 또는 중친화성(본 명세서에 정의된 바와 같음)으로 인식된다.

<70> "합성 웨타이드"는 자연 발생이 아닌, 화학적 합성이나 재조합 DNA 기법과 같은 방법으로 인간이 만든 웨타이드를 의미한다.

<71> "TCR 접촉 잔기" 또는 "T 세포 수용체 접촉 잔기"는 T 세포 수용체에 의해 결합되는 것으로 추정되는 에피토프 내의 아미노산 잔기로서, 본 명세서에서는 어떠한 1차 MHC 앵커 잔기도 아닌 것으로 정의되고 있다. T 세포 수용체 접촉 잔기는 시험된 모든 유사체가 야생형 웨타이드에 의해 유도되는 것에 비하여 음성의 IFN γ 생성을 유도하는 웨타이드내 위치(들)로서 정의된다.

<72> 웨타이드 화합물을 설명하는데 사용한 명명법은 통상적 실례에 따르고, 아미노기는 각 아미노산 잔기의 좌측(N 말단)에, 카르복실기는 우측(C 말단)에 제시하였다. 아미노산 잔기 위치는 웨타이드 에피토프의 경우에는 아미노에서 카르복실 방향으로 번호를 매겼으며, 위치 1은 에피토프 또는 이것이 일부를 구성할 수 있는 웨타이드 또는 단백질의 아미노 말단부에 가장 근접한 위치이다. 본 발명의 선택된 특정 구체예를 나타내는데 있어서, 아미노 말단기 및 카르복실 말단기는 구체적으로 제시하지는 않았지만 별다른 표시가 없다면 생리적 pH 값에서 추정할 수 있는 형태이다. 아미노산 구조면에서 각 잔기는 일반적으로 표준 3문자 또는 1문자 표기 방식으로 나타내었다. 아미노산 잔기의 L 형태는 대문자 1문자 또는 3문자 기호의 대문자 첫문자로 나타내고, D 형태를 가진 그 아미노산의 D 형태는 소문자 1문자 또는 소문자 3문자 기호로 나타내었다. 글리신은 비대칭 탄소 원자를 갖고 있지 않으며 간단하게 "Gly" 또는 G로 표시하기도 한다. 아미노산에 대한 기호는 다음에 제시하는 바와 같다.

<73>

1 문자 기호	3 문자 기호	아미노산
A	Ala	알라닌
C	Cys	시스테인
D	Asp	아스파르트산
E	Glu	글루탐산
F	Phe	페닐알라닌
G	Gly	글리신
H	His	히스티딘
I	Lle	이소루이신
K	Lys	리신
L	Leu	루이신
M	Met	메티오닌
N	Asn	아스파라긴
P	Pro	프롤린
Q	Gln	글루타민
R	Arg	아르기닌
S	Ser	세린
T	Thr	트레오닌
V	Val	발린
W	Trp	트립토판
Y	Tyr	티로신

- <74> 아미노산의 "화학적 특징"은 다음과 같다: 방향족(F,W,Y); 지방족-소수성(L,I,V,M); 약한 극성(S,T,C); 강한 극성(Q, N); 산성(D,E); 염기성(R,H,K); 프롤린; 알라닌 및 글리신.
- <75> 본 명세서에 사용된 두문자어는 다음과 같다:
- <76> APC: 항원 제시 세포
- <77> CD3: 범(pan) T세포 마커
- <78> CD4: 헬퍼 T 림프구 마커
- <79> CD8: 세포독성 T 림프구 마커
- <80> CEA: 암배 항원
- <81> CTL: 세포독성 T 림프구
- <82> DC: 수지상 세포. DC는 B형 간염 바이러스(HBV) 유래의 모델 웨타이드에 특이적인 CTL 세포주로부터 사이토킨 방출을 자극하여 강력한 항원 제시 세포로서 작용하였다. HBV 웨타이드 에피토프에 의해 생체외에서 펠스처리된 DC를 사용한 시험관내 실험에서 그 에피토프는 무-면역자극(naive) 마우스에 전달된 후 시험관내에서 CTL 면역 반응을 자극하였다.
- <83> DMSO: 디메틸설폐사이드
- <84> ELISA: 효소 결합된 면역흡착 분석법
- <85> E:T: 효과인자:표적의 비
- <86> FCS: 태내 송아지 혈청
- <87> G-CSF: 과립구 콜로니 촉진 인자
- <88> GM-CSF: 과립구-대식세포(단핵구)-콜로니 촉진 인자
- <89> HBV: B형 간염 바이러스
- <90> HER2/Neu: c-erbB-2
- <91> HLA: 인간 백혈구 항원
- <92> HLA-DR: 인간 백혈구 항원 II형
- <93> HPLC: 고성능 액체 크로마토그래피
- <94> HTC: 헬퍼 T 세포
- <95> HTL: 헬퍼 T 림프구
- <96> ID: 동일성
- <97> IFN γ : 인터페론 감마
- <98> IL-4: 인터루킨-4-사이토킨
- <99> IV: 정맥내
- <100> LU_{30%}: 100:1(E:T) 비에서 30% 용해율을 획득하는데 필요한 세포독성 활성
- <101> MAb: 모노클로날 항체
- <102> MAGE: 흑색종 항원
- <103> MLR: 복합 림프구 반응
- <104> MNC: 단핵 세포
- <105> PB: 말초 혈액
- <106> PBMC: 말초 혈액 단핵 세포

<107> SC: 경피
<108> S.E.M.: 평균의 표준 오차
<109> QD: 1일 1회 투여량
<110> TAA: 종양 관련 항원
<111> TCR: T 세포 수용체
<112> TNF: 종양 파사 인자
<113> WBC: 백혈구 세포

<114> 본 출원의 관련 출원으로는 1993.3.5. 출원되고 현재는 포기된 상태인 08/027,146의 CIP인, 1993.6.4. 출원되고 현재는 포기된 상태인 08/073,205의 CIP인, 1993.11.29출원되고 현재는 포기된 상태인 08/159,184의 CIP인, 1994.3.4. 출원된 USSN 08/205,713의 CIP인, 1998.11.10.출원된 USSN 09/189,702가 있다. 또한, 본 발명은 USSN 60/013,113(현재는 포기된 상태임)의 우선권을 청구한 USSN 08/815,396의 CIP인 USSN 09/226,775와도 관련이 있다. 또한, 본 발명은 현재는 포기된 상태인 USSN 08/589,108; USSN 08/753,622, USSN 08/822,382, USSN 60/013,980, USSN 08/454,033, USSN 09/116,424, 및 USSN 08/349,177의 CIP인 USSN 09/017,735와 관련이 있다. 또한, 본 발명은 USSN 09/017,524, USSN 08/821,739, 포기된 USSN 60/013,833, USSN 08/758,409, USSN 08/589,107, USSN 08/451,913, USSN 08/186,266, USSN 09/116,061 및 USSN 08/347,610(이것은 포기된 USSN 07/926,666의 CIP인, 포기된 USSN 08/027,746의 CIP인, 포기된 USSN 08/103,396의 CIP인 USSN 08/159,339의 CIP임)과 관련이 있다. 또한, 본 발명은 USSN 09/017,743, USSN 08/753,615, USSN 08/590,298, USSN 09/115,400, 및 USSN 08/452,843(이것은 포기된 USSN 08/278,634의 CIP인 USSN 08/344,824의 CIP임)과 관련이 있다. 또한, 본 발명은 가출원 USSN 60/087,192 및 USSN 09/009,953(이것은 포기된 USSN 60/037,432 및 포기된 USSN 60/036,713의 CIP임)과 관련이 있다. 또한, 본 발명은 USSN 09/098,584 및 USSN 09/239,043과 관련이 있다. 본 발명은 또한 공동계류중인 USSN 09/583,200(2000.5.30출원), USSN 09/260,714(1999.3.1출원) 및 미국 가출원("Heteroclitic Analogs and Related Methods", Attorney Docket Number 018623-015810US, 2000.10.6출원)과 관련이 있다. 상기 모든 출원들은 본 발명에 참고 인용되고 있다.

발명의 상세한 설명

I. 서론

<124> 본 발명은 최적화된 면역원성을 가진 멀티에피토프 백신을 설계하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구체예로서, 백신은 CTL 및 HTL 에피토프를 포함한다. 본 발명에 따른 백신은 인종적 편향성이 없는 상당수의 개체군을 적용범위로 하며, 바람직하게는 여러 바이러스 분리물 또는 다른 항원 분리물 중에서 보존되는 에피토프에 초점을 둘 수 있다. 백신은 반응의 크기와 폭의 측면에서 최적화되어 가장 간단한 에피토프 배열로 제조할 수 있다. 마지막으로, 인체내에서의 폴리에피토프 백신의 면역원성을 평가하기 위한 일반적 방법을 제공한다.

<125> 본 발명의 방법은 본 발명에서 확인된 원리에 기초하여 폴리에피토프 작제물을 설계하는 단계를 포함한다. 일관점으로서, 본 발명은 단독 프로모터 미니유전자 백신을 사용하여 특정 CTL 및 HTL 에피토프에 대한 반응을 동시에 유도하는 방법을 제공한다. 상기 미니유전자 작제물은 상이한 에피토프를 다수, 바람직하게는 10개 이상, 종종 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개 또는 그 이상 포함할 수 있다.

<126> 폴리에피토프 작제물의 설계시에는 다음과 같은 사항을 고려해야 한다:

<127> (i) 폴리에피토프 작제물에 첨가할 에피토프는, 형성되는 접합 에피토프의 수가 최소화되는 순서를 제공하도록 분류한다. 일부 구체예에서, 분류는 컴퓨터로 실시한다. 에피토프 정렬시 두 번째 고려해야 하는 사항으로서 에피토프들은 CTL 면역원성을 촉진하는 에피토프의 N 말단에 있는 잔기가 다른 CTL 에피토프의 C 말단에 병치되도록 배치한다.

<128> (ii) 면역원성을 향상시키는 플랭킹 잔기는 에피토프의 플랭킹 위치에 삽입한다. 특정 구체예에서, 플랭킹 잔기는 CTL 에피토프의 C+1 위치에 삽입한다.

<129> (iii) 스페이서 서열은 접합 에피토프의 발생을 방지하도록 에피토프 사이에 삽입한다. 특정 구체예에서, 스페이

이서 서열은 CTL 에피토프의 C 말단에 인접하고 링커의 N 말단에서 면역원성을 촉진시키는 잔기를 포함할 수 있다.

<131> HTL 접합 에피토프를 차단하기 위한 특정 구체예에서, 스페이서는 공지된 임의의 HLA II형 앵커 잔기에 상응하지 않는 아미노산 잔기로 이루어진 것, 예를 들어 두 개의 HTL 에피토프 사이에 G와 P 잔기를 교대로 포함시킨 것(GP 스페이서)을 사용한다.

<132> 본 발명의 다른 관점(상기 고려할 사항 (ii))은 에피토프들에 접한 위치, 예컨대 에피토프의 C 말단에 바로 인접해 있는 위치에 특정 아미노산 잔기를 도입하거나 치환시켜, 그 위치에 도입되거나 치환된 특정 잔기를 포함하지 않는 작제물에 비하여 향상된 항원성과 면역원성을 가진 폴리에피토프 작제물(즉, 최적화된 미니유전자)을 수득하는 방법을 포함한다. 폴리에피토프 작제물을 최적화하는 방법은 에피토프의 C+1 위치, 즉 에피토프의 C 말단에 바로 인접한 위치에 플랭킹 잔기, 바람직하게는 K, N, G, R 또는 A를 도입시키는 단계를 포함한다. 대안적 구체예로서, 면역원성을 감소시키는 잔기, 즉 음하전을 띤 잔기, 예컨대 D, 지방족 잔기(I, L, M, V) 또는 방향족의 비-트립토판 잔기는 치환시킨다. 플랭킹 잔기는 바람직한 플랭킹 잔기를 제공하도록 적당한 에피토프를 배치하거나 또는 특정 잔기를 삽입하여 도입시킬 수 있다.

최적화된 폴리에피토프 백신 작제물의 설계에 관한 연구

<133> 배경 기술 부분에서 언급한 바와 같이, 다수의 여러 에피토프에 대한 반응을 유도하기 위하여 최고 10개의 에피토프를 암호화하는 미니유전자가 사용된 바 있다. 실험용 미니유전자 pMin.1에 관한 데이터는 공개되어 있다 [Ishioka et al., J. Immunol. Vol. 162(7):3915-25(1999)]. 본 발명에서는 해당되는 수많은 질병 상태를 처리하는 최적화된 면역원성을 가진 멀티에피토프 작제물을 설계하고 평가하는 변수를 기술한다.

<134> 설계의 변수는 다수의 연구에 기초하여 동정하였다. 폴리에피토프 작제물을 예비평가하기 위하여 각각 20내지 25개의 상이한 CTL 에피토프를 포함하는 3가지 다른 멀티에피토프 작제물에 대한 데이터는 도 1에 제시하였다. 한 작제물은 HIV 유래의 에피토프에 기초한 것이고(HIV-1), 다른 두 개는 HCV 유래의 에피토프를 포함한다(각각 HCV1 및 HCV2). 이와 같은 여러 미니유전자의 면역원성은 A2 또는 A11 HLA 유전자전이된 마우스에서 측정하였다(A1, A24 및 B7 제한된 에피토프는 평가하지 않았다).

<135> 따라서, DNA 백신을 근육내로 1회 주사한 지 11일 후, 시험관내에서 1회 재자극한지 6일 후 대표적인 8 내지 14 개의 상이한 에피토프에 대한 반응을 CTL 활성을 측정하는 분석법(본 명세서에 제시된 바와 같은 크롬 방출 또는 원위치 IFN 생성)을 사용하여 평가하였다. 에피토프 특이적인 CTL의 초회자극은 HIV-1, HCV1 및 HCV2 마다 시험된 에피토프들의 6/8(75%), 10/14(72%) 및 13/14(93%)에서 각각 입증되었다. 따라서, 다수의 에피토프에 대하여 CTL 반응을 동시에 초회자극할 수 있는 멀티에피토프 미니유전자를 용이하게 설계할 수 있다. 하지만, 일부 에피토프에 대해서는 CTL 초회자극이 검출되지 않았고, 시험된 36가지 사례 중 몇몇 사례에서는 반응이 거의 일어나지 않거나 또는 반응량이 3 등급 이상(1000배)의 큰 차이를 나타내었다. 이와 같은 결과는 미니유전자 작제물에 대한 보다 세심한 분석과 최적화가 요구된다는 것을 강력하게 지지한다.

<136> 특정 에피토프의 경우 최적수준 이하의 초회자극 성능이 미니유전자 크기와 관련이 있을 수 있다는 가능성에 대하여 또한 조사하였다. 실제로, 공지된 대부분의 보고 문헌에서는 최고 10개의 에피토프를 함유하는 미니유전자를 기술하고 있으며, 20개 에피토프 미니유전자를 보고하는 몇몇 연구에서는 단지 2 또는 3개의 에피토프에 대하여 유도되는 활성이 측정되었다. 이러한 가능성을 설명하기 위하여, 각각 10개의 에피토프를 포함하고 HIV-1 미니유전자의 1/2에 상응하는 2개의 작은 미니유전자(HIV-1.1 및 HIV-1.2)를 합성하여 시험하였다. 4가지 대표적인 에피토프에 대한 반응을 측정하였다.

표 1

미니유전자 크기와 무관한 것으로 보이는 면역원성

상이한 미니유전자에 대한 CTL 반응						
CTL 에피토프	HIV 1(20량체)		HIV 1.1(10량체)		HIV 1.2(10량체)	
	빈도 ¹⁾	크기 ²⁾	빈도	크기	빈도	크기

Pol 774	0/8	*	0/4	*	NA ³⁾	NA
Pol 498	18/19	46.7	4/4	16.4	NA	NA
Gag 271	4/13	4.0	NA	NA	0/4	*
Env 134	5/8	16.1	NA	NA	4/4	14.8

<139> 1) 양성 반응을 산출하는 각 배양물의 비율을 나타낸다.

<140> 2) 용해 단위(LU)

<141> 3) 적용할 수 없음

<142> 그 결과, 소형 미니유전자에 의해 유도된 반응이 20개 에피토프 작제물에 의해 유도된 반응과 비슷하거나 오히려 보다 적은 것으로 관찰되었다(표 1). 따라서, 미니유전자 크기에 관한 인자는 특정 에피토프에 대하여 관찰된 최적이하의 초회자극을 설명할 수 없었으며, 따라서 효능이 뛰어난 폴리에피토프 작제물을 설계하기 위하여 본 명세서에 개시된 다른 변수를 사용하였다.

접합 모티프의 최소화

<144> 폴리에피토프 작제물을 설계할 때 고려해야 하는 사항 한가지는 에피토프를 서로 인접하게 배치할 때 우연히 접합 에피토프가 생성된다는 것이다. 미니유전자 중에 이러한 접합 에피토프의 존재는 미니유전자의 성능에 크게 영향을 미칠 수 있다. 이와 같은 원치 않는 영향을 차단하기 위한 전략을 본 명세서에서 개시하고 폴리에피토프 또는 미니유전자 백신을 개발하는데 적용하였다. 먼저, 접합 에피토프의 수를 최소화하는 순서를 정하기 위하여 에피토프를 분류하여 접합 에피토프를 최소화할 수 있다. 이와 같은 분류 절차는 필요한 경우 또는 폴리에피토프 작제물에 포함될 에피토프의 수에 따라서 컴퓨터나 육안으로 실시할 수 있다.

<145> 예를 들어, 패턴을 탐색하는 컴퓨터 프로그램, 예컨대 파노라마(Panorama)를 멀티에피토프 미니유전자를 설계하는데 사용할 수 있다. 특정 미니유전자 작제물을 설계하기 위하여 매우 많은 수의 상이한 에피토프 배열을 고려할 수 있다. 컴퓨터 프로그램에는 고찰된 특정 세트의 에피토프, 및 모티프를 보유하는 임의의 접합 에피토프가 있는지를 평가하기 위하여 스캐닝되어야 하는 모티프를 입력한다. 예를 들어, 프로그램은 미니유전자를 모의로 작제할 수 있으며, 유리스틱(euristic) 컴퓨터 알고리듬으로 접합 모티프의 발생을 최소화하거나 피하기 위하여 에피토프 쌍을 조사한다. 이 프로그램은 예를 들어 초당 6×10^5 (약 50만개) 미니유전자 배열을 조사할 수 있다. 보다 바람직하지 않고 시간소모적이지만 대안으로서 컴퓨터 없이 분석을 실시할 수도 있다.

<146> 전술한 바와 같이 컴퓨터 프로그램을 이용한 10개 에피토프 작제물을 완전하게 분석하기 위해서는 10 계승= 3.6×10^6 조합을 조사해야 하고 6초내에 완료될 수 있다. 14개 에피토프 작제물은 2일 동안 완전하게 분석될 수 있다. 하지만, 보다 큰 미니유전자가 고찰될 때에는 분석 시간이 급격히 증가한다. 분석은 완전하게 이루어질 필요는 없고 소정 시간 동안 프로그램을 진행시킬 수도 있다. 이와 같은 경우에 가장 적은 수의 접합 에피토프를 제공하는 배열이 제공된다.

<147> 이런 유형의 시도를 실시한 결과의 예를 표 2에 제시하였다. 25개 에피토프를 포함하는 HCV1 미니유전자에 함유된 동일한 에피토프를 10회의 상이한 무작위 분류시 접합 모티프의 수는 2일간의 컴퓨터 분석의 결과로서 표 2에 제시하였다. 최적화되지 않은 분류에서 25 내지 38 범위, 평균 31개의 다수의 A2, A11 및 K^b 모티프가 발견되었다. 비교용으로서, 상기 접합 모티프 2개만을 HCV1 미니유전자 분류에 제공하였다. 결론적으로, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 미니유전자 작제물에 존재하는 접합 모티프의 수를 효과적으로 최소화할 수 있다.

