



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0108948  
(43) 공개일자 2015년09월30일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 9/127 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 9/127 (2013.01)<br/>A61K 39/12 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7025507(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2008년07월09일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2010-7002754<br/>원출원일자(국제) 2008년07월09일<br/>심사청구일자 2013년07월09일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년09월16일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2008/008394</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/009054<br/>국제공개일자 2009년01월15일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>60/929,685 2007년07월09일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>조지타운 유니버시티<br/>미합중국 워싱턴 디시 20057 엔.더블유.오 스트리트 37번가</p> <p>(72) 발명자<br/>창, 에스더, 에이치.<br/>미국 20854 메릴랜드주 포토맥 디모크러시 블러바드 10244<br/>피롤로, 캐슬린, 에프.<br/>미국 20850 메릴랜드주 락빌 앤더슨 애비뉴 547</p> <p>(74) 대리인<br/>양영준, 김영</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

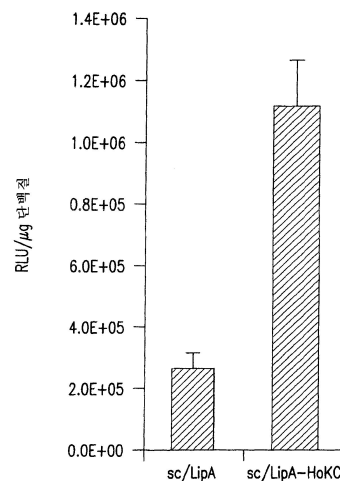
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 양이온성-리포솜 매개된 핵산 전달을 이용하여 면역 반응을 생성시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 약물 전달 분야에 관한 것이고, 보다 구체적으로 언급하면 양이온성 리포솜에 의거한 백신에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명은 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키거나 또는 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 분자를 전달하는 데에 유용한 리간드-표적화 (예를 들어, 항체- 또는 항체 단편-표적화) 리포솜을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 전달 시스템의 특이성은 표적화 리간드로부터 유래된다.

대표도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 양이온성 리포솜; (b) 상기 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않은 리간드; (c) 상기 양이온성 리포솜과 연관된 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자; 및 (d) 상기 양이온성 리포솜과 연관된 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자

를 포함하는 양이온성 리포솜 복합체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 전달 분야에 관한 것이고, 보다 구체적으로 언급하면 양이온성 리포솜에 의거한 백신에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명은 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키거나 또는 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 분자를 전달하는 데에 유용한 리간드-표적화 (예를 들어, 항체- 또는 항체 단편-표적화) 리포솜을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 전달 시스템의 특이성은 표적화 리간드로부터 유래된다.

#### 배경 기술

[0002] 백신은 고도로 전파 가능한 감염성 병원체에 대한 강력한 무기를 나타내고 과거 1세기 동안에는 감염성 질환의 부담을 상당히 저하시키는 작용을 하여 왔다. 그러나, 감염성 질환