표 2

<148> 접합 에피토프의 발생

미니유전자 작제물	선택 기준	접합 모티프
HCV.a	무작위	33

HCV.b	무작위	26
HCV.c	무작위	28
HCV.d	무작위	27
HCV.e	무작위	30
HCV.f	무작위	26
HCV.g	무작위	38
HCV.h	무작위	33
HCV.i	무작위	33
HCV.j	무작위	34
HCV.l	최소화	2

- <149> <II형 접합 에피토프를 제거하고 생체내에서의 II형 제한된 반응에 대해 시험한다>
- <150> 접합 에피토프를 제거하는데 있어서 추가 성분으로서, 병치시켰을 때 접합 에피토프를 생성하는 두 에피토프 사이에 스페이서 서열을 삽입할 수 있다.
- <151> HTL 에피토프에 있어서 접합 에피토프의 문제점을 해소하기 위하여, 5개 이상의 아미노산으로 이루어진 스페이서를 두 에피토프 사이에 삽입한다. 이러한 스페이서에 포함되는 아미노산 잔기는 임의의 HLA II형 결합 모티프에서 1차 앵커 잔기인 것으로 알려져 있지 않은 아미노산 잔기가 바람직하다. 이러한 잔기로는 G, P 및 N이 있다. 바람직한 구체예에서, GPGPG 서열을 가진 스페이서를 두 에피토프 사이에 삽입한다. 종래 연구에서 입증된 바에 따르면, GP 스페이서는 II형 결합 상호작용을 봉괴시키는데 특히 효과적이다[Sette et al., J. Immunol., 143:1268-73(1989)]. 공지된 모든 인간의 II형 결합 모티프 및 마우스 IA^b(HLA 유전자전이된 마우스에 의해 발현되는 II형)는 이 1차 앵커 위치에서 G 또는 P를 허용하지 않으며, 4개 잔기에 의해 서로 떨어져 있다. 이러한 접근은 사실상 II형 제한 에피토프가 접합 에피토프로서 형성될 수 없다는 것을 확실시한다.
- <152> 이 설계의 연구를 입증하는 실시예로서, HIV 유래의 HTL 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드를 합성하였다. 이 에피토프들은 광범위하게는 교차반응성 HLA DR 결합 에피토프이다. 그 다음, 이 에피토프가 쥐의 IA^b II형 분자에 효과적으로 결합하는지 측정하였다. 고찰된 2가지 상이한 합성 폴리펩타이드를 예시하는 다이아그램을 도2a에 제시하였다.
- <153> 1차 작제물은 선형으로 배열된 4가지 다른 에피토프를 포함하는 반면, 2차 작제물은 GPGPG 스페이서를 포함한다. 또한, 가능한 3가지 접합 에피토프에 상응하는 합성 웹타이드도 합성하였다.
- <154> IA^b 양성 마우스에서 다양한 에피토프에 대한 중식 반응을 초회자극하는 상기 여러 작제물의 2nM의 효능을 시험하고, 등몰량의 동일한 웹타이드 푸울(펩타이드 각각 3 μ g)에 의해 유도되는 반응과 비교하였다. 구체적으로, 3마리 마우스 그룹에 CFA 애멀젼을 주사하고, 주사한 지 11일 후 림프절 세포를 시험관내에서 3일 동안 배양하고, 마지막 배양 24시간째에 티미딘 도입율을 측정하였다. 고친화성 IA^b 결합 효능을 근거로 하여 예상되는 바와 같이 총 4개의 에피토프가 우수한 중식 반응을 유도하였다(도 2b). 이 웹타이드를 푸울에 주사하였을 때 4.9 내지 17.9 범위의 자극 지수(SI)가 관찰되었다. 하지만, 동일한 에피토프를 포함하는 선형의 폴리펩타이드를 시험했을 때 Po1335에 대하여 유도된 반응은 상실되었다. 이것은 Gag171과 Po1335 사이의 접합 에피토프에 대하여 유도된 반응의 출현과 관련이 있는 것이다. GPGPG 스페이서를 사용한 결과 이러한 문제점이 제거되었는데, 이는 접합 에피토프가 파괴되었기 때문인 것으로 추정되며, Po1335 반응이 재개되었다. 관찰되는 반응의 크기는 분리된 웹타이드들의 푸울에 의해 관찰되는 것과 유사한 크기였다.
- <155> 이와 같은 결과는 복수의 HIV 유래의 II형 에피토프에 대한 반응이 동시에 유도될 수 있음을 입증하며, 또한 HTL 에피토프 후보를 포함하는 다양한 작제물의 면역원성을 조사하는데 IA^b/DR 교차반응성이 어떻게 이용될 수 있는지를 예시한다. 마지막으로, 상기 결과는 적당한 스페이서를 이용하여 효과적인 백신 면역원성을 방해할 수도 있는 II형 접합 에피토프를 효과적으로 봉괴시킬 수 있음을 입증한다.
- <156> I형 제한 반응에서, 천연의 접합 에피토프의 한 예와 그 결과로서 생기는 에피토프 특이적인 반응의 억제가 맥마이클과 동료들[Tussey et al., Immunity, Vol.3(1):65-77(1995)]에 의해 제시되었다. I형의 접합 에피토프

에 대한 문제를 해소하기 위하여 유사하게 분석을 실시하였다. 예를 들어, 특정 컴퓨터 프로그램을 이용하여 선택된 쥐 모티프와 가장 일반적인 인간 I형 HLA A 및 B 모티프를 선별함으로써 잠재적인 I형의 제한된 접합 에피토프를 확인하였다.

<157> 스페이서 서열은 또한 CTL 접합 에피토프를 차단하는데에도 유사하게 이용될 수 있다. 종종, A 또는 G와 같은 매우 작은 잔기가 스페이서 서열로서 바람직하다. 또한, G는 HLA I형 결합 모티프의 바람직한 1차 앵커 잔기로서(예컨대, PCT/US00/24802 참조) 비교적 드물게 나타난다. 이 스페이서는 길이가 다양할 수 있으며, 예를 들어 스페이서 서열은 일반적으로 길이가 1,2,3,4,5,6,7, 또는 8개의 아미노산 잔기이거나 때로는 이보다 더 긴 잔기일 수 있다. 폴리에피토프 작제물을 생산하는데 있어서 물리적 구속으로 인하여 때로는 상기보다 작은 길이가 바람직한 경우도 있다.

CTL 미니유전자 면역원성에 미치는 플랭킹 영역의 영향

<159> 미니유전자를 설계하는데 있어서 고려해야 하는 또 다른 인자는 CTL 에피토프의 C 말단에 접한 위치에 면역원성에 유리한 영향을 미치는 잔기를 삽입하는 것이다.

<160> 본원에서는 이러한 잔기를 확인하여 기술하였다. 플랭킹 영역은, 적어도 몇몇 경우에는 CTL 에피토프의 분명한 제시를 조절할 수 있다. 하지만, 지금까지 플랭킹 영역의 조절 효과에 대하여 단지 제한된 분석만이 실시되었고, 모든 경우[이시오카(1998)의 연구는 제외{Ishioka et al., J. Immunol., Vol.162(7):3915-25(1999)}]에 에피토프는 마우스 MHC에 의해 제한되었다. 이것은 마우스와 인간의 MHC 모티프가 C 말단에서 상이한 경향이 있고, 그 결과 프로테오좀 절단 우선성에 의해 상이하게 영향을 받을 수 있을 때 특히 관련이 있다. 또한, 몇몇 연구에서는 마우스 및 인간 프로테오좀 및/또는 ER 프로테아제 사이에 프로세싱 특이성에 큰 차이를 관찰하였다. 따라서, 마우스 대 인간의 에피토프를 이용하는 실험은 플랭킹 잔기에 대하여 상이한 결과 및 "규칙"을 산출할 것이다. 본 명세서에서는 면역원성을 증가시키는 잔기 및 이에 따라 면역원성을 최적화하기 위하여 폴리에피토프 작제물에 삽입되는 잔기를 동정하는 연구를 기술한다.

<161> 에피토프가 발현되는 문자 관계는 HLA 유전자전이된 마우스에서 그 에피토프에 특이적인 CTL을 초회자극하는 빈도 및/또는 크기에 급격하게 영향을 미쳤다. 2가지 예를 표 3에 제시하였다.

표 3

<162> 상이한 미니유전자에서 특정 에피토프에 대한 T 세포 초회자극 효과의 차이

에피토프	미니유전자	플랭킹	에피토프	플랭킹	반응
		N 말단	서열	C-말단	빈도
Core 18	pMmin 5	TLKAAA	FLPSDFFPSV	FLLSLG	6/6
	pMin1	TLKAAA	FLPSDFFPSV	KLTPLC	6/6
Core 132	HCV 1	ILGGWV	DLMGYIPLV	YLVAYQ	2/12
	HCV 2	VPGSRG	DLMGYIPLV	AKFVA	17/18

<163> 1) IFN-γ 분비 단위

<164> pMin5 미니유전자에서 발현되는 HBV 코어 18 에피토프의 면역원성은 pMin1 미니유전자의 경우에 관찰되는 것보다 약 200배 더 낮았다. 이와 유사하게, HCV1 미니유전자의 상황에서 발현되는 HCV 코어 132 에피토프의 면역원성도 최저 수준이었고, 실시된 12가지 상이한 각각의 CTL 실험/배양물 중에서 2가지 경우에서만 입증할 수 있는 유의적인 T 세포 초회자극반응이 나타났다. 이 2가지 양성 실험은 약 100SU의 IFN-γ 반응을 산출하였다. 하지만, HCV2 미니유전자의 상황에서 동일한 에피토프가 발현되는 경우에는, 양성의 반응이 18가지 중 17가지의 경우에서 관찰되었고 평균 크기는 약 5배 이상 높았다.

HLA-A*0201/Kb 유전자전이된 마우스에서 HIV-FT의 면역원성

<166> HIV 멀티에피토프 DNA 백신인 HIV-FT(도 3a)는 20가지 HIV 유래의 CTL 에피토프를 암호화한다. 이러한 20가지 에피토프 중에서, 8가지는 HLA-A*0201에 의해, 9가지는 HLA-A*1101에 의해, 그리고 3가지는 HLA-B*070118에 의해

해 제한된다. 모든 에피토프들은 이들의 관련 제한 인자에 우수한 친화성으로 결합하였다. HLA-A^{*} 0201 제한된 에피토프 모두는 거의 유사한 친화성으로 정제된 HLA-A^{*} 0201 분자에 결합하였고, IC₅₀값은 19 내지 192nM 범위였다(도 3a). HIV-FT에 포함시키기 위해 선택된 HLA-A^{*} 0201 에피토프들은 HIV-1 감염 개체에서 인식되었고, IFA로 유화시키고 HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자전이된 마우스를 초회자극하는데 사용하였을 때 기억 CTL 반응을 초회자극하는데 매우 효과적이었다. 작제물은 에피토프 사이의 어떤 개재 스페이서 서열없이 연속적으로 스페이서를 암호화하도록 설계하였고 이 작제물의 5' 말단에 컨센서스 Igk 시그널 서열을 융합시켜 암호화된 항원이 소포체로 용이하게 수송되도록 하였다(Ishioka et al., J.Immunol. 162:3915-3925, 1999).

<167> 생체내에서 기억 CTL 반응을 초회자극하는 HIV-FT의 효능은 HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자전이된 마우스의 근육내 면역화를 통해 평가하였다. HIV-FT 플라스미드 DNA 100 μ g으로 면역화된 동물 유래의 비장세포를 HIV-FT에 암호화된 각각의 HLA-A^{*} 0201 에피토프들로 자극하고 6일동안 배양한 후 웨타이드 특이적인 CTL 활성을 분석하였다. HIV-FT에 존재하는 에피토프 중 3가지 에피토프에 대한 대표적인 CTL 반응은 도 4a에 도시하였다. 여러 실험의 결과를 보다 용이하게 편집하기 위하여 각 비장세포 배양물에 대한 세포독성을 값을 종래 기술된 바와 같은 용해 단위[Vitiello, et al., J.Clin.Invest. 95:341-349, 1995]로 표현하였다. HIV-FT에서 암호화된 8가지 HLA-A^{*} 0201 제한된 에피토프 중에서, Pol 498, Env 134, Pol 448, Vpr 62, Nef 221 및 Gag 271은 DNA 면역화 후 CTL 반응을 초회자극하였다(도 4b). CTL 반응의 크기는 Pol 498에 대해서는 거의 50LU에서부터 Nef 221 및 Gag 271에 대하여 4LU에 이르기까지 10배 이상의 차이를 보였다. 이와 유사하게, 기억 CTL 반응의 반도는 에피토프마다 다양했는데, Pol498 에피토프는 실험 중 94%에서 반응을 유도한 반면, Gag271에 대한 CTL 반응은 단지 실험 중 31%에서만 검출되었다. 결론적으로, 스페이서 아미노산 없이 에피토프를 연속적으로 암호화하는 HIV-FT에 의한 DNA 면역화는 분석된 대부분의 에피토프에 대하여 기억 CTL 반응을 유도하였다. 하지만, 반응의 크기와 빈도는 에피토프마다 큰 차이를 보였다.

<168> 형질감염된 세포주에서 에피토프 면역원성과 HIV-FT 에피토프 제시의 수준과의 관계

<169> 이어서, HIV-FT 내에서 HLA-A^{*} 0201 에피토프의 차등 면역원성을 분석하였다. 차등 MHC 결합 친화성은 배제할 수 있었는데, 그 이유는 모든 에피토프가 친화성이 높은 HLA-A^{*} 0201와 결합하기 때문이다(도 3a). 또한, HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자전이된 마우스에서 TCR 특이성이 적합한 레퍼토리의 결핍도 배제할 수 있는데, 그 이유는 모든 에피토프가 IFA 내에서 유화된 최적 예비 프로세싱된 웨타이드를 이용하는 HLA 유전자전이된 마우스의 면역화후 필적 할만한 CTL 반응을 나타내기 때문이다. T 세포 인식에 대해 제시된 각각의 에피토프의 상대적인 양의 변화는 적어도 부분적으로 에피토프 면역원성의 차이 때문일 수 있다.

<170> 이를 테스트하기 위해, HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자를 발현하는 인간 T 세포주인 주르카트(Jurkat) 세포[참조: Vitiello 등, J. Exp. Med. 173, 1007-1015 (1991)]를 에피좀 백터 내에서 발현된 HIV-FT를 이용하여 형질감염하였다. 인간 세포주는 인간과 마우스 사이의 처리 능력에서의 차이와 관련될 수 있는 임의의 가능한 인공물을 제거하기 위해 사용하였다. 이 형질감염된 세포주는 항원 프로세싱 능력을 보유하는 MHC 제시에 부합하였으며, 인간에서 사용하기 위한 CTL 에피토프 기초한 DNA 백신의 후속 개발에 대한 기반을 제공하였다.

<171> 웨타이드 특이성 CTL 세포주는 HIV-FT, Pol 498, Env 134, Pol 448 및 Nef 221에서 암호화된 HLA-A^{*} 0201 에피토프 중 4개의 형질감염된 표적에서 제시가 관찰되었다. 생성 및 제시된 이들 에피토프 각각의 수준을 정량화하기 위해, 여러가지 에피토프에 특이적인 CTL 세포주는 형질감염되지 않은 표적 및 상이한 양의 각각의 에피토프와 함께 항온배양하였다. 이들 CTL 투여량 반응 곡선은 표준 곡선으로 이용하였으며, 이를 이용하여 HIV-FT 형질감염된 표적 세포에 반응하여 관찰된 것과 균등한 수준의 IFN- γ 분비를 유도하는 웨타이드 농도를 결정하였다. 이 값은 "웨타이드 균등 량(peptide equivalent dose)"이라 칭하며, 형질감염된 세포에 대해 제시된 에피토프 양의 상대적인 측정치로 이용하였다.

<172> 하기 표 5는 HIV-FT에서 암호화된 HLA-A^{*} 0201 에피토프 중 7개의 에피토프에 대해 분석한 결과를 나타낸다. 웨타이드 균등량은 Nef 221에 대해 높은 33.3 ng/ml로부터 에피토프 Gag 271, Gag 386 및 Pol 774에 대한 웨타이드 균등량 0.4 ng/ml까지 변화하였다. 누적적으로 이들 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, HIV-FT로 형질

감염된 인간 세포주에서, 상이한 HLA-A^{*}0201 제한분해된 에피토프의 제시 수준에서 100배의 변화가 존재하였다. 또한, 항원성 분석에서 검출가능한 수준으로 제시된 모든 에피토프는 생체내에서 면역원성이 있었다. 면역원성이 있으나 항원성은 없는 유일한 에피토프는 Gag 271이었다. 이 경우, HIV-FT를 보유하는 HLA-A^{*}0201/K^b 유전자전이된 마우스의 면역화는 테스트한 배양물의 1/3 미만에서 약한 CTL 반응을 유도하였다. 항원성 분석에서 한계 선택성 이하로 제시된 2개의 에피토프, 즉 Gag 386 및 Pol 774는 비면역원성이었다. 결론적으로, 이들 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, HIV-FT 면역화에 의해 유도된 CTL 반응에서의 이종성은 적어도 부분적으로 최적이하의 에피토프 제시에 기인하는 것이었다.

표 5

HIV-FT 면역원성 및 항원성의 비교

에피토프	HIV-FT 면역원성		HIV-FT 항원성	
	크기 ¹	빈도 ²	펩타이드 균등률 ³	n ⁴
Pol 498	58.8(2.2)	94%(16/17)	23.8(2.0)	4
Env 134	16.1(5.0)	63%(5/8)	6.2(1.2)	3
Pol 448	15.7(2.6)	54%(7/13)	24.7(3.9)	3
Vpr 62	9.9(1.9)	83%(10/12)	ND	-
Nef 221	4.4(1.3)	78%(7/9)	33.3(6.0)	3
Gag 271	4.0(1.4)	31%(4/13)	<0.4	6
Gag 386	0	0%(0/17)	<0.4	3
Pol 774	0	0%(0/8)	<0.4	1

<174> 1 LU(참조)로 나타낸 크기; 펩타이드 균등률 R+0.44에 대한 상관 계수

<175> 2 양성 배양물의 빈도(배양물 수>2LU/테스트한 총수); 펩타이드 균등률 R+0.8에 대한 상관 계수

<176> 3 ng/ml로 나타낸 크기

<177> 4 독립적인 실험의 수

<178> 예방접종 후 생체내에서 플랭킹 아미노산은 CTL 에피토프 면역원성에 영향을 미친다.

<179> 본원에 기술한 바와 같이, 개개의 CTL 에피토프에 접하는 특정 아미노산은 에피토프가 단백질 분해에 대한 항원의 민감성을 변경시킴으로써 처리되는 효율에 영향을 미친다. 에피토프 면역원성에 대한 플랭킹 아미노산의 영향을 조사하기 위해, 면역원성 데이터를 개별 서열 없이 최소 CTL 에피토프를 암호화하는 다수의 관련이 없는 멀티에피토프 DNA 작제물로 면역화한 HLA-A^{*}0201, -A^{*}1101 및 -B^{*}0701 유전자전이된 마우스로부터 수득하였다. 94개의 상이한 에피토프/플랭킹 잔기 조합을 나타내는 데이터베이스를 편집하여 바로 접하는 아미노산 서열의 에피토프 면역원성에 대한 가능한 영향을 결정하였다. 주어진 에피토프 및 플랭킹 아미노산 조합은 단지 1회 포함하도록 하여 과정으로 인한 분석의 인위적인 편향을 예방하였다. HLA 유전자전이체에서 에피토프 면역원성은, 30% 이상의 배양물에서 100 SU 또는 20 LU 이상이 측정되는 경우, 최적인 것으로 간주하였다. CTL 반응은 일반적으로 4가지 카테고리중 하나로 평가하였다: (++), 현저함, 200 LU 또는 1000 SU 보다 큼; (++) 양호, 20-200 LU 또는 100-10000 SU; (+) 중간, 2 내지 20 LU 또는 10 내지 100 SU; 및 (+/-), 약함 또는 음성, 2LLU 또는 10 SU 미만. 최적 반응 대 최적이하의 반응의 수는 플랭킹 위치에서 아미노산의 화학적 형태를 기준으로 구분하였으며, 차이의 유의성은 카이제곱(chi-square) 테스트로 결정하였다.

<180> 상기 분석은 에피토프의 아미노 말단에 존재하는 아미노산의 유형과 면역원성 사이의 상관 관계를 밝히지는 못했다. 그러나, 카르복시 말단 플랭킹 잔기, 즉 C+1 잔기의 중요한 효과는 확인되었다. 양으로 하전된 아미노산, K 또는 R은 거의 종종 최적 CTL 반응과 관련이 있었다(68%의 빈도, 도 5). C+1 잔기에서 아미노산 N 및 Q의 존재는 또한 조사한 경우의 55.5%에서 강한 CTL 반응을 나타냈으며; 에피토프가 N에 의해 C+1 위치에 접하는 경우, 이들은 3/4의 경우에서 최적 CTL 반응을 나타냈다. 일반적으로, 작은 잔기, 예를 들어 C, G, A, T 및 S는 분석에 이용할 수 있는 조합의 54%에서 강한 반응을 유도하는 중간 CTL 반응을 촉진하였다. 역으로, 방향족 아미노산 및 지방족 아미노산과 접한 에피토프는 생체내에서 단지 각각 36% 및 17%의 경우에 최적 반응을 유도

하였다. 음으로 하전된 잔기, 즉 D는 최적이하의 CTL 반응을 나타냈다. 에피토프 면역원성에 대한 C+1 아미노산의 영향은 키-제곱 테스트를 이용하여 확인한 결과 통계적으로 유의적이었다($P<0.03$). C+1 위치 보다 더 먼 C-말단 잔기에 대해 유사한 분석을 수행하는 경우, 에피토프 면역원성에 대해 유의한 영향은 확인되지 않았다.

<181> 에피토프 면역원성에 대한 C1 잔기의 효과의 직접적인 평가

<182> C+1 플랭킹 위치에서 바람직한 유형의 아미노산 대 유해한 유형의 아미노산의 효과를 직접적으로 평가하기 위해, HBV.1 및 HBV.2(도 3b)이라 칭하는 2개의 멀티에피토프 작제물을 평가하였다. HIV-FT를 이용하는 경우와 동일하게, 이들 HBV 작제물은 개체 스페이서 없이 연속적으로 에피토프를 암호화하였다. 실제로, HBV.1 및 HBV.2는 유사한 HBV-유래된 에피토프로 이미 특정화된 실험적 멀티에피토프 작제물인 pMin1(Ishioka, 상기 문헌 참조)내의 HIV-1 에피토프를 대체하였다.

<183> HBV.7에 있어서 고도로 면역원성인 HBV 코어 18 에피토프에 직접 후속하는 HIV-1 에피토프는 HBV Pol 562 에피토프로 대체하였다. 이는 C+1 잔기를 K에서 F로 변경시켰다. 두 번째 작제물인 HBV.2는 HBV 코어 18과 Pol 562 에피토프 사이에 추가 에피토프 HBV Pol 629를 삽입하여 제조하였으며; 이러한 변화는 C+1 아미노산을 K 잔기로 대체하였다. 이를 상이한 구조로 제시된 코어 18 에피토프의 면역원성이 HLA-A^{*}0201/K^b 유전자전이된 마우스에서 평가되는 경우, 코어 18 에피토프는 HBV.1에서는 실질적으로 비면역원성이었으나, HBV.2에서는 강한 면역원성을 나타냈다(도 6a). 이 에피토프에 대한 생체내 면역원성의 감소는 본 발명자들의 이전 분석에서 이미 예상된 것이었다.

<184> CTL 에피토프 면역원성에 대한 C1 플랭킹 아미노산의 효과를 추가로 테스트하기 위해, 코어 18 에피토프에 대한 C+1 위치에 단일 아미노산을 삽입함으로써 HBV.1과는 상이한 한 셋트의 작제물(도 3c)을 평가하였다. W, Y 또는 L에 의해 C+1 위치에서 접하는 경우, 코어 18 에피토프에 대해 CTL 반응은 거의 관찰되지 않거나 전혀 관찰되지 않았다(도 6b). 대조적으로, 단일 K 잔기의 삽입은 코어 18에 대한 CTL 반응을 현저히 증가시켰다. 상기 반응은 코어 18 에피토프가 에피토프의 N 말단에 K를 보유한 에피토프인 pol 629에 접한 HBV.2에서 관찰된 반응에 필적하였다. 또한, 코어 18 CTL 반응의 증강은 R, C, N 또는 G의 삽입에 대해서도 관찰되었다. 이들 삽입의 효과는 특이적이었는데, 그 이유는 이들 작제물내 다른 에피토프의 면역원성은 CTL 반응에서 중요한 변화를 나타내지 않았기 때문이다(자료는 나타내지 않음). 결론적으로, 이들 자료로부터 확인할 수 있는 바와 같이, C+1 아미노산은 에피토프 면역원성에 현저한 영향을 미쳤다.

<185> CTL 에피토프 면역원성에서의 변화는 제시된 양과 관련이 있다.

<186> 상이한 C+1 잔기와 관련된 코어 18의 면역원성의 변화가 단백질 분해에 대한 차등 민감성의 결과인 경우, 에피토프 제시 수준의 커다란 차이는 상이한 작제물에서 검출할 수 있어야만 한다. 이를 테스트하기 위해, 유전자 전이된 마우스 20에서 발현된 동일한 HLA-A^{*}0201/K^b 유전자를 발현하는 주르카트 세포를 HBV.1 또는 HBV.1K를 발현하는 에피좀 벡터를 이용하여 형질감염시켰다. 코어 18 에피토프는, K가 C+1 위치에 존재하는 경우, 동일한 위치에 F가 존재하는 경우에 비해 $>10^5$ 이상의 수준으로 제시되었다(도 7). 코어 18 제시에서의 이러한 차이는 표적 세포주 사이에서의 유전자 발현의 차이에 기인하는 것 같지는 않은데, 그 이유는 pol 455의 제시는 10 배 미만으로 변화되기 때문이다. 이들 자료는 C+1 위치의 아미노산이 멀티에피토프 DNA 백신에서 에피토프 제시 효능에 대해 영향을 미칠 수 있다는 놀라운 효과를 나타내고 있다. 따라서, 이들 자료로부터 확인할 수 있는 바와 같이, DNA 백신에서 CTL 에피토프의 면역원성은 에피토프 제시의 수준에 영향을 미치는 구성을 고려함으로써 최적화할 수 있다. 이러한 유형의 최적화는 다른 포맷, 예를 들어 바이러스 벡터 및 당업계에 공지된 다른 발현 벡터를 이용하여 전달되는 에피토프 기초한 백신에도 적용할 수 있는데, 그 이유는 상기 효과는 항원이 전사되고 해독된 후에 발휘되기 때문이다.

<187> 요약하면, 플랭킹 잔기에 있어서, 매우 작은 잔기, 예를 들어 A, C 또는 G, 또는 큰 잔기, 예를 들어 Q, W, K 또는 R은 일반적으로 양호한 또는 현저한 반응과 관련되어 있음을 확인하였다. 미니유전자내 종결 코돈으로 인한 C+1 잔기의 부재 또는 중간 크기 잔기, 예를 들어 S 또는 T의 존재는 더 중간 정도의 반응 패턴과 관련되어 있다. 최종적으로, 음으로 하전된 잔기 D; 지방족(V, I, L, M) 또는 방향족 비트립토판 잔기(Y, F)의 경우, 상대적으로 불량한 반응이 관찰되었다. 이들 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 에피토프의 C 말단에 접하는 특정 잔기는 반응 빈도 및 크기에 현저한 영향을 미쳤다. 또한, C+1 위치에서 플랭킹 잔기는 스페이서 서열과 함께 도입될 수도 있다. 따라서, 면역원성에 바람직한 영향을 미치는 잔기, 바람직하게는 K, R, N, A 또는 G가

스페이서의 플랭킹 잔기로서 포함된다.

<188> 폴리에피토프 작제물의 분류 및 최적화

본 발명을 이용하여 폴리에피토프 작제물을 개발하기 위해, 폴리에프토프 작제물내 포함되는 에피토프를 분류하고, 본원에 기술한 변수를 이용하여 최적화하였다. 분류 및 최적화는 컴퓨터를 이용하여 수행하거나, 소수의 에피토프에 대해서는 컴퓨터를 이용하지 않고 수행하였다.

컴퓨터를 이용하는 최적화는 일반적으로 다음과 같이 수행할 수 있다. 후술하는 내용은 동정 및 최적화하는 컴퓨터 시스템의 한 예를 제공하는 것이다. 즉, 최소의 접합 에피토프, 및 최대의 플랭킹 잔기, 에피토프 조합을 제공한다.

에피토프 분류의 한 성분은 "접합 분석기(junctional analyzer)"이다. 예를 들어, 이 프로그램은 텍스트 파일을 이용하여 프로그램 운용을 위한 변수를 특정화한다. 다섯개 유형의 입력 자료가 프로그램에 제공된다: 1) 처리할 한 셋트의 웨타이드. 2) 각각의 아미노산이 C+1 및 N-1 위치에 나타나는 경우, 그 각각의 아미노산에 대한 한 셋트의 중량. 3) 접합 검출에 사용하기 위한 한 셋트의 모티프. 4) 각각의 웨타이드 쌍 사이에 삽입 할 아미노산의 최대수. 5) 프로그램 운용을 위한 기타 값. 상기 프로그램은 모든 가능한 쌍의 웨타이드를 평가하며, 접합의 수, C+1 및 N-1 중량을 계산하고, 미리 정해진 수식에 따라 이들을 조합한다. 현재 등식은 접합의 수를 나눈 두개 체중의 값이다. 접합의 수가 0인 경우, 연산값은 0.5로 나눈다. 웨타이드 쌍을 평가하기 위한 다른 수식은 임의의 시점에 상기 프로그램에 삽입할 수 있다. 상기 프로그램의 출력값은 각각의 웨타이드 쌍에 대해 최대 함수 결과를 산출하는 삽입값을 목록화한 텍스트 파일이다. 또한, 상기 파일은 원래의 웨타이드 목록을 포함하며, 처리의 다음 단계를 수행하는 2개의 프로그램중 어느 한 프로그램의 조작을 조절하는 명령을 포함한다. 이들 두 프로그램은 "Exhaustive J Search" 및 "Stochastic J Search" 이다.

"Exhaustive J Search"는 함수 결과의 최대값을 보유하는 것을 선택하기 위해 웨타이드의 모든 순열을 조사한다. 이 프로그램은 최대 함수값을 가진 순열을 찾아낸다. 그러나, 순열의 계승적 성질로 인해, 최대 12 개 또는 13개의 웨타이드에 대해서만 사용할 수 있다. 13개의 웨타이드에 대한 예상 소요 시간은 2.9 시간이며, 14개의 웨타이드에 대해서는 약 40 시간이다. "Stochastic J Search"는 순열 서열의 많은 영역을 조사하고, 이를 찾아내는 최적 함수값을 보고한다. 현재의 최대 함수 총계에 미치거나 이를 초과하는 순열만을 보고함으로써, 순열 서열의 더 넓은 영역을 조사하는 것이 가능하다. 이 기법은 20개 만큼 많은 웨타이드를 성공적으로 처리할 수 있다. 20개의 웨타이드를 완전하게 조사하는데 소요되는 시간은 약 1.3×10^5 년이다.

<193> 상기 프로그램은 다음과 같이 운용된다:

<194> 이들 변수는 프로그램에 입력한다:

<195> 1. 분류할 에피토프

<196> 2. 상기한 바와 같이, 아미노산 C+1 & N-1 "중량"

<197> 3. 접합 에피토프를 검출하기 위한 모티프

<198> 4. 최대 이격 잔기

<199> 5. 프로그램 선택을 제어할 변수

<200> 이후 접합 분석기 프로그램을 다음과 같이 수행한다:

<201> 1. 모든 에피토프 쌍을 생성한다.

<202> 2. 웨타이드에서 각각의 쌍에 대해, 이격 잔기의 C+1 및 N-1의 기여로 인한 접합 에피토프의 최소수 및 최대 효과를 야기하는 삽입 세트를 결정한다.

<203> 3. 각각의 쌍에 대해 최적 이격 잔기와 최적화 접합 값을 출력한다.

<204> 14개 이상의 에피토프가 폴리에피토프 작제물내에 포함되는 경우, "확률적 탐색(Stochastic Search)"을 사용한다. "확률적 탐색" 프로그램은 웨타이드의 최적 배열의 최상의 산정치를 찾아내는 순열 공간에서 다수의 영역을 조사하는, 당업계에 몬테 카를로(Monte Carlo) 기법으로 공지된 기법을 이용한다.

- <205> 14개 미만의 에피토프가 포함되는 경우, "전역 탐색(Exhaustive Search)" 프로그램을 이용한다. "전역 탐색" 프로그램은 모든 에피토프 쌍에 대한 최적 함수의 합계에 대한 최상의 값을 가진 것을 찾아내기 위해 폴리에피토프 작제물을 구성하는 에피토프의 모든 순열을 조사한다. 모두 조사하기 때문에, 이 프로그램은 "최상의" 순열을 찾아내는 것을 보장한다.
- <206> 상기 프로그램 출력값은 에피토프의 최상 배열의 목록을 제공한다. 다수의 순열이 평가 함수의 동일한 값을 보유하기 때문에, 몇몇 함수를 생성하여 최적 배열을 선택하는데 다른 인자를 고려할 수 있도록 한다.
- <207> 상기 프로그램 분석 시스템을 이용하여 생성한 폴리에피토프 작제물의 예는 도 9에 제공하였다.
- <208> 다른 인자, 예를 들어 전하 분포, 소수성/친수성 영역 분석, 또는 예상 폴딩도 평가 함수에 삽입하여 미니유전자 작제물을 추가로 최적화한다.
- <209> 거대분자 구조물, 예를 들어 폴리펩타이드 구조물은 여러가지 조직화 수준으로 기술할 수 있다. 이러한 조직화에 대한 일반적인 내용은 문헌[참조: Alberts 등, Molecular Biology of the Cell(3판, 1994) 및 Cantor과 Schimmel, Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules(1980)]에 기술되어 있다. "일차 구조"는 특정 웨بت아이드의 아미노산 서열을 의미한다. "이차 구조"는 폴리펩타이드내 국소적으로 정렬된 3차원 구조를 의미한다. 이들 구조는 통상 도메인이라 칭한다. 도메인은 폴리펩타이드의 압축 단위를 형성하는 폴리펩타이드의 부분이다. 전형적인 도메인은 더 적은 조직화 단편, 예를 들어 β -시트 또는 α -헬릭스의 신장부로 구성된다. "삼차 구조"는 폴리펩타이드 단량체의 완전한 3차원 구조를 의미한다. "사차 구조"는 개별적인 삼차 단위의 비공유결합에 의해 형성된 3차원 구조를 의미한다.
- <210> 구조적 예상, 예를 들어 전하 분포, 소수성/친수성 영역 분석 또는 예상 폴딩은 당업자에 공지된 서열 분석 프로그램을 이용하여 수행할 수 있는데, 예를 들어 소수성 및 친수성 도메인을 동정할 수 있다[참조: 예를 들어, Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982) 및 Stryer, Biochemistry(3판, 1998); 또는 인터넷에 기초한 다수 서열 분석 프로그램중 임의의 프로그램, 예를 들어 dot.imgen.bcm.tmc.edu에서 발견되는 프로그램].
- <211> 또한, 폴리에피토프 작제물의 3차원 구조 모델을 제조할 수 있다. 이는 일반적으로 분석하려는 아미노산 서열을 컴퓨터 시스템에 입력함으로써 수행된다. 아미노산 서열은 일차 서열 또는 단백질의 아서열을 나타내는데, 이들은 단백질의 구조 정보를 암호화한다. 이어서, 단백질의 3차원 구조 모델은 당업자에게 공지된 소프트웨어를 이용하여 상기 컴퓨터 시스템을 작동시킴으로써 생성된다.
- <212> 아미노산 서열은 목적 단백질의 이차, 삼차 및 사차 구조를 형성하는데 필요한 정보를 암호화한다. 상기 소프트웨어는 구조 모델을 생성하기 위해 일차 서열에 의해 암호화된 특정 변수를 검색한다. 이들 변수는 "에너지 관점"으로서 언급되는데, 주로 정전기적 페텐셜, 소수성 페텐셜, 용매 접근가능한 표면, 및 수소 결합을 포함한다. 제2 에너지 관점은 반데르발스 페텐셜을 포함한다. 생물학적 문자는 누적적 방식으로 에너지 관점을 최소한다. 따라서, 컴퓨터 프로그램은 일차 구조 또는 아미노산 서열에 의해 암호화된 이들 관점을 사용하여 이차 구조 모델을 제조한다.
- <213> 이어서, 이차 구조에 의해 암호화된 단백질의 삼차 구조는 이차 구조의 에너지 관점을 기초로 형성된다. 사용자는 추가적 변수, 예를 들면 단백질이 막에 결합하는지 또는 가용성인지에 대한 사항, 체내에서의 이의 위치, 및 이의 세포 위치(예컨대 세포질, 표면 또는 핵)을 입력한다. 이차 구조의 에너지 관점과 함께 이들 변수는 삼차 구조의 모델을 형성하는데 사용한다. 삼차 구조 모델링에서, 컴퓨터 프로그램은 이차 구조 등의 소수성 면과 2차 구조 등의 친수성 면을 매치시킨다.
- <214> HLA 프로세싱 장치에 가장 용이하게 접근할 수 있는 것을 선택한다.
- <215> II. 멀티에피토프 백신의 면역원성 평가
- <216> 멀티에피토프 미니유전자의 개발은 특별한 작업인데, 그 이유는 MHC의 웨بت아이드 결합에 대한 종 특이성 때문이다. 상이한 종으로부터 유래한 상이한 MHC 유형은 상이한 셋트의 웨بت아이드에 결합하는 경향이 있다[참조: Rammensee 등, Immunogenetics, Vol. 41(4): 178-228 (1995)]. 결과적으로, 일반적인 실험실 동물에서 인간에피토프로 이루어진 작제물을 테스트하는 것은 불가능하다. 이러한 제한을 극복하기 위해, 일반적으로 다음과 같은 대체적인 방법을 이용한다: 1) 비-인간 MHC에 의해 제한된 에피토프를 함유하는 유사 작제물을 테스트한다; 2) 비-인간 MHC에 의해 제한된 조절 에피토프에 의존한다; 3) 인간 MHC와 비-인간 MHC 사이의 교차 반응성에 의존한다; 4) HLA 유전자전이된 동물을 이용한다; 및 5) 생체내에서 인간 세포를 이용하는 항원성 분

석을 수행한다. 이하, 항원성 및 면역원성을 분석하기 위한 기법의 개발에 대한 개요를 기술한다.

<217> I형 HLA 유전자전이체

<218> 에피토프 동정[참조: Sette 등, J Immunol, Vol. 153(12): 5586-92 (1994); Wentworth 등, Int Immunol, Vol. 8(5): 651-9 (1996); Engelhard 등, J Immunol, Vol. 146(4): 1226-32 (1991); Man 등, Int Immunol, Vol. 7(4): 597-605 (1995); Shirai 등, J Immunol, Vol. 154(6): 2733-42 (1995)] 및 백신 개발[참조: Ishioka 등, J Immunol, Vol. 162(7): 3915-25 (1999)]을 목적으로 하는 HLA 유전자전이된 마우스를 이용한다. 대부분의 문헌에서는 HLA-A^{*}0201/K^b 마우스의 이용을 연구하고 있으나, 주목해야 할 점은 B^{*}27 및 B^{*}3501 마우스도 이용할 수 있다는 것이다. 또한, HLA-A^{*}11/K^b 마우스[참조: Alexander 등, J Immunol, Vol. 159(10): 4753-61 (1997)] 및 HLA B7/K^b 및 HLA A1/K^b 마우스도 생성된다.

<219> 38개의 상이한 잠재 에피토프로부터 얻은 자료를 분석하여 A2.1/K^b-유전자전이된 마우스와 A2.1+인간의 A2.1-제한된 CTL 레퍼토리 사이의 중첩 수준을 결정하였다[참조: Wentworth 등, Eur J Immunol, Vol. 26(1): 97-101 (1996)]. 인간과 마우스 둘 다에서, 약 500 nM의 MHC 웹타이드 결합 친화도 역치는 생체내에서 CTL 반응을 유발할 수 있는 웹타이드의 능력과 관계가 있다. 생체내에서의 인간에 대한 자료와 생체내에서의 마우스에 대한 자료 사이의 높은 수준의 일치는 높은 결합 웹타이드의 경우 85%, 중간 결합제의 경우 58% 및 낮은/음성 결합제에 대해 83%로 관찰되었다. 또한, HLA A11 및 HLA B7 유전자전이된 마우스를 이용하는 경우에도 유사한 결과가 얻어졌다[참조: Alexander 등, J Immunol, Vol. 159(10): 4753-61 (1997)]. 따라서, HLA 유전자전이된 마우스의 T 세포 수용체 레퍼토리와 사람 CTL사이에 존재하는 광범위한 중첩 때문에, 유전자전이된 마우스는 본원에 기술된 폴리에피토프의 면역원성을 평가하는데 유용하다.

<220> HLA A11 마우스에 관한 것이기 때문에 TAP 수송체의 상이한 특이성은, HLA-A11 유전자전이된 마우스의 면역원성을 평가하는데 사용하는 것을 막지 못한다. 쥐와 사람의 TAP 둘 모두는 소수성 말단을 가진 웹타이드를 효율적으로 수송하는 반면, 단지 사람 TAP는 양 전하의 C 말단을 가진 웹타이드, 예를 들면 A3, A11 및 A3 아유형의 다른 구성원에 의해 결합된 것을 효율적으로 수송한다. 이러한 것은 A2, A1 또는 B7에 적용되지 않는데, 그 이유는 쥐와 사람 TAP 둘 모두 A2, B7 또는 A1에 의해 결합된 웹타이드를 수송하는 능력이 똑같아야 하기 때문이다. 이러한 이해와 일치하게도, 문헌[Vitiello et al., J Exp Med, Vol. 173(4):1007-15 (1991) and Rotzschke O, Falk K., Curr Opin Immunol, Vol. 6(1):45-51(1994)]은 마우스와 사람 세포에서 프로세싱이 유사하다고 제시한 반면, 문헌[Rotzschke O, Falk K., Curr Opin Immunol, Vol. 6(1):45-51(1994)]은 쥐 세포와 사람 세포에서 상이하며, 둘다 HLA A3 분자를 발현함을 제시한다. 그러나, HLA A11 유전자전이체를 사용하여, T 세포와 B 세포상에서의 HLA 분자의 발현을 생체내에서 관찰하였으며, 이는 보고된 쥐의 TAP의 바람직하지 않은 특이성이 생체내에서 A11/kb 분자의 안정화 및 수송을 차단하지 않음을 제시한다[Alexander et al., J Immunol, Vol. 159(10):4753-61 (1997)]. 이를 자료는 전하를 띤 C 말단을 가진 웹타이드가 A11 분자로 형질감염된 쥐 세포로 부터 유출될 수 있다는 예전의 관찰과 일치한다[Maier et al., Immunogenetics; Vol. 40(4):306-8(1994)]. 복합 항원, 예를 들면 인플엔자에 대한 HLA A11 마우스에서의 반응 및 멀티에피토프 미니 유전자에 의해 암호화된 A11 제한된 에피토프에 대한 가장 중요한 반응[참조: Ishioka 등, J Immunol, Vol. 162(7): 3915-25 (1999)]도 검출되었다. 따라서, TAP 문제는 유전자전이된 마우스와는 사소한 관련이 있는 것으로 보인다.

<221> HLA 유전자전이된 마우스의 이용에서 다른 잠재적인 관련성은 HLA 발현 및 결합 특이성에 대한 β 2 마이크로글로불린의 가능한 영향이다. 인간 β 2가 마우스 마이크로글로불린 보다 더 높은 친화성과 안정성으로 인간 및 마우스 MHC 둘다에 결합한다는 것은 공지된 사실이다[참조: Shields 등, Mol Immunol Vol. 35(14-15): 919-28 (1998)]. 또한, MHC 종쇄와 β 2의 가장 안정한 복합체가 I형 MHC의 외부 로딩(loader)을 용이하게 한다는 사실도 널리 알려져 있다[참조: Vitiello 등, Science, Vol. 250(4989): 1423-6 (1990)]. 본 발명자들은 HLA/K^b 및 인간 β 2에 대해 이중 유전자전이체인 마우스를 생성함으로써 이 변화에 대한 잠재 효과를 조사하였다. 인간 β 2의 발현은 HLA B7/K^b 마우스의 경우 유익하며, HLA A1 유전자전이된 마우스의 경우 양호한 발현 수준을 획득하기 위해 절대적으로 필요하다. 따라서, HLA/K^b 및 β 2 이중 유전자전이된 마우스는 현재 일상적으로 사용되며, 본 발명의 발명자들이 이용하였다. 따라서, HLA 유전자전이된 마우스를 이용하여 4개의 주요 HLA 특이성(즉, A2, A11, B7 및 A1)의 HLA-제한된 인식을 모델링하였으며, 다른 HLA 특이성에 대한 유전자

전이된 마우스는 면역원성 평가를 위한 적합한 모델로서 개발할 수 있었다.

<222> I형 에피토프의 항원성 테스트

몇몇 개별적인 계통의 실험을 수행한 결과, 세포 표면 상에서 I형/펩타이드 복합체의 밀도는 T 세포 초회자극 수준과 관련이 있을 수 있음을 알아냈다. 따라서, 에피토프가 APC 표면 상에서 생성 및 제시되는 수준을 측정하는 것은 시험관 내에서 인간 세포내의 미니유전자 백신의 효능을 간접적으로 평가하기 위한 수단을 제공한다. HLA I형 유전자전이된 마우스의 이용에 대한 보충으로서 이 방법은 인간 세포에서 처리를 조사하는데 잇점을 제공한다[참조: Ishioka 등, J Immunol, Vol. 162(7): 3915-25 (1999)].

<224> 처리된 펩타이드를 실험적으로 정량하기 위한 몇몇 가능한 방법들을 이용할 수 있다. 세포 표면상의 펩타이드의 양은 APC 표면으로부터 용출된 펩타이드의 양을 측정하여 정량화할 수 있다[참조: Sijts 등, J Immunol, Vol. 156(2): 683-92 (1996); Demotz 등, Nature, Vol. 342(6250): 682-4 (1989)]. 또는, 펩타이드-MHC 복합체의 수는 감염된 또는 형질감염된 표적 세포에 의해 유도된 용해량 또는 림포카인 방출량을 측정하고, 이어서 균등 수준의 용해 또는 림포카인 방출을 획득하기 위해 필요한 펩타이드 농도를 측정함으로써 산정할 수 있다[참조: Kageyama 등, J Immunol, Vol. 154(2): 567-76 (1995)].

<225> 또한, 유사한 방법을 이용하여 미니유전자 형질감염된 세포주 내에서 에피토프 제시를 측정할 수 있다. 구체적으로, HLA 유전자전이된 마우스에서 면역원성인 미니유전자 작제물은 동일한 미니유전자로 형질감염된 인간 세포에 의해 최적 에피토프로 프로세싱되며, 유전자전이된 마우스에서 관찰된 반응의 크기는 형질감염된 인간 표적 세포로 관찰된 항원성과 관련이 있다[참조: Ishioka 등, J Immunol, Vol. 162(7): 3915-25 (1999)].

<226> 항원성 분석을 이용하여, 에피토프 순서와 플랭킹 잔기에서 차이를 보이는 다수의 관련된 미니유전자는 APC 내로 형질감염시킬 수 있고, 에피토프 제시에 대한 상기 변화의 영향을 평가할 수 있다. 이는 상대적으로 많은 수의 상이한 작제물을 평가할 필요가 있는 경우, 테스트를 위해 바람직한 시스템이다. 다수의 에피토프-특이적 CTL 프로토콜이 필요하지만, 고도로 민감성인 CTL 세포주의 생성[참조: Alexander-Miller 등, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93(9): 4102-7 (1996)] 및 그들의 더 큰 수로의 증대[참조: Greenberg P.D, Roddell S.R., Science, Vol. 285(5427): 546-51 (1991)]를 가능하게 하는 프로토콜을 개발하여 이러한 잠재적인 문제점을 해결하였다.

<227> 또한, 주목해야 할 점은, 형질감염을 위해 선택된 세포가 생체내에서 APC 기능을 수행하는 세포를 반영하지 않는 경우, 잘못된 결과가 얻어질 수 있다. "프로페셔널" APC로 공지된 B 세포 계통의 세포는 일반적으로 형질감염 수용체로서 사용된다. 이러한 유형의 형질감염된 B 세포의 이용은 당업계에서 용인되는 수단이다. 또한, 형질감염된 인간 B 세포를 이용하는 시험관내 자료와 HLA 유전자전이된 마우스를 이용하는 생체내 결과 사이의 양호한 상관 관계는 본원에 상세히 기술한 바와 같이 이미 지적하였다.

<228> HTL 반응의 측정

<229> 바람직한 구체예에서, 백신 작제물을 최적화하여 II형 제한된 면역 반응을 유도하였다. II형 에피토프를 포함하는 폴리에피토프 작제물을 평가하기 위한 한 방법은 HLA-DR 유전자전이된 마우스를 이용하는 것이다. 몇몇 그룹은 HLA-DR 유전자전이된 마우스를 생성하고, 특성을 규명하였다[참조: Taneja V., David C.S., Immunol Rev, Vol. 169: 67-79 (1999)].

<230> 특정 인간 MHC 분자와 실험 동물에 의해 발현된 특정 MHC 분자사이의 교차반응성이 의존하는 대안이 또한 존재한다. 문헌[Bertoni et al., J Immunol, Vol. 161(8):4447-55 (1998)]에 특정 HLA I형 슈퍼타입과 침팬지에 의해 발현된 특정 PATR 분자사이에 평가가능한 교차반응성이 입증될 수 있음이 개시되었다. 인간과 마카크 사이에 II형[Geluk et al., J Exp Med, Vol. 177(4):979-87(1993)] 및 I형 분자[Dzuris, et al., J. Immunol., July 1999]의 수준에서 교차반응성이 또한 기술되었다. 마지막으로, 또한, 인간 HLA B7 슈퍼타입에 의해 인지된 모티프가 쥐의 I형 L^d [Rammensee et al., Immunogenetics, Vol. 41(4):78-228 (1995)]에 의해 인지된 것과 필수적으로 동일하다는 것을 주목할 수 있다. 마우스에서 HLA DR 제한된 에피토프의 시험과 관련하여, 문헌[Wall et al., J. Immunol., 152:4526-36 (1994)]에는 DR1 및 IA^b의 모티프에 유사성이 존재한다고 기술되었다. 본 발명자는 통상적으로 본원의 유전자전이된 마우스를 사용하여 상기의 우연한 유사성을 이용하였다. 게다가, 본 발명자는 또한 본원의 대부분의 펩타이드가 IA^b와 결합하는 것을 제시하여 왔으며, 이에 따라

본 발명자는 이들 마우스를 CTL 및 HTL 면역원성의 연구에 이용한다.

<231> 임상 시료로부터 면역 반응의 측정 및 정량화

백신의 성능을 평가하는 중요한 요소는 면역 반응을 유도하는 능력을 평가하는 것이다. 면역원뿐만 아니라 공통된 기억 항원에 대한 CTL 및 HTL 반응의 분석이 흔히 사용되며 본 분야에 알려져 있다. 사용된 검정으로는 크롬 방출, 림포카인 분비 및 림프구증식 검정이 포함된다.

ELISPOT 검정, 세포내 사이토킨 염색 및 테트라머 염색과 같은 보다 민감한 기술이 본 분야에 이용되어 왔다. 보다 새로운 이들 방법은 흔한 CTL 및 HTL 검정보다 10 내지 100배 더 민감한 것으로 나타난다[Murali-Krishna et al., *Immunity*, Vol. 8(2):177-87 (1998)]. 그 이유는 종래 방법은 시험관내에서 증식할 수 있는 T 세포의 서브세트만을 측정하며 실질적으로 메모리 T 세포 구획의 분획만을 나타내기 때문이다[Ogg G.S., McMichael A.J., *Curr Opin Immunol*, Vol. 10(4):393-6 (1998)]. 구체적으로 HIV의 경우에, 이들 기술을 사용하여 이전의 기술로는 검출할 수 없었던 환자로부터의 항원-특이적 CTL 반응을 측정하였다[Ogg et al., *Science*, Vol. 279(5359):210-3-6 (1998); Gray et al., *J Immunol*, Vol. 162(3):1780-8 (1999); Ogg et al., *J Virol*, Vol. 73(11):9153-60(1999); Kalams et al., *J Virol*, Vol. 73(8):6721-8 (1999); Larsson et al., *AIDS*, Vol. 13(7):767-77(1999); Corne et al., *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, Vol. 20(5):442-7 (1999)].

비교적 소수의 예외로서, 새로이 분리된 세포의 직접적인 활성을 종래의 검정 방법으로 입증하는 것은 어렵다 [Ogg G.S., McMichael A.J., *Curr Opin Immunol*, Vol. 10(4):393-6 (1998)]. 그러나, 좀더 새로운 기술의 증가된 민감성은 연구자들이 감염된 인간 또는 실험 동물로부터 새로이 분리된 세포로부터의 반응을 검출할 수 있도록 하였다[Murali-Krishna et al., *Immunity*, Vol. 8(2):177-87 (1998); Ogg G.S., McMichael A.J., *Curr Opin Immunol*, Vol. 10(4):393-6 (1998)]. 시험관내 재자극 단계에 의존하지 않는 민감한 이들 검정의 이용은 자연 감염 및 암에서 CTL 작용의 연구를 상당히 용이하게 해 왔다. 대조적으로, 실험 백신의 효능을 판단하기 위한 마지막 수단으로서 사용된 검정은 보통 하나 이상의 시험관내 재자극 단계와 병행하여 실시한다[Ogg G.S., McMichael A.J., *Curr Opin Immunol*, Vol. 10(4):393-6 (1998)]. 실질적으로, 소수의 예외는 있으나 [Hanke et al., *Vaccine*, Vol. 16(4):426-35 (1998)](제시된 Allen et al.), 새로이 분리된 I형-제한된 CD8+ T 세포로 CTL 반응을 나타내도록 설계된 실험 백신에 의한 면역화에 대한 반응을 입증하는 것은 어려웠다. ELISPOT 또는 원 위치(*in situ*) IFN- γ ELISA와 같은 민감한 검정의 이용은 재자극 단계와 조합되어 최대의 민감성을 달성하였다. 또한, MHC 테트라머는 이러한 목적을 위해 사용된다.

MHC 테트라머는 1996년에 처음으로 Altman 등에 의해 공개되었다. 이들은 형광 마커로 태그된 테트라머내로 함께 복합체를 형성한 CTL 에피토프를 함유한 HIV-특이적 웨بت아이드와 함께 폴딩된 가용성 HLA-A2 I형 분자를 생성하였다. 이들은 에피토프를 인지하는 HIV-감염 개체의 T 세포의 군을 표지하는데 사용한다[Ogg G.S., McMichael A.J., *Curr Opin Immunol*, Vol. 10(4):393-6 (1998)]. 이어서, 이들 세포는 유세포측정법(flow cytometry)으로 정량하여 상기 에피토프에 특이적인 T 세포에 대한 빈도 측정치를 제공하였다. 이 기술은 HIV 연구 및 다른 감염 질환에서 아주 인기가 있었다[참조: Ogg G.S., McMichael A.J., *Curr Opin Immunol*, Vol. 10(4): 393-6 (1998); Ogg 등, *Science*, Vol. 279 (5359): 2103-6(1998); Gray 등, *J Immunol*, Vol. 162(3): 1780-8 (1999); Ogg 등, *J Virol*, Vol. 73(11): 9153-60 (1999); Kalams 등, *J Virol*, Vol. 73(8): 6721-8 (1999)]. 그러나, HLA 다형성은 이 기법의 일반적인 유용성을 제한할 수 있는데, 그 이유는 테트라마 기법이 한정된 HLA/웨بت아이드 조합에 의존하기 때문이다. 그러나, 확인된 바에 따르면, HIV-유래된 웨بت아이드를 포함하는 여러가지 웨بت아이드는 A2, A3 및 B7 슈퍼타입의 상이한 구성원의 관계에서 웨滞后아이드-특이적 CTL 세포주에 의해 인식된다[참조: Threlkeld 등, *J Immunol*, Vol. 159(4): 1648-57 (1997); Bertoni 등, *J Clin Invest*, Vol. 100(3): 503-13 (1997)]. 이들 관찰을 종합해보면, 주어진 MHC/웨滞后아이드 조합에 대한 T 세포 수용체(TCR)는 동일한 슈퍼타입으로부터 유래한 상이한 MHC 분자에 의해 제시된 동일한 웨滞后아이드에 대해 검출할 수 있는 친화성을 보유할 수 있음을 확인할 수 있다.

예방 백신의 효능이 장기간 지속되는 기억(memory) 반응의 유도와 일차적으로 관계가 있는 상황에서, 재자극 분석이 가장 적합할 수 있으며, 백신 유도된 면역학적 반응을 모니터하기 위한 가장 적당하고 민감한 측정 방법이다. 역으로, 치료 백신의 경우, 활성의 주요 면역학적 관계는 작용(effecter) T 세포 기능의 유도일 수 있으며, 이는 일차 분석에 의해 가장 적절히 측정된다. 따라서, 민감성 분석의 이용은 백신 효능의 면역학적 모니터링을 위한 가장 적합한 테스트를 가능하게 한다.

<237> 형질감염된 인간 APC내 멀티에피토프 미니유전자의 항원성

<238> 항원성 검정을 실시하여 인간 세포에서의 에피토프 프로세싱 및 제시를 평가한다. 이러한 분석을 실시하기 위하여 에피토프-기본 미니유전자 백신으로 인간 표적 세포를 효율적으로 형질감염시키는 에피腼 백터를 사용한다.

<239> 예를 들면, 221A2K^b 표적 세포를 HIV-1 미니유전자 백신으로 형질감염시켰다. 221A2K^b 표적 세포는 HLA 유전자 전이된 마우스에서 발현되는 A2K^b 유전자를 발현하지만 내인성 I형을 발현하지 않는다 [Shimizu Y, DeMars R., J Immunol, Vol. 142(9):3320-8 (1989)]. 이들 형질감염된 세포를 HLA 유전자전이된 마우스로부터 유래되고 여러 HIV-유래된 CTL 에피토프에 대해 특이적인 CTL 세포주에 항원을 제시하는 능력에 대해 검정하였다. 상이한 CTL 세포주의 항원 민감성 차이를 보정하기 위해, 비형질감염된 세포를 APC로서 사용하여 웨타이드 용량 역가측정을 병행하였다. 대표적인 데이터가 도 8에 나타나 있다. HIV Pol 498-특이적 CTL의 경우에, 형질감염된 표적 세포는 378 pg/ml의 IFN-γ의 방출을 유도하였다. 웨타이드 용량 반응의 조사 결과, IFN-γ 방출의 유사한 수준을 달성하기 위해 48 ng/ml의 외인성 부가된 웨타이드가 필요한 것으로 나타났다. 이를 결과는 48 ng/ml의 외인성 부가된 웨타이드에 상응하는 비교적 다량의 Pol 498 에피토프가 형질감염된 세포에 의해 제시된다는 것을 증명한다.

표 4

<240> 형질감염된 인간 세포에서의 항원성과 HIV-1 미니유전자의 HLA 유전자전이된 마우스에서의 면역원성사이의 비교

에피토프	항원성		면역원성	
	웨타이드 균등물 ¹⁾	n ²⁾	반응 % ³⁾	크기 ⁴⁾
HIV Pol 498	30.5	(6)	95%	46.7
HIV Env 134	6.2	(3)	62%	16.1
HIV Nef 221	2.1	(5)	82%	3.8
HIV Gag 271	<0.2	(6)	31%	4

(1) ng/ml; (2) 독립적인 실험의 횟수; (3) 양성 결과를 제공하는 CTL 배양물의 비율(%); (4) 용해 단위

<241> 비교로서, Gag 271 에피토프에 대해 특이적인 CTL을 사용하여 25 pg/ml 미만의 γIFN을 검출하였다. 비형질감염된 표적 세포를 사용한 대조 웨타이드 역가측정은 이러한 음성 결과가 0.2 pm/ml 이하의 웨타이드 균등물(P E)이 검출될 수 있기 때문에 사용된 특정 CTL 세포주의 낮은 민감성에 기인하지 않음을 나타냈다. 따라서, Gag 271 에피토프는 HIV-1 형질감염된 표적 세포에서 효율적으로 프로세싱 및 제시되지 않는다. 프로세싱 효율의 적절한 정량을 위해 웨타이드 균등물의 숫자를 이용하여, 적어도 200-배 적은 Gag 271이 Pol 498 에피토프와 비교하여 형질감염된 표적에 의해 제시되는 것을 알 수 있다.

<242> HIV-1내에 함유된 4개의 상이한 에피토프에 대한 여러 독립적인 결정의 결과가 표 4에 수록되어 있다. HIV-1 형질감염된 세포로부터 생성된 각 에피토프의 양은 Pol 498의 경우 30.5 PE 내지 Gag 271의 경우 0.2 PE 미만이었다. 두 에피토프 Env 134 및 Nef 221은 각각 6.1 및 2.1 PE의 중간 값과 관련이 있었다.

<243> 이들 결과는 HIV-1 작제물로 면역화 후 각 에피토프에 대해 관찰된 생체내 면역원성 값과 상호관련이 있었다. Pol 498 에피토프는 또한 예상한 대로 가장 면역원성이었다. 생체내에서 중간의 면역원성이 관찰된 Env 134 및 Nef 221 에피토프는 또한 형질감염된 인간 세포에 의해 중간의 효율로 시험판내 프로세싱되었다. 마지막으로, 검출가능한 시험판내 프로세싱이 관찰되지 않은 Gag 271은 또한 빈도 및 크기 모두에서 최적이하의 생체내 면역원성과 관련이 있었다.

<244> 이들 데이터는 몇 가지 중요한 사실을 암시한다. 첫째, 주어진 미니유전자내에서 함유된 상이한 에피토프는 차별적인 효율로 프로세싱 및 제시될 수 있음을 제안한다. 둘째, 면역원성은 생성된 프로세싱된 에피토프의 양과 비례함을 제안한다. 마지막으로, 이들 결과는 인간에 사용될 멀티에피토프 백신의 최적화 목적을 위한 유전자 전이된 마우스의 사용의 중요한 유효성을 제공한다.

III. 폴리에피토프 작제물의 제조

- <247> 폴리에피토프 작제물에 포함하기 위한 에피토프는 전형적으로 예를 들면 국제특허출원 PCT/US00/27766 및 PCT/US00/19774에 기술된 바와 같은 HLA I형 또는 II형 결합 모티프를 함유한다.
- <248> 폴리에피토프 작제물에 존재하는 다수의 HLA II형 또는 I형 에피토프는 동일한 항원 또는 상이한 항원으로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 폴리에피토프 작제물은 동일한 바이러스의 상이한 두 개 항원으로부터 유래되거나 상이한 바이러스의 상이한 두 개 항원으로부터 유래될 수 있는 한 개 이상의 HLA 에피토프를 함유할 수 있다. 폴리에피토프 작제물에 포함하기 위한 에피토프는 당업자가 예를 들면 HLA 대립형질-특이적 모티프 또는 슈퍼모티프를 함유하는 에피토프를 컴퓨터를 이용하여 선택할 수 있다. 본 발명의 폴리에피토프 작제물은 또한 한 개 이상의 넓은 교차반응성 결합 또는 보편적(universal) HLA II형 에피토프, 예를 들면 PADRETM (Epimmune, San Diego, CA)(미국특허 제5,735,142호에 기술되어 있음) 또는 PADRE 계열 문자를 암호화할 수 있다.
- <249> 보편적 HLA II형 에피토프는 유리하게는 다른 HLA I형 및 II형 에피토프와 결합하여 주어진 항원에 반응하여 활성화되는 세포의 수를 증가시키고 보다 넓은 군의 HLA-반응성 대립형질을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리에피토프 작제물은 항원에 대해 특이적인 HLA 에피토프, 보편적 HLA II형 에피토프 또는 특정 HLA 에피토프와 한 개 이상의 보편적 HLA II형 에피토프의 혼합물을 포함할 수 있다.
- <250> HLA I형 에피토프는 일반적으로 아미노산의 길이가 약 8 내지 약 13개, 특히 8, 9, 10 또는 11개이다. HLA II형 에피토프는 일반적으로 아미노산 길이가 약 6 내지 25개, 특히 약 13 내지 21개이다. HLA I형 또는 II형 에피토프는 원하는 어떠한 항원으로부터도 유래될 수 있다. 해당 항원은 바이러스성 항원, 표면 수용체, 종양 항원, 온코진, 효소 또는 면역 반응이 요구되는 모든 병원체, 세포 또는 분자일 수 있다. 에피토프는 한 개 또는 다수의 HLA 대립형질과 결합하는 능력을 기초로 하여 선택할 수 있다. 천연 서열의 유사체인 에피토프는 또한 본원에 기술된 폴리에피토프 작제물에 포함될 수 있다. 이러한 유사 웨타이드는 예를 들면 국제특허출원 PCT/US97/03778, PCT/US00/19774 및 공동계류중인 미국 특허원 제09/260,714호(99년 3월 1일 출원)에 기술되어 있다.
- <251> 폴리에피토프 작제물은 본 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 예를 들면, 폴리에피토프 작제물을 포함한 폴리펩타이드를 합성하고 연결할 수 있다. 그러나, 전형적으로, 재조합 DNA 기술을 이용하여 미니유전자로서 폴리에피토프 작제물을 수득한다.
- <252> IV. 발현 벡터 및 미니유전자의 작제
- <253> 본 발명의 폴리에피토프 작제물은 전형적으로 폴리에피토프 작제물을 암호화하는 미니유전자를 포함한 발현 벡터로서 제공된다. 이러한 발현 벡터의 작제는 예를 들면 PCT/US99/10646에 기술되어 있다. 발현 벡터는 항원이 발현되고 적절한 HLA 문자에 표적화되도록 적절한 유기체 세포에서 미니유전자를 암호화하는 전사 단위체를 발현할 수 있는 한 개 이상의 프로모터 요소를 함유한다. 예를 들면, 인간에게 투여하는 경우, 인간 세포에서 작용하는 프로모터 요소가 발현 벡터내로 도입된다.
- <254> 본 발명은 재조합 유전학 분야의 통상적인 기술에 의존한다. 본 발명에서 사용하는 일반적인 방법을 기술하고 있는 기본적인 문서는 다음과 같다: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 및 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994); Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait, ed., 1984); Kuijpers, Nucleic Acids Research 19(17): 5197; Dueholm, J. Org. Chem. 59:5767-5773 (1994); Methods in Molecular Biology, volume 20(Agrawal, ed.); 및 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, e.g., Part I, chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" (1993).
- <255> 에피토프를 암호화하는 핵산은 표준 기술에 따라 미니유전자내에 통합된다. 일반적으로 미니유전자 에피토프를 암호화하는 핵산 서열은 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 증폭 기술을 사용하여 분리하고 화학적으로 합성한다. 또한, 경우에 따라 재조합 클로닝 기술을 사용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 서열은 목적하는 에피토프를 증폭하거나(PCR을 사용하여 미니유전자를 통합시킬 때) 암호화하는(합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 미니유전자를 통합시킬 때) 것이 선택된다.
- <256> 프라이머를 이용한 증폭 기술은 전형적으로 DNA 또는 RNA로부터 선택된 에피토프를 암호화하는 서열을 증폭하고 분리하는데 사용한다 (참조: 미국특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호; PCR Protocols: A Guide to Methods

and Applications (Innis et al., eds, 1990)). 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 리가제 연쇄 반응(LCR)과 같은 방법을 사용하여 mRNA, cDNA, 게놈 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리로부터 에피토프 핵산 서열을 직접적으로 증폭시킬 수 있다. 제한 엔도뉴클레아제 부위가 프라이머내로 도입될 수 있다. PCR 반응에 의해 증폭된 미니 유전자를 아가로즈 겔로부터 정제하고 적절한 벡터내로 클로닝할 수 있다.

<257> 합성 올리고뉴클레오타이드를 또한 사용하여 미니유전자를 제작할 수 있다. 이 방법은 유전자의 센스 및 앤티-센스 가닥을 나타내는 일련의 중첩되는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 실시한다. 이어서, 이를 DNA 단편을 어닐링하고, 연결한 다음 클로닝한다. 시판되고 있지 않은 올리고뉴클레오타이드는 문헌[Beaucage & Caruthers, Tetrahedron Letts. 22:1859-1862 (1981)]에 기술된 고체상 포스포르아미다이트 트리에스테르 방법에 따라 문헌[Van Devanter et. al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984)]에 기술된 자동 합성기를 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 정제는 문헌[Pearson & Reanier, J. Chrom. 255:137-149 (1983)]에 기술된 바와 같이 고유(native) 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 음이온-교환 HPLC 의해 수행한다.

<258> 미니유전자의 에피토프는 전형적으로 전사를 지시하는 강력한 프로모터뿐만 아니라 다른 조절 서열(예, 인핸서 및 폴리아데닐화 부위)를 함유하는 발현 벡터내로 서브클로닝한다. 적합한 프로모터는 본 분야에 잘 알려져 있으며 문헌[Sambrook et al.] 및 [Ausubel et al.]에 기술되어 있다. 표유동물 세포를 위한 진핵 발현 시스템은 본 분야에 잘 알려져 있고 시판되고 있다. 이러한 프로모터로는 예를 들면 사이토메갈로바이러스(CMV), 로우스 육종 바이러스 LTR 및 SV40이 포함된다.

<259> 발현 벡터는 전형적으로 숙주 세포에서 미니유전자의 발현에 필요한 모든 추가의 요소를 함유하는 발현 카세트 또는 전사 단위체를 함유한다. 따라서, 전형적인 발현 카세트는 미니유전자에 작동적으로 연결된 프로모터 및 전사의 효율적인 폴리아데닐화를 위해 필요한 시그널을 함유한다. 카세트의 추가적인 요소는 작용성 스플리스 공여체 및 수용체 부위를 갖는 인핸서 및 인트론을 포함할 수 있다.

<260> 프로모터 서열이외에, 발현 카세트는 또한 효율적인 종결을 제공하는 구조 유전자의 전사 종결 영역 하류를 함유한다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 얻거나 상이한 유전자로부터 얻을 수 있다.

<261> 세포내로 유전 정보를 이송하기 위해 사용된 특정의 발현 벡터는 특별히 중요한 것은 아니다. 진핵 세포에서 발현을 위해 사용된 통상적인 벡터 어떠한 것도 사용할 수 있다. 진핵성 바이러스 유래의 조절 요소를 함유한 발현 벡터는 전형적으로 진핵성 발현 벡터, 예를 들면 SV40 벡터, CMV 벡터, 유두종(papilloma) 바이러스 벡터 및 엡스타인 바르(Epstein Bar) 바이러스로부터 유래된 벡터로 사용된다.

<262> 본 발명의 폴리에피토프 제작물은 플라스미드 벡터뿐만 아니라 바이러스성 또는 세균성 벡터를 포함한 여러 벡터로부터 발현될 수 있다. 바이러스성 발현 벡터의 예로는 백시니아(vaccinia) 또는 계두(fowlpox)와 같은 약독화 바이러스 숙주가 포함된다. 이 방법의 예로서, 백시니아 바이러스는 본 발명의 웨بت아이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 발현하는 벡터로서 사용된다. 종양을 함유한 숙주내로 도입될 때 재조합 백시니아 바이러스는 면역원성 웨بت아이드를 발현하며, 그럼으로써 숙주 CTL 및/또는 HTL 반응을 나타낸다. 면역화 프로토콜에 유용한 백시니아 벡터 및 방법은 예를 들면 미국특허 제4,722,848호에 기술되어 있다.

<263> 치료상의 투여 또는 면역화에 유용한 여러 다른 벡터, 예를 들면 아데노 및 아데노-수반(adeno-associated) 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 비-바이러스 벡터, 예를 들면 BCG(Bacille Calmette Guerin), 살모넬라 타이피(Salmonella typhi) 벡터, 해독화 탄저병 독소 벡터 등은 당업자에게 자명하다.

<264> 폴리에피토프 제작물의 면역원성 및 항원성은 본원에 기술된 바와 같이 평가된다.

표적화 서열

<265> 본 발명의 발현 벡터는 MHC 표적화 서열에 작동적으로 연결된 한 개 이상의 MHC 에피토프를 암호화한다. MHC 표적화 서열을 사용하는 경우에, 폴리웨بت아이드 에피토프를 MHC 분자 통합체의 부위로 지시하고 세포 표면으로 수송함으로써 T 세포에 결합하고 활성화하는데 이용되는 MHC 분자-웨بت아이드 에피토프 복합체의 수를 제공시키므로 단독의 항원 전달에 비해 항원에 대한 면역 반응이 증가된다.

<267> MHC I형 표적화 서열은 본 발명에서 사용될 수 있으며, 예로는 MHC I형 에피토프 웨بت아이드를 시토졸 경로로 또는 소포체로 표적화하는 서열을 들 수 있다(참조예: Rammensee et al., Immunogenetics 41:178-228 (1995)). 예를 들면, 시토졸 경로는 세포내부에서 발현되는 내인성 항원을 프로세싱한다. 비록 특별한 이론에 한정되는

것을 원치 않지만, 시토졸 단백질은 프로테아좀의 엔도펩티다제 활성에 의해 적어도 부분적으로 분해된 다음 TAP 분자(프로세싱과 연관된 수송체)에 의해 소포체로 수송되는 것으로 생각된다. 소포체에서 항원은 MHC I형 분자와 결합한다. 소포체 시그널 서열은 시토졸 프로세싱 경로를 우회하고 직접적으로 내인성 항원을 소포체로 표적화하며, 그곳에서 웹타이드 단편으로의 단백질분해가 일어난다. 이러한 MHC I형 표적화 서열은 본 분야에 잘 알려져 있으며 Ig 카파, 조직 플라스미노겐 활성화제 또는 인슐린으로부터의 시그널 서열과 같은 시그널 서열이 포함된다. 바람직한 시그널 웹타이드는 인간 Ig 카파 쇄 서열이다. 소포체 시그널 서열이 또한 MHC II형 에피토프를 소포체, MHC I형 분자 통합체의 부위로 표적화하는데 사용될 수 있다.

<268> MHC II형 표적화 서열이 또한 본 발명에 사용될 수 있으며, 예를 들면 세포내이입 경로로 웹타이드를 표적화하는 것이 포함된다. 이를 표적화 서열은 전형적으로 세포외 항원이 세포내이입 경로에 들어가도록 지시하고 항원이 리소좀 구획으로 전달되도록 하며, 그곳에서 항원은 단백질분해에 의해 MHC II형 분자에 결합하는 항원 웹타이드로 절단된다. 외인성 항원의 정상적인 프로세싱에서와 같이, MHC II형 에피토프를 세포내이입 경로의 엔도좀 및/또는 이어서 리소좀으로 지시하고, 그곳에서 MHC II형 에피토프가 MHC II형 분자와 결합할 수 있도록 하는 서열은 MHC II형 표적 서열이다. 예를 들면, 본 발명에 유용한 MHC II형 표적화 서열의 군은 폴리웹타이드를 리소좀으로 집중시키는 리소좀 표적화 서열이다. MHC II형 분자는 전형적으로 리소좀내에서 세포내이입된 항원의 단백질분해 프로세싱으로부터 유래된 항원 웹타이드와 결합하며, 리소좀 표적화 서열은 MHC II형 표적화 서열로서 작용할 수 있다. 리소좀 표적화 서열은 본 분야에 잘 알려져 있으며 1997년 5월 27일에 허여된 아우구스트(August) 등의 미국특허 제5,633,234호에 기술된 바와 같이 리소좀 단백질 LAMP-1 및 LAMP-2에서 발견된 서열을 포함한다. 이 특허는 본원에 참고로 원용된다.

<269> 리소좀 표적화 서열을 함유하는 다른 리소좀 단백질로는 HLA-DM이 포함된다. HLA-DM은 MHC II형 분자에 항원 웹타이드의 결합을 촉진하는데 작용하는 엔도좀/리소좀 단백질이다. HLA-DM은 리소좀에 위치하기 때문에 MHC II형 분자 표적화 서열로서 작용할 수 있는 리소좀 표적화 서열을 갖는다(Copier et al., J. Immunol. 157:1017-1027 (1996)). 이 문헌은 본원에 참고로 원용된다.

<270> 내재하는 리소좀 단백질 HLA-DO가 또한 리소좀 표적화 서열로 작용할 수 있다. 단백질을 리소좀으로 표적화하는 특정 Tyr-함유 모티프를 암호화하는 상기된 내재하는 리소좀 단백질 LAMP-1 및 HLA-DM과 대조적으로, HLA-DO는 HLA-DM과 결합하여 리소좀으로 표적화된다(Liljedahl et al., EMBO J. 15:4817-4824 (1996)). 이 문헌은 본원에 참고로 원용된다. 따라서, HLA-DM과의 결합을 일으키고 결과적으로 HLA-DO를 리소좀으로 전좌시키는 HLA-DO의 서열은 MHC II형 표적화 서열로서 사용할 수 있다. 유사하게, HLA-DO의 쥐 상동체인 H2-DO는 MHC II형 표적화 서열을 유도하는데 사용할 수 있다. MHC II형 에피토프는 HLA-DO 또는 H2-DO에 융합되어 리소좀으로 표적화될 수 있다.

<271> 다른 예로서, B 세포 수용체 아단위 Ig- α 및 Ig- β 의 세포질 도메인은 항원 내부화를 매개하고 항원 제시의 효율을 증가시킨다(Bonnerot et al., Immunity 3:335-347 (1995)). 본 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 따라서, Ig- α 및 Ig- β 단백질의 세포질 도메인은, 프로세싱하고 MHC II형 분자에 결합시키기 위한 세포내이입 경로로 MHC II형 에피토프를 표적화하는 MHC II형 표적화 서열로 작용할 수 있다.

<272> MHC II형 에피토프를 세포내이입 경로로 지시하는 MHC II형 표적화 서열의 다른 예로는 폴리웹타이드가 분비되도록 지시하여, 폴리웹타이드가 엔도좀 경로에 들어갈 수 있도록 하는 서열을 들 수 있다. 폴리웹타이드가 분비되도록 지시하는 MHC II형 표적화 서열은 외인성 세포외 항원을 MHC II형 분자와 결합하는 웹타이드로 프로세싱하는 정상적인 경로를 모사한다. 소포체를 통해 폴리웹타이드를 지시하고, 궁극적으로 분비되도록 작용하는 어떠한 시그널 서열도 분비된 폴리웹타이드가 엔도좀/리소좀 경로에 들어갈 수 있고 MHC II형 분자와 결합할 수 있는 웹타이드로 절단될 수 있는 한, MHC II형 표적화 서열로서 작용할 수 있다.

<273> 다른 예로서, Ii 단백질은 소포체내의 MHC II형 분자와 결합하고, 그곳에서 소포체에 존재하는 웹타이드가 MHC II형 분자와 결합하는 것을 방지하는 작용을 한다. 따라서, Ii 단백질에 MHC II형 에피토프의 융합은, MHC II형 에피토프를 소포체 및 MHC II형 분자로 표적화한다. 예를 들면, Ii 단백질의 CLIP 서열을 제거하고 MHC II형 에피토프 서열로 치환시킬 수 있고 이에 따라 MHC II형 에피토프가 소포체로 지시되고, 그곳에서 에피토프는 MHC II형 분자와 결합한다.

<274> 일부 경우에, 항원 자체는 MHC II형 또는 I형 표적화 서열로서 작용할 수 있고 보편적 MHC II형 에피토프에 융합하여 면역반응을 자극할 수 있다. 비록 세포질 바이러스 항원이 일반적으로 프로세싱되고 MHC I형 분자와 복합체로서 제시될 지라도 인플루엔자 매트릭스 단백질과 같이 장기간 존재하는 세포질 단백질은 MHC II형 분자 프로세싱 경로에 들어갈 수 있다(Gueguen & Long, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14692-14697 (1996)).

이 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 따라서, 장기간 존재하는 세포질 단백질은 MHC II형 표적화 서열로서 작용할 수 있다. 예를 들면, 유리하게는 보편적 MHC II형 에피토프에 융합된 인플루엔자 매트릭스 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 사용하여 인플루엔자 항원 및 보편적 MHC II형 에피토프를 MHC II형 경로로 표적화하여 인플루엔자에 대한 면역 반응을 자극할 수 있다.

<275> MHC II형 표적화 서열로서 작용하는 항원의 다른 예로는 자발적으로 입자를 형성하는 폴리펩타이드가 포함된다. 이 폴리펩타이드는 이들을 생성하고 자발적으로 입자를 형성하는 세포로부터 분비되고, 입자는 수용체-매개된 세포내이입과 같은 세포내이입 흡수에 의해 항원-제시 세포내로 흡수되고 식균 작용에 의해 함입된다. 입자는 엔도좀/리소좀 경로로 들어간 후 항원 펩타이드내로 단백질분해로 절단된다.

<276> 입자를 자발적으로 형성하는 한 가지 폴리펩타이드는 HBV 표면 항원(HBV-S)이다(Diminsky et al., Vaccine 15:637-647 (1997); Le Borgne et al., Virology 240:304-315 (1998)). 이 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 입자를 자발적으로 형성하는 다른 폴리펩타이드는 HBV 코어 항원이다(Kuhrober et al., International Immunol. 9:1203-1212 (1997)). 이 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 입자를 자발적으로 형성하는 또 다른 폴리펩타이드는 효모 Ty 단백질이다(Weber et al., Vaccine 13:831-834 (1995)). 이 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 예를 들면, 유리하게는 일반적인 MHC II형 에피토프에 융합된 HBV-S 항원을 함유한 발현 벡터를 사용하여 표적 HBV-S 항원 및 보편적 MHC II형 에피토프를 MHC II형 경로로 표적화하여 HBV에 대한 면역 반응을 자극할 수 있다.

생체내 투여

<278> 본 발명은 또한 본 발명의 발현 벡터를 개체에게 투여함으로써 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 면역 반응을 자극하기 위해 본 발명의 발현 벡터를 투여하는 것이 유리하다. 그 이유는 본 발명의 발현 벡터가 MHC 에피토프를 MHC 분자로 표적화하고 이에 따라 발현 벡터에 의해 암호화된 항원에 의해 활성화된 CTL 및 HTL의 수가 증가되기 때문이다.

<279> 처음에, 본 발명의 발현 벡터를 마우스에서 스크리닝하여 목적하는 면역 반응을 자극하는데 최적의 활성을 갖는 발현 벡터를 결정한다. 따라서, 초기 연구는 필요한 경우 MHC 표적화 서열의 마우스 유전자로 실시한다. 본 발명의 발현 벡터의 활성을 결정하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있으며 예로는 실시예 II 및 III에 하기된 바와 같이 T 세포 활성화를 측정하기 위한 ³H-티미딘의 흡수 및 CTL 활성을 측정하기 위한 ⁵¹Cr의 방출이 포함된다. 실시예 IV에 기술된 것과 유사한 실험을 실시하여 면역 반응을 자극하는데 활성을 갖는 발현 벡터를 결정한다. 활성을 갖는 발현 벡터는 또한 인간에서 시험한다. 암호화된 마우스 서열에 대한 잠재적으로 유해한 면역학적 반응을 우회하기 위해, MHC II형 표적화 서열이 인간 유전자로부터 유래되도록 활성을 갖는 발현 벡터를 변형시킨다. 예를 들면, 여러 MHC II형 표적화 서열을 함유한 유전자의 인간 상동체의 유사한 영역의 치환이 본 발명의 발현 벡터내로 치환된다. 아래 실시예 I에 기술된 바와 같은 인간 MHC II형 표적화 서열을 함유한 발현 벡터를 인간에서 면역 반응을 자극하는 활성에 대해 시험한다.

<280> 또한, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체 및 본 발명의 발현 벡터를 포함한 약제학적 조성물에 관한 것이다. 약제학적으로 허용되는 담체는 본 분야에 잘 알려져 있으며 생리학적으로 완충된 염수, 알코올/수용액 또는 다른 용매 또는 비히클(예, 글리콜, 글리세롤, 올리브유와 같은 오일 도는 주사용 유기 에스테르)을 포함한 수성 또는 비-수성 용액, 혼탁액 및 에멀젼을 포함한다.

<281> 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들면 발현 벡터를 안정화하거나 발현 벡터의 흡수를 증가시키는 작용을 하는 생리학적으로 허용되는 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 생리학적으로 허용되는 화합물의 예로는 탄수화물(예, 글루코즈, 수크로즈 또는 텍스트란), 산화방지제(예, 아스코르브산 또는 글루타티온), 퀼레이팅제, 저분자량 폴리펩타이드, 항균제, 불활성 가스 또는 다른 안정화제 또는 부형제가 포함된다. 발현 벡터는 추가로 펩타이드, 폴리펩타이드 및 탄수화물과 같은 다른 성분과 복합체를 형성할 수 있다. 또한, 발현 벡터는 예를 들면 백신 총을 사용하여 개체에게 투여될 수 있는 입자 또는 비드와 복합체를 형성할 수 있다. 당업자는 생리학적으로 허용되는 화합물을 포함한 약제학적으로 허용되는 담체의 선택이 예를 들면 발현 벡터의 투여 경로에 따라 좌우된다는 것을 알고 있다.

<282> 또한, 본 발명은 면역 반응을 자극하는 본 발명의 발현 벡터를 포함한 약제학적 조성물을 투여하는 방법에 관한 것이다. 발현 벡터는 문헌[Donnelly et al., Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)]; 1996년 12월 3일 허여된 펠그너(Felgner) 등의 미국특허 제5,580,859호; 1997년 12월 30일 허여된 펠그너의 미국특허 제5,703,055호; 및 1997년 10월 21일 허여된 카슨(Carson) 등의 미국특허 제5,679,647호]에 기술된 바와 같이 본 분야에 잘

알려진 방법에 의해 투여된다. 각 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 한 가지 양태로서, 미니유전자는 나출형 핵산으로서 투여된다.

<283> 본 발명의 발현 벡터를 포함한 약제학적 조성물은 피험자에게 예를 들면 경구, 질내, 직장 또는 비경구, 예로서, 정맥내, 근육내, 피하, 안와내, 피막내, 복강내, 수조내(intracisternal), 또는 예를 들면 피부 패치 또는 경피 이온도입법을 각각 이용한 피부에의 수동 흡수 또는 촉진 흡수를 포함한 여러 경로로 투여되어 면역 반응을 자극할 수 있다. 게다가, 조성물은 주사, 삽관 또는 국소에 의해 투여될 수 있다. 국소는 예를 들면 연고 또는 산제의 직접적인 적용에 의한 수동적이거나, 예를 들면 비내 스프레이 또는 흡입을 이용한 능동적일 수 있다. 또한, 발현 벡터는 국소 스프레이로 투여될 수 있으며, 이 경우에 조성물의 한가지 성분은 적절한 분사제이다. 약제학적 조성물은 또한 필요한 경우 리포좀, 미세구체 또는 다른 중합체 매트릭스내로 도입될 수 있다(펠그너 등의 미국특허 제5,703,055호; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III (2nd ed. 1993)). 각 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다. 리포좀은 예를 들면 인지질 또는 다른 지질로 구성되고 비교적 제조 및 투여에 간단한 무독성, 생리학적으로 허용되는 대사가능한 담체이다.

<284> 본 발명의 발현 벡터는 동물 신체 조직의 간질 공간에 전달될 수 있다(펠그너 등의 미국특허 제5,580,859호 및 제5,703,055호). 근육에 본 발명의 발현 벡터를 투여하는 것은 피내 및 피하 주사 및 경피 투여를 포함한 특히 효과적인 투여 방법이다. 이온도입법에 의한 것과 같은 경피 투여가 또한 근육에 본 발명의 발현 벡터를 전달하는 효과적인 방법이다. 본 발명의 발현 벡터의 상피 투여가 또한 사용될 수 있다. 상피 투여는 상피의 최외 층을 기계적으로 또는 화학적으로 자극하여 자극제에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함한다(카슨 등의 미국 특허 제5,679,647호).

<285> 면역 반응을 자극하기 위해 본 발명의 발현 벡터를 투여하는 다른 효과적인 방법은 점막 투여이다(카슨 등의 미국특허 제5,679,647호). 점막 투여의 경우, 가장 효과적인 투여 방법은 발현 벡터 및 약제학적 조성물을 함유한 적절한 에어로졸의 비내 투여를 포함한다. 좌제 및 국소 제제가 또한 발현 벡터를 생식기, 질 및 안구 부위의 점막 조직에 전달하는데 효과적이다. 추가로, 발현 벡터는 입자와 복합체를 형성하고 백신 총으로 투여할 수 있다.

<286> 투여 용량은 투여 방법에 의해 좌우되며 일반적으로 약 0.1 μg 내지 약 200 μg 이다. 예를 들면, 투여량은 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 50 mg/kg , 특히 약 0.005 내지 5 mg/kg 이다. 유효량은 예를 들면 발현 벡터의 투여 후 면역 반응을 측정함으로써 결정할 수 있다. 예를 들면 발현 벡터에 의해 암호화된 MHC II형 에피토프 또는 MHC I형 에피토프에 대해 특이적인 항체의 생성은 ELISA 또는 다른 면역학적 검정을 포함하여 본 분야에 잘 알려진 방법에 의해 측정할 수 있다. 또한, T 헬퍼 세포의 활성화 또는 CTL 반응은 예를 들면 T 세포 활성화를 측정하는 ^3H -티미딘의 흡수 및 CTL 활성을 측정하는 ^{51}Cr 의 방출을 포함한 본 분야에 잘 알려진 방법에 의해 측정할 수 있다(참조: 하기 실시예 II 및 III).

<287> 본 발명의 약제학적 조성물을 포함한 약제학적 조성물은 예방 또는 치료 목적으로 포유동물, 특히 인간에 투여 할 수 있다. 본 발명의 발현 벡터를 이용하여 치료 또는 예방할 수 있는 질환의 예로는 HBV, HCV, HIV 및 CMV의 감염증, 전립선암, 신장암종, 자궁경부암, 림프종, 첨형 콘딜로마 및 후천성 면역 결핍증(AIDS)가 포함된다.

<288> 치료의 경우, 본 발명의 발현 벡터는 암, 자가면역 질환을 앓고 있거나 바이러스에 감염된 개체에게 투여된다. 질병의 잠복 단계 또는 급성 단계 환자는, 모든 보편적 MHC II형 에피토프를 발현하는 벡터를 포함한 본 발명의 발현 벡터를 경우에 따라 단독으로 사용하거나 다른 치료법과 병용하여 치료할 수 있다.

<289> 치료 및 예방 적용시, 본 발명의 발현 벡터를 포함한 약제학적 조성물은 환자에게 항원에 대한 유효한 면역 반응을 유도하고 질병의 징후 또는 증세를 호전시키기에 충분한 양으로 투여한다. 질병의 징후 또는 증세를 호전 시키기에 충분한 발현 벡터의 투여량을 치료학적 유효량이라고 한다. 치료학적 유효량에 이르기에 충분한 발현 벡터의 양은 본 발명의 발현 벡터를 포함한 약제학적 조성물, 투여 방식, 치료 대상 질환의 상태 및 중증도, 환자의 체중 및 일반적인 건강 상태 및 처방 의사의 판단에 따라 좌우된다.

실시예

<290> 하기 실시예는 청구된 발명을 예시하는 것이지, 한정하는 것이 아니다. 본원에 기술된 실시예 및 양태는 단지 예시하는 목적으로 제시된 것이며 여러 변형 또는 변화가 당업자에게 제시되고 본원의 정신 및 취지내에 포함되고 첨부된 청구범위의 범위내에 포함되는 것으로 이해될 것이다.

<291> 실시예 1-9는 폴리에피토프 작제물의 면역원성 및 항원성을 평가하는 검정 실시예를 제공한다.

<292> 실시예 1

<293> 항원성 검정

<294> 고-친화성 웨타이드-특이적 CTL 세포주는 DNA, 웨타이드/IFA 또는 리포웨타이드로 초회자극된 유전자전이된 마우스의 비장세포로부터 생성할 수 있다. 간단히 설명하면, 유전자전이된 마우스로부터의 비장세포를 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 웨타이드 및 LPS 아세포로 자극한다. 초기 자극 후 10일이 경과하고 그 후 수주 지나서 세포를 1시간동안 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 웨타이드로 펠스처리된 LPS 아세포로 재자극한다. CTL 세포주를 재자극 후 5일 경과하여 상기된 바와 같이 원 위치(in sity) IFN- γ ELISA로 검정한다. 다른 방도로서, 예를 들면 표적된 병원체로 감염된 환자 또는 표적된 질환(예, 암)을 지닌 환자로부터 유래된 CTL 세포주를 사용할 수 있다. 유전자전이된 마우스 또는 환자로부터 얻을 수 있는 특정 CTL 세포주는 정상 공여자의 PBMC로부터 얻을 수 있으며 본 분야의 전문 지식에 의존한다.

<295> 이들 검정에 사용될 표적 세포는 유전자전이된 마우스로부터 유래된 CTL 세포주의 경우 A2.1/ K^b , A11/ K^b , A1/ K^b 또는 B7/ K^b 로 형질감염된 주르카트 또는 .221 세포이다. 이들 모든 세포주는 현재 입수가능하다(Epimmune Inc., San Diego, CA). 인간 CTL 세포주의 경우, 적절한 인간 HLA 대립형질로 형질감염된 .221 세포가 사용되고 있다. 본 발명자들은 현재 A2 및 A1로 형질감염된 .221 세포를 갖고 있으며 A11, A24 및 B7 형질감염체를 생성하고 있다. 다른 양태로서, 예측하지 않은 문제가 표적 세포에서 발생하는 경우, LPS 아세포 및 EBV-형질감염된 세포주를 쥐 및 인간 CTL 세포주를 위해 사용한다.

<296> 항원성을 검정하기 위해, 연속적으로 희석된 CTL을 10^5 개 표적 세포 및 1 내지 $10^{-6} \mu\text{g}/\text{ml}$ 범위의 다수 웨타이드 농도와 배양한다. 또한, CTL은 해당 미니유전자를 함유한 에피좀 백터로 형질감염된 표적 세포와 배양한다. 에피좀 백터는 본 분야에 알려져 있다.

<297> 미니유전자-형질감염된 APC내에서 자연 프로세싱에 의해 생성된 웨타이드의 상대적 양은 다음과 같이 정량한다. 형질감염된 표적 세포의 인식때 CTL 세포주에 의해 생성된 IFN- γ 의 양을 기록한다. IFN- γ 의 동일한 양을 얻는데 필요한 합성 웨타이드의 양은 동일한 CTL 세포주가 알려진 농도의 웨타이드와 병행하여 배양할 때 생성되는 표준 곡선으로부터 외삽된다.

<298> 실시예 2

<299> 마우스, 면역화 및 세포 배양물

<300> 본 연구에서 사용된 HLA-A2.1/ K^b [Vitiello et al., J Exp Med, Vol. 173(4):1007-15 (1991)] 및 A11/ K^b [Alexander et al., J Immunol, Vol. 159(10):4753-61 (1997)] 유전자전이된 마우스의 유도화는 공개되어 왔다. HLA B7/ K^b 및 A1/ K^b 유전자전이된 마우스는 캘리포니아 샌 디에고 소재의 Epimmune Inc.로부터 입수가능하다. HLA DR2, DR3 및 DR4 유전자전이된 마우스는 C. David(Mayo Clinic)로부터 얻는다. 비-유전자전이된 H-2 b 마우스는 찰스 리버 래보라토리즈 또는 다른 공급업체로부터 구입한다. 면역화는 문헌[Ishioka et al., J Immunol, Vol. 162(7):3915-25 (1999)]에 기술된 바와 같이 실시한다. 모든 세포는 10% FBS, 4 mM L-글루타민, 50 μM 2-ME, 0.5 mM 나트륨 피루베이트, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린으로 보충된 HEPES(Gibco Life Technologies)를 포함하는 RPMI 1640 배지로 구성된 배양 배지에서 성장시킨다.

<301> HLA 유전자전이된 마우스 및 항원성 검정을 CTL 반응의 시험 및 최적화 목적을 위해 사용한다. HLA-DR과 IA b 사이의 천연 교차반응성이 또한 HTL 반응을 시험하기 위해 연구될 수 있다. 이 평가는 폴리에피토프 작제물의 항원성 및 면역원성의 평가를 제공한다.

<302> 실시예 3

증식 검정

<303> 면역 반응을 유도하는 HTL 에피토프의 능력을 평가하기 위해, 증식 검정과 같은 검정을 실시한다. 예를 들면, 다이나비드(DynaBead) 마우스 CD4(L3T4)(Dyna1)을 사용하여 비장의 단일 세포 혼탁액으로부터 마우스 CD4 T 림프구를 면역자기적으로 분리한다. 간단히 설명하면, 2×10^7 비장 세포를 5.6×10^7 자성 비드와 4°C에서 40분 동안 배양한 다음 3회 세척한다. 디태치비드(DetachaBead) 마우스 CD4(Dyna1)를 사용하여 자성 비드를 분리한다. 분리된 CD4 T 림프구(2×10^5 세포/웰)를 편평한-바닥 96-웰 미세역가 평판에서 3번 중복하여 5×10^5 조사된(3500 라드) 동계 비장 세포와 배양한다. 정제된 웹타이드를 웰에 20, 1, 0.05 및 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 첨가하고 세포를 전체 4일 동안 배양한다. 수거 약 14시간 전에 각 웰에 $1 \mu\text{Ci}$ 의 ^3H -티미딘(ICN)을 첨가한다. Filtermate Harvester(Packard)를 사용하여 유니필터 GF/B 평판(Packard)상에 웰을 수확한다. TopCountTM 미세 평판 섬광 계수기(Packard)를 사용한 액체 섬광 계수에 의해 ^3H -티미딘 삽입을 결정한다.

실시예 4⁵¹크롬 방출 검정

<307> CTL 활성을 측정하는 이 검정은 본 분야에 잘 알려져 있다. 이 검정은 ^{51}Cr -표지된 표적 군집으로부터 방출된 $^{51}\text{Cr}\%$ 를 측정함으로써 T 세포 군집의 용해 활성을 정량한다[Brunner et al., Immunology, Vol. 14(2):181-96 (1968)]. 크롬 방출 검정으로부터 얻은 데이터는 통상, CTL 빈도/ 10^6 세포[제한 회석 분석, LDA; [Current Protocols in Immunology, Vol 1, John Wiley & Sons, Inc., USA 1991 Chapter 3; Manual of Clinical Laboratory Immunology, Fifth edition, ASM Press, 1997 Section R]로서 표시하거나 벌크 CTL 활성의 덜 성가신 정량 평가[용해 단위; LU 검정]로 표시한다. LU 검정에서, ^{51}Cr -방출 검정에서 생성된 표준 E:T 비율 대 세포독성을 데이터 곡선을 10^6 작용(effecter) 세포당 용해 단위(LU)로 전환하며, 1 LU는 표적 세포의 30% 용해에 도달하는데 필요한 용해 활성으로서 정의된다[Wunderlich, J., Shearer, G., and Livingston, A. In: J. Coligan, A. Kruisbeek, D. Margulies, E. Shevack, and W. Strober (Eds.), Current Protocols in Immunology, Vol 1, "Assays for T cell function: induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity." John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 3.11.18]. LU 계산은 반응의 정량을 허용하고 이에 따라 상이한 실험값의 비교를 용이하게 한다.

실시예 5:원 위치 IFN-γ ELISA

<310> 새로이 분리되고 웹타이드-재자극된 비장세포를 위해 원 위치 IFN-γ ELISA 검정이 개발 및 최적화되었다(참조 예: McKinney, D.M., Skvoretz, R., Mingsheng, Q., Ishioka, G., Sette, A. Characterization Of An In Situ IFN-γ ELISA Assay Which is Able to Detect Specific Peptide Responses From Freshly Isolated Splenocytes Induced by DNA Minigene Immunization). 이 검정은 ELISPOT 검정을 기초로 한 것이지만 가용성 크로마겐을 이용하여 이 검정을 고-처리율 분석에 용이하게 응용될 수 있도록 한다. 1차 및 재자극 검정 모두에서, 이 기술은 다른 검정에서 검출되지 않는 원 위치 ELISA에서 반응이 관찰된다는 점에서 종래의 상청액 ELISA 또는 ^{51}Cr -방출 검정보다 더욱 민감하다. 한 개 세포를 기준으로 하여, 원 위치 ELISA의 민감성은 약 한 개 IFN-γ 분비 세포/ 10^4 개의 플레이팅된 세포이다.

<311> 96-웰 ELISA 평판을 항-IFN-γ(랫트 항-마우스 IFN-α mAb, 클론 R4-6A2, Pharmingen)으로 4°C로 밤새 피복한 다음, PBS중의 10% FBS로 실온에서 2시간 동안 차단한다. 연속적으로 회석된 원발성 비장세포 또는 CTL을 웹타이드 및 10^5 주르카트 A2.1/K^b 세포/웰과 함께 5% CO₂하에 37°C에서 20시간 동안 배양한다. 다음날 세포를 세척하고 웰내로 분비된 IFN-γ의 양을 이를 검출하는 바이오티닐화 α-IFN-γ(랫트 항-마우스 IFN-γ mAb, Clone XMG1.2, Pharmingen)을 사용하여 샌드위치 ELISA로 검출한다. 발색을 위한 제조업체의 지침에 따라 HRP-결합된 스트렙타이드(Zymed) 및 TMB(ImmunoPureTM TMB Substrate Kit, Pierce)를 사용한다. 랩시스템스 멀티스캔 RC ELISA 평판 판독기에서 450 nm의 흡광을 판독한다. 원 위치 IFN-γ ELISA 데이터는 특정 웹타이드에 반응하여 100 pg의 IFN-γ를 분비하는 세포의 수를 기초로 하여 분비 단위(SU)로 평가하고 웹타이드의 부재하에 IFN의 백

그라운드 양을 교정한다.

<312> 실시예 6

<313> ELISPOT 검정

ELISPOT 검정은 개개 세포들이 특정 림포카인, 보통 IFN- γ 를 생성하고 방출하도록 유도되는 능력을 측정함으로써 주어진 웨타이드에 대해 특이적인 T 세포의 빈도를 정량한다. ELISPOT 검정의 증가된 민감도는 연구자들이 감염된 인간 또는 실험 동물로부터 새로이 분리된 세포로부터 반응을 검출할 수 있도록 하였다[Murali-Krishna et al., Immunity, Vol. 8(2):177-87(1999); Ogg et al., Science, Vol. 279(5359):2103-6 (1998)]. ELISPOT 검정은 ExtrAvidin-AP (Sigma, 1:500 희석)이 HRP-스트렙타비딘 대신에 사용되는 최종 단계까지 상기된 바와 같이 IFN- γ ELISA에 대해 실시한다. 제조업체의 지침에 따라 기질 5-BCIP(BioRad)를 사용하여 발색시킨다. 상 대조 현미경을 사용하여 반점을 계수한다. 다른 방도로서, Zeiss KS ELISPOT 판독기를 사용하여 반점을 계수한다. 이 경우에 BCIP/NBT 기질이 사용된다.

<315> ELISPOT 검정을 통상적으로 사용하여 면역 반응을 정량한다. 반점은 수작업으로 계수한다. 그러나, 바람직한 방식으로는, 반점을 인식하고 계수하도록 특정적으로 설계된 소프트웨어를 갖춘 현미경-기본 시스템인 Zeiss의 KS ELISPOT 판독기를 사용한다.

<316> 실시예 7

<317> 테트라머 염색

테트라머 염색은 웨타이드 에피토프, I형 항원 및 에피토프에 대해 특이적인 T-세포 수용체사이의 상호작용을 기초로 하여 에피토프-특이적인 인간 CD8 $^+$ T-림프구를 검출하는 유세포측정 기술이다. 이 검정은 새로이 분리된 혈액 시료에서 에피토프 특이적 인간 CD8 $^+$ T-림프구의 신속한 정량을 허용한다. 여러 HIV 웨타이드/HLA 혼합물에 대한 MHC 테트라머는 예를 들면 NIH 보관기관으로부터 입수한다(Tetramer Core Facility: <http://www.miaid.nih.gov/reposit/tetrimer/index.html>). 에피토프-특정 세포를 표지하기 위해, 100 μ l 용량 중의 1×10^6 PBMC를 인간 CD3 및 CD8을 인식하는 모노클로날 항체(캘리포니아 샌 디에고 소재 PharMingen 및 캘리포니아 카마릴로 소재 BioSource을 포함한 제조 회사로부터 상이한 플루오로크롬-결합된 형태로 입수가능함) + 적절한 테트라머 5 μ g/ml와 40분 동안 어두운 곳에서 항온배양한다. 세포를 세척하고 파라포름알데하이드로 고정한 후 FACSsan 및 FACSCalibur 유세포측정기(캘리포니아 산 조세 소재 Becton Dickinson Immunocytometry Systems)를 사용하여 분석한다. 시료 데이터는 CellQuest 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

<319> 실시예 8

<320> 임상 시료로부터 검정

<321> 환자 또는 지원자로부터의 동결된 PBMC 시료에서 특정 CD8 $^+$ CTL 활성을 평가하기 위한 여러 검정이 사용될 수 있다. ELISPOT, 크롬 방출, 원 위치 IFN- γ 방출, 증식 및 테트라머 검정은 여러 실험 모델, 예를 들면 쥐 및/또는 영장류의 모델로부터 반응을 평가하는데 유용하다.

<322> 이를 검정의 쥐에 대한 실험 방법은 상기되어 있으며 문헌[Livingston et al., J Immunol, Vol. 159(3):1383-92 (1997); Heathcote et al., Hepatology, Vol. 30(2):531-6 (1999); Livingston et al., J. Immunol, Vol. 162(5):3088-95 (1999)]에 기술된 바와 같이 인간 시스템으로 응용되고 또한 당업자가 알고 있는 바대로 응용할 수 있다. 검정을 완성하는데 필요한 동결된 PBMC 시료의 양에 대한 계산이 또한 실시예 14에 상세히 기술되어 있다.

<323> 실시예 9

<324> 유전자전이된 동물

<325> 유전자전이된 마우스(HLA-A2.1/K^b H2^b; HLA-A11/K^b; HLA-A1/K^b, HLA-B7/K^b)를 10-100 μ l 용량중의 DNA 또는 웨

타이드 100 μg 이하의 용량으로 앞정강근에 근육내 면역화하거나 꼬리 기저부에 피하 면역화한다. DNA는 염수 중에서 제형화하고 웨타이드는 불완전 프로인트 애주번트에서 제형화한다. 11 내지 21일 후, CO₂ 질식을 이용하여 동물을 치사시키고 비장을 제거하여 CTL 기능의 시험관내 결정을 위한 세포 공급원으로서 사용한다. 전형적으로, 실험 군당 3 내지 6 마리의 마우스를 사용한다. 또한, 비-면역화된 마우스로부터의 비장을 CTL 배양물의 재평가를 위해 APC 공급원으로서 사용한다. 생후 8 내지 12주된 숫컷 및 암컷을 사용한다.

<326> 실시예 10<327> 다수 CTL 및 HTL 에피토프에 대한 반응의 동시 유도의 증명<328> 일련의 CTL 에피토프의 작제 및 시험

이 실시예는 다수 CTL 및 HTL 에피토프의 시험 예를 제공한다. 예를 들면, 단일 프로모터의 조절 하에 상이한 10-12개의 CTL 에피토프를 포함한 일련의 에피토프를 합성하고 표준 플라스미드 pcDNA 3.1(샌 디에고 소재 Invitrogen) 또는 NGVL (미시간 대학의 National Gene Vector Laboratory)로부터의 플라스미드내에 삽입시킨다. 이들 작제물은 표준 시그널 서열 및 보편적 HTL 에피토프 PADRE™을 포함한다. 균형을 이룬 군집을 허용하는 각 세트의 에피토프를 선택한다. 시험 및 죄적화를 용이하게 하기 위해, 유전자전이된 마우스에서 면역원성이고/거나 인간에서 항원성인 것으로 나타나는 균형된 대표적인 에피토프가 포함된다.

<330> 본원에 기술된 컴퓨터 프로그램 EPISORT™을 사용하여 이들 CTL 에피토프의 특정 순서를 선택하여 I형 접합 모티프를 최소화한다. 순서의 죄적화에 관한 최상의 노력에도 불구하고, 만일 잠재적인 접합 에피토프가 본 발명에 따른 작제물에 존재하는 경우, 상응하는 웨타이드를 합성하여 HLA 유전자전이된 마우스에서 그러한 에피토프에 대한 CTL 반응을 모니터링한다. 일반적으로, 접합 모티프의 최소화는 성공적이고 적절하다. 그러나, 만일 어떠한 접합 에피토프에 대한 반응도 검출된다면, 이들 접합 에피토프는 앞서 논의된 예상된 단백질분해 절단의 선호와 양립하는 K, AK, KA, KK 또는 A와 같은 짧은 1개 또는 2개 잔기의 스페이서의 사용으로 분열시킨다.

<331> 죄적화된 작제물의 궁극적인 사용이 인간 백신이기 때문에, 죄적화된 인간 코돈이 사용된다. 그러나, HLA 유전자전이된 마우스에서의 죄적화 프로세싱을 용이하게 하기 위해 가능하다면 마우스에서도 죄적인 인간 코돈을 선택하는데 주의를 기울인다. 인간 및 쥐 코돈 사용은 아주 유사하다 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>에서의 코돈 사용 데이터베이스).

<332> 여러 미니유전자 백신 작제물로 형질감염된 인간 세포를 항원성 검정에 사용하고 HLA 유전자전이된 마우스에서 생체내 시험과 병용하여 실시할 수 있다. 차별적인 코돈 용법으로 인해 미니유전자 백신 효능사이의 잠재적인 불일치가 이들 두 상이한 검정 시스템의 이용성에 의해 설명된다.

<333> 전형적으로, 플라스미드 작제물의 항원성 및 면역원성 시험이 병행하여 실시된다. 유전자전이된 마우스에서의 생체내 시험은 A2, A11, B7 및 A1 HLA 유전자전이된 마우스에 대해 실시한다. 본 발명자들에 의해 실험실에서 잘 설정된 프로토콜 후 카르디오톡신 예비처리된 마우스에 100 μg 의 각 플라스미드를 근육내 주사하고 반응을 11일 후 평가한다[Ishioka et al., J Immunol, Vol. 162(7):3915-25 (1999)]. 검정은 새로이 분리된 세포로부터의 ELISPOT 뿐만 아니라 재차극된 세포 배양로부터의 인터페론 감마 방출 및 세포독성 크롬 방출 검정을 포함한다. 상기 언급된 모든 기술은 본 분야에 잘 설정되어 있다. 초기 시험은 HLA 유전자전이된 동물에서의 면역원성이 이미 잘 입증된 8 HLA A2, 9 HLA A11 및 6 HLA B7 제한된 에피토프에 대해 집중되어 있다. 이들 에피토프에 대한 반응의 동시 측정은 유전자전이된 마우스의 큰 군체가 이미 이들 HLA 유형에 대해 자체적으로 설정되어 있기 때문에 문제가 되지 않는다. 다수의 판독 검정에서 6 내지 10개의 상이한 에피토프에 대한 반응을 측정하는데 4 내지 6 마리 마우스의 군이 적절하다. HLA A1 유전자전이된 마우스에서 HLA A1-제한된 HIV-유래된 에피토프의 시험이 전형적으로 사용된다. 그러나, 문제가 발생하면, 대안으로서 인간 APC를 사용한 항원성 시험을 사용하거나 이를 사용하여 유전자전이된 마우스 연구를 보완할 수 있다.

<334> 본원에 보고된 연구에서 주지된 바와 같이, 유전자전이된 동물에서의 면역원성과 항원성사이의 상호관계를 넓히고자 하는 목적으로, 항원성 시험을 사용하여 고 친화성 CTL 세포주가 이미 자체적으로 이용되고 있는 Pol 498, Env 134, Nef 221, Gag 271과 같은 에피토프에 대한 반응을 평가한다. 추가의 적합한 CTL 세포주를 생성하는 목적으로, 애주번트에 유화된 웨타이드 또는 리포웨타이드로 HLA 유전자전이된 마우스의 직접적인 면역화를 본원에 기술된 바와 같이 사용하고 본 발명자들의 연구소에서 통상 적용하여 항원성 검정에 사용하는 세포주를 생

성한다.

<335> 또한, 항원성 검정은 생체내 최적화 실험이 가능하지 않는 에피토프에 대한 1차 판독으로서 사용한다. 이들 에피토프로는 A24 및 가능한 A1 제한된 에피토프 뿐만 아니라 HLA 유전자전이된 마우스에서 비면역원성인 어떠한 에피토프도 포함된다. 이러한 어떠한 경우에서도, 본 발명자는 HIV 노출된 개체로부터 발생된 인간 CTL 세포주를 사용한다. 다른 방도로서, 본 발명자는 GMCSF/IL4-유도된 수지상 세포 및 말초 혈액 림프구를 사용하여 시험관내 CTL 유도를 위한 CTL 세포주를 생성한다[Celis et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 91(6):2105-9 (1994)].

<336> 미니유전자를 암호화하는 에피좀 벡터를 생성하고 적절한 인간 세포주내로 형질감염시켜 표적 세포를 발생한다. 예를 들면, 인간 T 세포주 주르카트를 사용할 수 있으나, 림프아세포주가 또한 성공적으로 사용되어 왔다. 인간 기원의 CTL 세포주를 이용한 실험의 경우, 잘-특성화된 HLA-정합된 동종접합 EBC 세포주가 정제된-MHC 및 표적 세포의 공급원으로서 통상 사용되며, 미니유전자 형질감염의 수용체로서 사용한다. HLA 유전자전이된 마우스로부터 유래된 CTL 세포주를 이용한 실험의 경우, 정합성 HLA/K^b 키메라 작제물로 형질감염된 I형 음성, EBV-형질감염된 돌연변이 세포주 .221[Shimizu Y, Demars R., J Immunol, Vol. 142(9):3320-8 (1989)를 미니유전자 형질감염의 수용체로서 사용한다. 이러한 세포는 효과적으로 CTL 세포주에 웨타이드 항원을 제시한다 [Celis et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 91(6):2105-9 (1994)].

일련의 HTL 에피토프의 작제 및 시험

<338> 단일 프로모터의 조절하에 3-5개 상이한 에피토프를 포함한 일련의 에피토프를 합성하고 표준 플라스미드 pcDNA 3.1 (센 디에고 소재 Invitrogen)내로 삽입시킨다. 모든 작제물은 Ig-α 표적화 서열을 포함한다. 시험 및 최적화를 용이하게 하기 위해, 주어진 미니유전자에 대한 각 세트의 에피토프를 선택하여 IA^b 마우스에서 면역원성으로 이미 알려진 균형을 이룬 대표적인 에피토프를 제공한다. EPISORT 프로그램을 사용하여 에피토프 순서를 선택하여 접합 에피토프의 존재를 최소화한다. 또한, 접합부에 상응하는 모든 웨타이드를 합성하고 IA^b에 결합하는 것에 대해, 가장 중요하게는 가장 공통적인 DR 대립형질을 대표하는 14개의 상이한 DR 문자 패널에 결합하는 것에 대해 시험한다[Southwood et al., J Immunol, Vol. 160(7):3363-73 (1998)]. 따라서, 해당 항원에 대한 것이 아닌 HTL 에피토프는 이를 플라스미드내에서 발생되지 않는다. 그러나, 양호한 DR 결합 능력 (및 따라서, 잠재적인 DR 제한된 생체내 면역원성)을 갖는 접합 영역이 검출된다면, 이들을 제거하기 위해 GPGPG와 같은 스페이서를 도입한다. 모든 작제물에서, I형 접합 모티프의 수는 본원에 기술된 바와 같이 최소화한다.

<339> HLA DR 유전자전이된 마우스 및/또는 H2b 일배체형의 마우스를 사용하여 실험 백신 플라스미드를 면역원성에 대해 시험한다. 증식 및/또는 사이토kin 생성을 측정한다(IL5, IFN-γ). 전형적인 프로토콜에서, 카르디오톡신 처리된 마우스에 100 마이크로그램의 각 플라스미드를 근육내 주사하고 11일 후에 반응을 평가한다 [Ishioka et al., J Immunol, Vol. 162(7):3915-25 (1999)].

CTL 및 HTL 에피토프사이의 상호작용에 대한 시험

<341> 상기된 활성은 분석가능한 모든 에피토프에 대한 동시적인 반응/항원성을 입증하기 위해 사용되는 에피토프의 작고 기능적인 차단을 제공한다. 이들 차단은 다음 실시예에 기술된 바와 같은 추가적인 최적화에 대한 대상이다. 동일한 미니유전자를 사용하여, 면역우성을 평가한다. 구체적으로, 모든 CTL 플라스미드를 혼합하거나 모든 HTL 플라스미드를 혼합한다. 그런 다음 미니유전자 푸울로 수득된 결과를 별도로 주사된 동일한 미니유전자로 수득된 결과와 비교한다.

<342> 또한, 이들 미니유전자 플라스미드는 CTL 에피토프에 대한 반응에 미치는 HTL 에피토프의 영향을 결정하는데 사용한다. 구체적으로, HTL 및 CTL 함유 플라스미드를 수집하고 마우스에 주사한 다음, 선택된 에피토프에 대한 CTL 및 HTL 반응을 본원에 기술된 바와 같이 측정한다. 흔히, 표적 항원으로부터 유래된 HTL 에피토프의 존재가 CTL 미니유전자에 범(pan) DR 결합 에피토프, 예를 들면 PADRETM 또는 PADRE 패밀리 문자를 함유한 플라스미드를 사용하여 얻은 반응의 수준을 넘어서 CTL 반응을 증가시키는지를 결정한다. 전형적으로, 또한 PADRE가 표적 항원-유래된 HTL 에피토프에 대한 반응을 억제하거나 증가시키는지를 결정하거나 반대로 해당 항원으로부터 유래된 HTL 에피토프가 PADRE에 대한 반응을 억제하거나 증가시키는지를 결정한다.

<343> 이 방법을 사용하여 다수의 에피토프에 대한 반응을 얻을 수 있다. 작제물의 수집은 보다 약한 에피토프의 일

부에 대한 반응을 억제할 수 있다. 이 경우에서, 최적화 후 수집 실험을 반복한다.

<344> 실시예 11

<345> CTL 및 HTL 미니유전자 작제물의 최적화

이 실시예는 실시예 10에 기술된 CTL 및 HTL 작제물의 최적화를 기술한 것이다. 또한 미니유전자 작제물을 최적화하는데 항원성 및 면역원성에 미치는 플랭킹 잔기의 잠재적인 영향을 평가한다. 이들 연구는 효과적인 프로세싱을 용이하게 하기 위해 설계된 플랭킹 잔기 (이의 동의어는 스페이서이다)를 함유시키는 것을 포함한다.

이러한 분석은 다음과 같이 실시할 수 있다. 일차로, 실시예 10에 기술된 CTL 멀티에피토프 작제물의 시험 결과를 에피토프의 N- 및 C-말단에 접한 특정한 3개 잔기의 존재와 활성사이의 성향 및 상호관계에 대해 분석한다. 최적이하의 CTL 초회자극이 주지되고 반응 크기 관점에서 최적이하인 에피토프는 플랭킹 영역 최적화를 위한 표적이 된다. 10-12개의 상이한 CTL 에피토프를 암호화하는 CTL 미니유전자 백신 개개의 경우, 최적화된 형태를 갖는 제2 세대 미니유전자 백신이 생성된다.

첫 번째 최적화 설계는 최적이하인 성능과 연관된 모든 에피토프에 대해 위치 C+1에 알라닌(A) 또는 라이신(K) 잔기를 도입하는 것이다. 두 번째 최적화 설계는 항원성과 연관이 있는 표적 항원, 예를 들면 HIV에 천연적으로 존재하는 잔기를 C+1 위치에 도입하는 것이다.

선택된 에피토프의 경우, 추가의 변형이 또한 도입된다. 구체적으로, 에피토프 C- 및 N-말단에 다른 잔기 스페이서를 도입하는 영향이 또한 연구된다. 실시예 10에 기술된 미니유전자 백신의 분석 결과에 따라, 연구된 잔기는 또한 예를 들면 G, Q, W, S 및 T를 포함할 수 있다. 접합 에피토프가 이들 변형에 의해 생성된다면, 접합 에피토프를 제거하는 또 다른 에피토프 순서가 본원에 기술된 바와 같이 적절하게 설계된다. 모든 제2 세대 작제물은 본원에 기술된 바와 같이 항원성 및 면역원성에 대해 시험한다.

이들 변형의 결과로서, 미니유전자의 특정 변형에 상응하는 활성의 변화가 확인된다. 일반적이고 유익한 효과를 갖는 특정 변형이 발견된다. 이것을 확인하기 위해, 모든 에피토프 (또한 허용되는 항원성 및 면역원성을 나타내는 것)가 동일한 변형에 적용되는 추가 미니유전자 백신의 발생 및 시험이 실시된다. 일부 예에서, 증가된 활성이 일부 에피토프에 대해 주지되지만 다른 에피토프에 대해서는 그렇지 않거나, 덜 바람직하게는 특정 변형이 일부의 활성을 증가시키지만 다른 에피토프의 활성을 감소시킨다. 이러한 경우에, 유해하거나 효과가 없는 것으로 증명된 변형을 제외하는 한편, 추가의 미니유전자 백신이 유익한 변형을 유지하기 위해 설계되고 시험된다.

이들 미니유전자 백신은 (a) 최소의 예상된 접합 에피토프가 존재하고 (b) 이전의 미니유전자 백신에서 작용하지 않았던 에피토프가 새롭고 더욱 효율적이 되도록 설계된다.

HTL 미니유전자 백신의 경우, 제1 세대 미니유전자 백신으로부터 얻은 데이터는 미니유전자내의 접합 에피토프 관점에서 성향 및 에피토프 위치 및 스페이서 (예, GPGPG 스페이서)에 대한 근접에 대해 조사한다. 특정 성향이 검출된다면, 제2 세대 미니유전자 백신은 이들 성향을 기초로 하여 설계한다. 다른 방도로서, 최적이하의 활성을 놓는 미니유전자의 경우에, Ii 및 LAMP를 근거로 한 것과 같은 다른 표적화 전략의 잠재적인 효과를 재평가하고 비표적화 및 단순한 리더 서열 표적화와 비교한다.

이 단락에 기술된 CTL 또는 HTL 미니유전자 백신의 활성에서 커다란 변화가 검출될 때 이 결과는 미니유전자 활성에 영향을 주는 적절하거나 넓은 범위의 효과와 같은 영향과 일치한다. 이들 변이는 현재의 문자 및 세포 생물학 기술의 방법에 의해 분석할 수 있다. 예를 들면, 여러 미니유전자로 형질감염된 세포주는 노천(Northern) 분석 또는 프라이머 연장 검정에 의해 mRNA 발현 수준 및 안정성에 대해 분석할 수 있었다[Current Protocols in Molecular Biology, Vol 3, John Wiley & Sons, Inc. USA 1999].

모든 미니유전자 백신의 경우, MYC/his와 같은 항체 태그가 포함될 수 있다. 이 태그는 단백질 발현 수준의 시험을 허용한다. MYC/his 태그의 포함[Manstein et al., Gene, Vol. 162(1):129-34 (1995)]은 또한 펄스-체이스(pulse-chase) 실험에 의해 발현된 생성물의 안정성의 결정을 허용한다. 그런 다음, 이들 검정의 결과는 항원성 및 면역원성 실험의 결과와 비교할 수 있다. 이 결과는 성향 및 일반적인 규칙의 존재 및 검사된 다른 변수 사이의 상호관계에 대해 검사한 것이다.

<355> 실시예 12

<356> 선택된 에피토프를 효과적으로 전달할 수 있는 가장 간단한 플라스미드 형태의 결정

<357> 실시예 11 및 12에 기술된 실험은 미니유전자 백신 설계에 관한 변수를 설명하기 위해 설계된 것이다. 이상적으로, 인간에서 사용할 수 있는 벡터는 전체 프로그램을 통해 사용하지만 백신 에피토프 최적화 연구를 위한 한 개의 DNA 백신 플라스미드를 사용한 다음 인간에 사용하기에 적합한 벡터로 변경시킬 수 있다. 실질적인 벡터 선택은 몇 가지 변수에 의존한다. 예를 들면, National Gene Vector Laboratory (미시간 대학)와 같이 믿을 만한 공급처를 통한 인간에 사용하기에 적합한 벡터의 입수성이 요소가 된다.

<358> 이 실시예에서, 최적화된 미니유전자가 연결되어 좀더 큰 에피토프의 블록을 형성한다. 모든 작제물은 바람직하게는 CTL 미니유전의 경우 표적화하는 PADRE 및 리더 서열 및 HTL 에피토프 미니유전자의 경우에 Ig- α 를 각각 삽입하도록 설계된다. 구체적으로, 10-12개 CTL 에피토프 미니유전자의 두 쌍을 연결하여 두 개의 20-40 CTL 에피토프 미니유전자를 발생한다. 에피토프의 연결이 보다 작은 미니유전자와 비교하여 최적이하의(감소된) 활성을 낳는 상황에서, 연결의 다른 조합 및 순서가 연구된다. 이어서, 최적의 활성을 낳는 20-24 CTL 에피토프 미니유전자의 특정 쌍을 연결하고 모든 CTL 에피토프를 포함한 미니유전자 생성물을 활성에 대해 평가한다. 한번 더 2회까지의 또 다른 배향이 연구된다. 이 작제물의 비교적 큰 크기 때문에, 표적화 서열의 특정 효과가 검증된다. 그 이유는 리더 서열 표적화가 작은 크기의 미니유전자에 보다 효과적인 한편 좀더 큰 크기의 작제물이 가장 효과적으로 유비퀴틴 시그널에 의해 표적화될 수 있기 때문이다. 구체적으로, 어떠한 특정의 표적화 서열도 없는 한 개 작제물을 생성하고 유비퀴틴 분자의 첨가에 의해 분해되도록 표적화된 작제물과 비교한다.

<359> 유사한 전략을 HTL에 대해 사용한다. 3-5 HTL 에피토프 미니유전자의 두 개 쌍을 연결하여 두 개의 7-9 HTL 에피토프 미니유전자를 생성한다. 한번 더, 이를 에피토프의 연결이 최적이하의(감소된) 활성을 낳는 상황에서, 연결의 다른 조합 및 순서가 연구된다. 최적의 활성을 낳는 7-9 CTL 에피토프 미니유전자의 특정 쌍을 연결하고 모든 HTL 에피토프를 포함한 미니유전자 생성물을 활성에 대해 평가한다. 한번 더, 2회 까지의 또 다른 배향이 연구된다.

<360> 이를 결과를 기초로 하여 HIV 에피토프의 패널을 효과적으로 전달할 수 있는 최적화된 플라스미드 형태를 임상시험 평가를 위해 선택한다. 물론, 해당 항원 어떠한 것(감염성 또는 질환-관련성)으로부터의 에피토프도 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이 형태는 한 개 이상의 HTL 에피토프 미니유전자(들) 및 한 개 이상의 CTL 에피토프 미니유전자(들)를 수반한다. 모든 에피토프를 효과적으로 전달할 수 있는 한 개의 긴 CTL과 한 개의 긴 HTL 미니유전자의 조합이 백신의 임상 개발을 단순화하기 때문에 가장 바람직하다. 두 개의 미니유전자사이의 바람직하지 않은 상호작용이 동시 주사될 때 관찰되는 경우, 동일한 동물에서 그러나 상이한 주사 부위에서 또는 다른 시점에서 상이한 플라스미드의 주사를 검사한다. 다른 방도로서, 모든 목적하는 에피토프를 암호화하는 한 개의 CTL 미니유전자 및 HTL 미니유전자가 동정되지 않을 지라도, 미니유전자의 푸울은 추가의 개발을 위해 고려된다.

<361> 실시예 13<362> 멀티에피토프 백신으로 면역화 후 유도된 CD8⁺ 림프구 반응의 평가 및 특성화

<363> ELISPOT 기술을 이용하여 CD8⁺ 림프구 반응을 측정한다. ELISPOT 검정은 본 분야에 알려져 있으며 본 발명자들의 연구소에서 정규적으로 사용한다. 또한, 자동화된 Zeiss ELISPOT 판독기를 본원에 기술된 바와 같이 사용한다. CD8⁺ 반응을 측정하기 위해 사용된 검정은 새로이 분리된 세포뿐만 아니라 웨بت아이드로 시험관내에서 재자극한 세포에 대한 주로 IFN- γ ELISPOT 검정이다. 또한, 선택된 예로서, 크롬 방출 검정을, 또한 재자극된 세포 및 ELISPOT 검정의 경우에 관찰된 결과와 함께 사용한다. 선택된 웨بت아이드/MHC 조합물에 대한 테트라머 염색이 또한 실시된다. 백신에 의해 표적화된 다수의 잠재적인 HLA/웨بت아이드 조합물은 배경기술 단락 중, 소단락 "임상 시료로부터의 면역 반응의 측정 및 정량화"에서 보다 상세히 논의된 바와 같이 비실용적인 주요 임상 검정으로서 테트라머 염색 시약을 이용할 수 있다.

<364> 임상 검정은 개발되어 있고 유효하다. 이 활성의 시점은 임상 백신 미니유전자의 선택 후 및 임상 시험에 등록된 개체로부터의 실질적인 시료의 이용성 이전의 시점과 일치한다. CTL 평가에 대한 검정은 본 분야의 경험, 예를 들면 실험 HBV 백신의 임상 I 및 II 단계에서 CTL 평가를 위한 검정을 설정하는데 있어서의 경험을 기초로

하여 설정할 수 있다[Livingston et al., J Immunol, Vol. 159(3):1383-92 (1997); Heathcote et al., Hepatology, Vol. 30(2):531-6 (1999); Livingston et al., J Immunol, Vol. 162(5):3088-95 (1999)]. 구체적으로, 정상 피험자 뿐만 아니라 HIV-감염되고 비-예방접종된 지원자로부터 유래된 퍼콜(Ficoll)-정제된 PBMC를 사용할 수 있다. 앞서 주지한 바와 같이, 다른 항원성 표적을 본 발명에 따라 사용할 수 있다.

<365> 사용된 에피토프는 한 세트의 A2, A3 및 B7 인플루엔자-유래된 슈퍼타입 에피토프[Gianfrani et al., Eur. J. of Immunol., (1999)]뿐만 아니라 에니스(Ennis) 등에 의해 기술된 에피토프[Tamura et al., J Virol, Vol. 72(11):9404-6 (1998)]이다. 이것은 검정을 유효화시킬 뿐만 아니라 치료받는 환자 군에서의 기저 반응 수준을 규정한다.

<366> 검정을 설정한 후 임상 시료를 평가한다. 일반적인 검정 전략은 다음과 같다. 동결물로써 이송된 PBMC 분획이 사용된다. APC의 경우 웨타이드로 펠스처리된 자기 조직 PBMC가 전형적으로 사용된다. 그 이유는 폴리에피토프 작제물에 사용된 에피토프가 많은 여러 MHC I형 대립형질체에 의해 제한되고 비실용적인 APC 및 표적으로서 전형된 EBC 세포주를 이용하기 때문이다.

<367> 비자극된 배양물과 웨타이드 자극된 배양물 모두가 평가된다. 일부 반응은 비자극된 배양물에서 검출될 수 있으나 보다 약한 반응/에피토프는 1회 또는 2회의 시험관내 재자극을 필요로 할 수 있다. 검정 절차는 다음과 같이 수행할 수 있다. 예를 들면, 약 50개의 I형 제한된 에피토프에 대한 반응이 검정되는 경우, 약 7개 웨타이드의 푸울이 사용될 수 있다. 웨타이드의 푸울은 또한 재자극을 위해 사용된다. PADRE 에피토프에 대한 반응이 또한 측정된다. 양성 결과를 제공하는 웨타이드 푸울의 경우에, 개개 웨타이드를 검정하여 관찰된 반응(들)을 제공하는 에피토프를 동정한다. 양성 대조군으로는 완전한 파상풍 톡소이드 및/또는 미토겐 PHA 뿐만 아니라 인플루엔자 바이러스-유래된 에피토프의 푸울이 포함된다. 또한 잠재적인 접합 에피토프를 합성하고 단일 푸울로서 시험한다.

<368> 이어서, 소수의 선택된 반응자 웨타이드 및 개인의 경우에 테트라머 염색을 새로운 시료 또는 재자극된 시료에 대해 실시하고 ELISPOT 데이터와 상관관계를 설정한다. A*0201, A*0301, A*1101 및 B*0702와 같은 흔한 대립형질체에 결합된 특정 웨타이드에 대한 테트라머만이 생성되는 것이 주지되어야 한다. 이를 테트라머가 동일한 웨타이드에 대한 반응에 대해 양성적이지만 주어진 슈퍼타입의 다른 일원에 의해 제한되지 않는 세포를 염색하는 능력을 시험한다. 이를 결과는 치료의 진단/대용 마커로서 상기 시약의 다양한 응용성을 결정하는데 유익하다.

<369> 이를 분석에 필요한 세포의 양적인 관점에서, 표준 검정은 예를 들면 7개의 웨타이드 군, 한 개의 음성 및 두 개의 양성 대조군(전체 10개 군)을 포함할 수 있다. 이중으로 시험하는 경우, 2×10^5 세포/웰은 $10 \times 2 \times 2 \times 10^5 = 4 \times 10^6$ 세포에 상응한다. 해동 후 50% 회복의 보존적 가정은 약 10^6 PBMC/혈액 ml를 제공한다. 임상 피험자들에서 PBMC 계수의 커다란 변화는 예상되지 않는다. 왜냐하면 모든 개개인은 건강한 지원자이거나 HIV-감염 환자의 예시에서 HAART 요법 수혜자이기 때문이다. 결론적으로, 4-8 ml의 혈액으로부터 유래된 한 분취량의 PBMC는 보통 1회의 검정을 위해 충분한 것이다. 검정은 어느 웨타이드가 양성인지를 허용하고/하거나 최대 민감성을 위해 시험관내 재자극을 허용하거나, 이를 모두를 허용하기 위해 보통 반복할 필요가 있다. 따라서, 전체 약 20 ml의 혈액에 상응하는 전체 3-4 분취량이 요구될 수 있다.

<370> 본원에 인용된 모든 공보, 특히 및 특허원은 전체 내용이 모든 목적을 위해 참고로 원용된다.

도면의 간단한 설명

<115> 도 1은 20 내지 25개의 상이한 CTL 에피토프를 각각 포함하는 3가지 다른 멀티에피토프 작제물에 대한 데이터를 예시한 것이다.

<116> 도 2는 2가지 다른 합성 폴리웨타이드(도 2a)를 예시한 것으로서, 제1 작제물은 선상으로 공동합성된 4개의 다른 에피토프를 포함하고, 제2 작제물은 GPGPG 스페이서를 포함하고 있다. 도 2b는 IA^b 양성 마우스에서 다양한 에피토프에 대한 증식 반응을 초회자극하는 상기 여러 작제물의 2nM의 효능을, 등물량의 동일한 웨타이드 푸울(웨타이드 각각 3 μ g)에 의해 유도되는 반응과 비교하여 예시한 것이다.

<117> 도 3은 멀티에피토프 DNA 작제물의 구조를 예시한 것이다. HLA 제한부위는 각 에피토프 위에 표시하였고, A^{*}0201 에피토프는 진한글씨로 나타낸 것이다. HLA 결합 친화성(IC_{50} nM)은 각 에피토프 밑에 제시하였다. (a) 암호화된 에피토프의 순서를 예시하는 HIV-FT의 모식도. (b) HBV 특이적 작제물의 모식도. 코어 18에 대한

C+1 아미노산은 화살표로 표시하였다. 코어 18의 C₁ 위치에 하나의 아미노산이 삽입된 HBV 특이적 작제물은 HBV.1X라 표시하였다.

<118> 도 4는 HLA-A^{*}0201/K^b 유전자전이된 마우스에 존재하는 HIV-FT 중의 HLA-A^{*}0201 에피토프의 면역원성을 예시한 것이다. (a) 에피토프 Po1498(원형), Vpr62(삼각형), Gag386(사각형)에 대한 대표적인 CTL 반응. 세포독성은 각 웨타이드의 존재(막힌 기호) 또는 부재(열린 기호)하에 Jurkat-HLA-A^{*}0201/K^b 표적 세포에 대한 ⁵¹Cr 방출 분석으로 분석하였다. (b) HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자전이된 마우스에서 HIV-FT 면역원성의 CTL 반응의 개요도. 막대는 양성 배양물의 기하 평균 CTL 반응을 나타낸다. 양성 CTL 배양물의 빈도수도 나타내었다.

<119> 도 5는 C+1 아미노산이 에피토프 면역원성에 미치는 영향을 도시한 것이다. 94개 에피토프/C+1 아미노산 조합을 나타내는 다양한 미니유전자의 CTL 반응을 포함하는 데이터베이스를 분석하여 최적의 CTL 반응에 관계하는 특정 조합의 빈도수(%)를 측정하였다. CTL 반응은 측정된 배양물의 30% 이상에서 100SU 또는 20LU 보다 큰 값이면 최적 상태로 간주하였다. 또한, 소정의 에피토프/C+1 아미노산 조합이 관찰된 횟수도 제공하였다.

<120> 도 6은 HBV 특이적 작제물에 대한 CTL 반응을 도시한 것이다. (a) HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자전이된 마우스의 DNA 면역화후 코어 18에 대한 CTL 반응. (b) 코어 18의 C+1 위치에 단일 아미노산 삽입으로 변화하는 작제물을 이용하여 HLA-A^{*} 0201/K^b 유전자전이된 마우스를 DNA 면역화한 후 나타나는 HBV 코어 18에 대한 CTL 반응.

<121> 도 7은 HBV.1(음영을 준 막대) 및 HBV.1K(벗금친 막대)로 형질감염된 세포주에서 나타나는 HBV 코어 18의 제시 농도를 보여준다. 에피토프 제시는 웨타이드-특이적 CTL 세포주를 사용하여 정량화하였다. HBV Po1455의 제시는 비교용으로 나타내었다.

<122> 도 8은 HIV-1 미니유전자로 형질감염된 221A2K^b 표적 세포에 대한 데이터를 나타낸 것이다. 이와 같이 형질감염된 세포는 다양한 HIV 유래의 CTL 에피토프에 특이적이고 HLA 유전자전이된 마우스 유래의 CTL 세포주에 대한 에피토프를 제시하는 효능에 대하여 분석하였다. 여러 CTL 세포주의 항원 민감성의 차이를 보정하기 위하여 APC로서 형질감염되지 않은 세포를 사용하는 웨타이드 용량 적정을 나란히 실시하였다.

<123> 도 9는 본 발명의 방법을 사용하여 최적화된 HIV 폴리에피토프 작제물을 도시한 것이다.

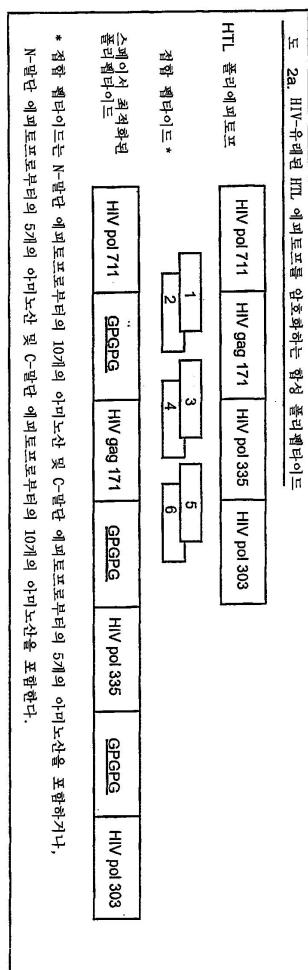
도면

도면1

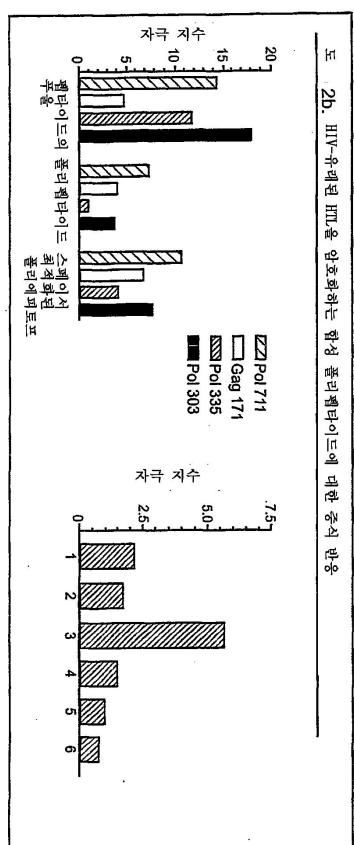
도 1 HLA 유전자-전이된 동물에서 HIV- 및 HCV-유전체 미니유전자의 면역원성

CL. 반응의 크기는 다음과 같이 계산된다: $+2UJ$ (용체 단위) 또는 $10SU$ (분비 단위)이하; $+200UJ$ 또는 $1000SU$ 이하; $+400UJ$ 또는 $1000SU$ 이상. 크기는 양성 반응을 나타내는 독립적인 베이블의 수를 나타낸다.

도면2a



도면2b



도면3

a : HIV-FT

A*0201	A*0201	A*1101	A*1101	A*0201	A*1101	B*0701	A*1101	A*0201	A*1101	
시그널	Pol 448	Pol 774	Pol 374	Pol 98	Vpr 62	Pol 930	Pol 893	Env 61	Pol 498	Pol 929
60	62	10	28	19	20	458	27	192	8	

A*1101	B*0701	A*1101	A*0201	A*1101	A*0201	A*1101	A*0201	B*0701	A*0201
Pol 931	Env 250	Pol 971	Nef 221	Nef 100	Gag 271	Env 46	Gag 386	Env 259	Env 134
3	100	28	36	9	167	3	67	423	102

b : HBV-특이적 멀티에피토프 차제물

HBV.1

A*1101	A*0201	A*0201	A*0201	A*0201	A*0201	A*1101	A*1101	A*0201		
시그널	Pol 149	PADRE	core 18	Pol 562	pol 551	pol 455	env 183	core 141	pol 665	env 335
14	2	8	5	76	10	4	11	5		

F

HBV.2

A*1101	A*0201	A*1101	A*0201	A*0201	A*0201	A*0201	A*1101	A*1101	A*0201		
시그널	Pol 149	PADRE	core 18	Pol 629	pol 562	pol 551	pol 455	env 185	core 141	pol 665	env 335
14	2	353	8	5	76	10	4	11	5		

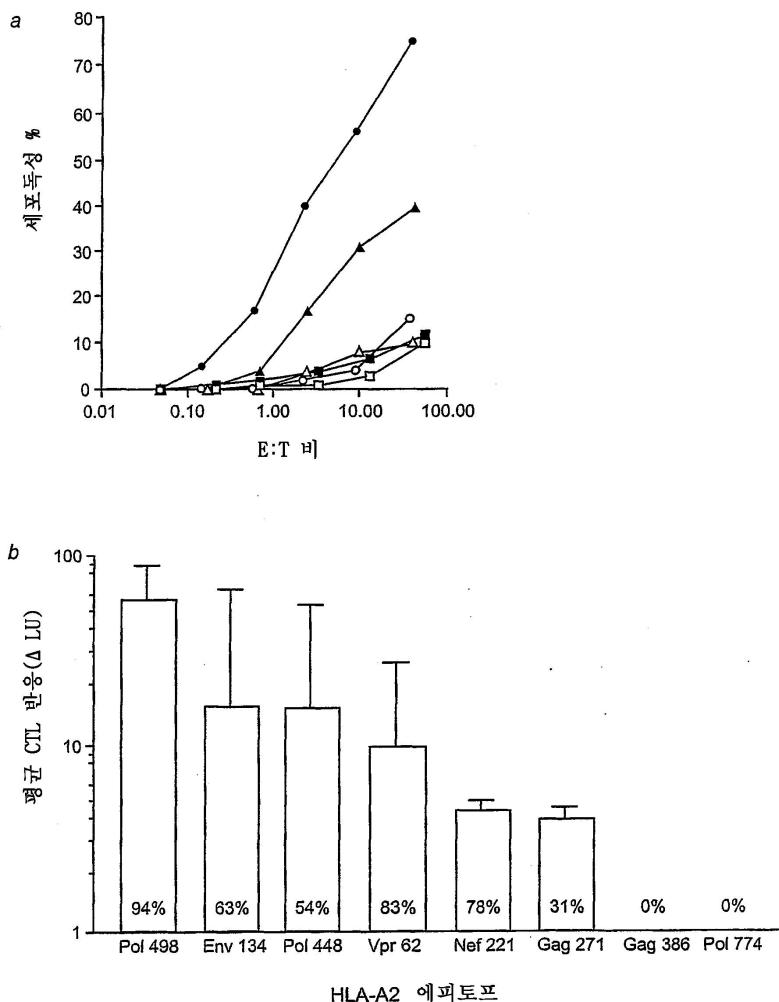
K

HBV.1X

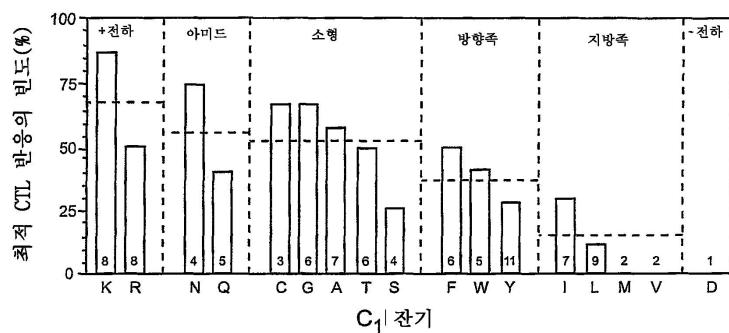
A*1101	A*0201	A*0201	A*0201	A*0201	A*0201	A*0201	A*1101	A*1101	A*0201		
시그널	Pol 149	PADRE	core 18	C ₁	pol 562	pol 551	pol 455	env 185	core 141	pol 665	env 335

C₁= W, Y, L, K, R, C, N 또는 G

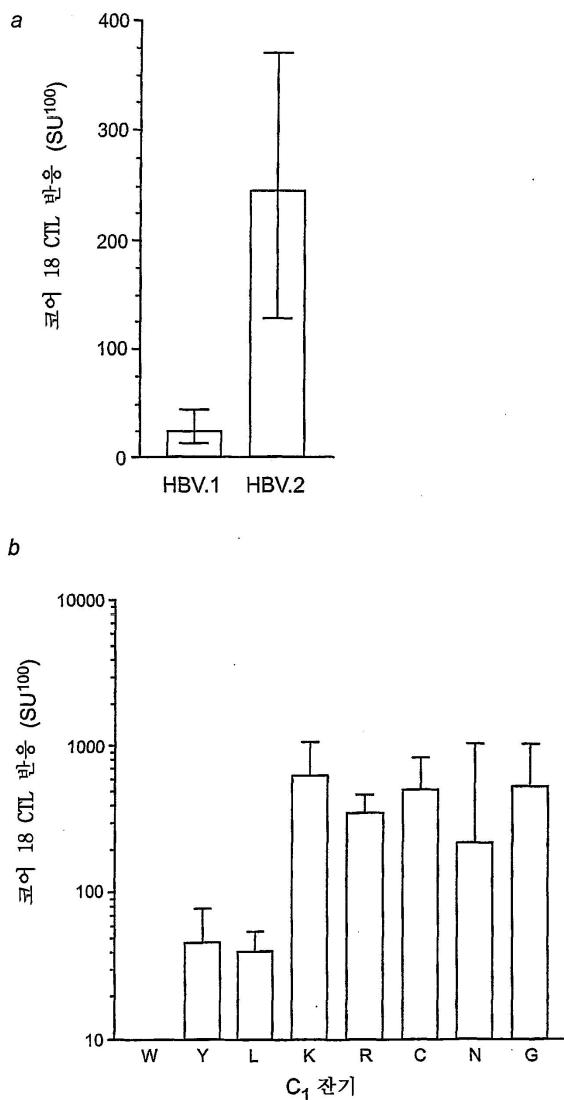
도면4



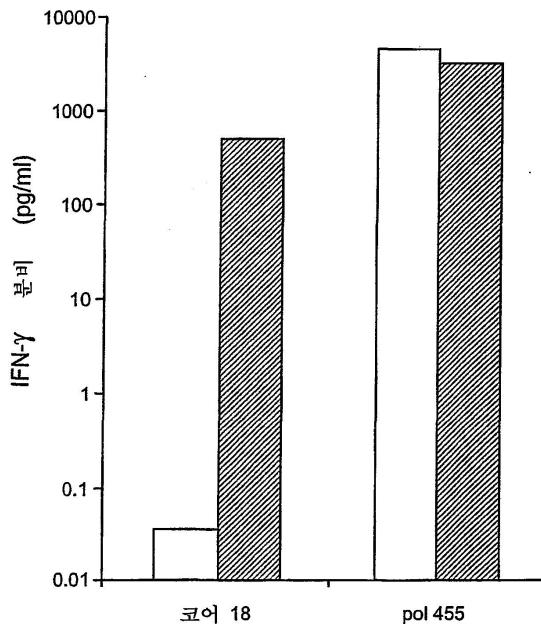
도면5



도면6

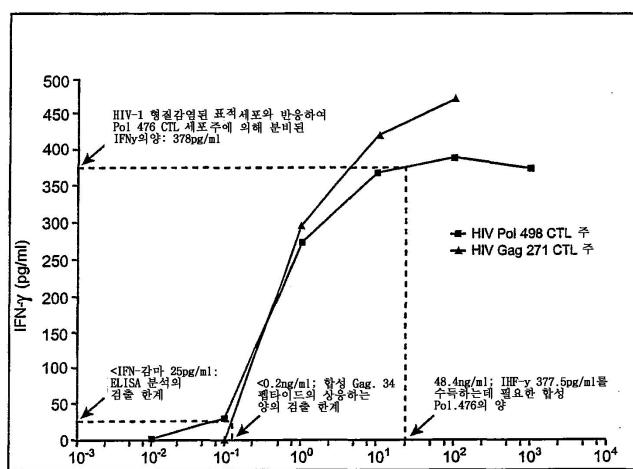


도면7



도면8

미니유전자-형질감염된 세포에서 에피토프 생성을 측정하기 위한 방법으로서 항원성 평가



도면9

HIV-TT

시그널	A*0201	A*0201	B*0701	B*0701	B*0701	B*0701	A*0201	A*0201	A*1101	A*1101	A*1101
pol 446	z	pol 498	z	env 250	x	env 259	x	PADRE	z	naf 94	y
										env 134	z

B*0701	B*0701	A*1101	A*1101	B*0701	B*0701	A*0201	A*0201	A*1101	A*1101	B*0701	A*0201
pol 893	x	gag 237	z	env 47	y	pol 929	y	gag 545	z	naf 221	z
										vpr 62	z

HIV-DG

시그널	B*0701	A*1101	A*1101	B*0701	A*1101	A*0201	A*1101	A*1101	B*0701	A*0201	
env 259	z	pol 971	z	pol 98	x	PADRE	x	rev 75	z	pol 347	y
										env 134	z

A*0201	A*0201	A*0201	B*0701	A*1101	B*0701	B*0701	B*0701	A*1101	A*0201	B*0701	A*0201
naf 221	z	gag 386	z	vpr 62	y	env 250	x	env 47	z	gag 237	y
										gag 545	z

HIV-TC

시그널	A*2402	A*1101	A*1101	B*0701	B*0701	A*0201	A*0201	A*0101	A*0201	A*1101	A*1101
pol 597	x	Pol 347	z	Pol 722	y	ENV 250	x	Gag 237	z	Nef 221	z
										Pol 132	x

A*0201	A*2402	A*1101	A*1101	A*2402	A*0201	A*0201	A*2402	B*0701	B*0701	A*0201	
Pol 448	y	Vpr 46	y	Nef 100	y	Pol 295	y	Env 671	z	Pol 183	x
										Gag 271	y

A*0201	B*0701	A*2402	A*1101	A*2402	A*0201	A*0201	A*2402	B*0701	B*0701	A*0201	
Pol 498	y	Pol 168	x	Env 55	y	Pol 98	x	Pol 533	z	Gag 386	z
										Pol 163	y

A*2402	A*2402	A*1101	B*0701	A*2402	A*1101	A*0201	A*0201	A*1101	A*0201	A*0201	
Pol 530	x	Vpr 14	z	Pol 971	z	Nef 94	y	Env 681	x	Vif 7	y
										Pol 873	x

A*1101	A*0201	A*0201	B*0701
Env 47	y	Vpr 59	x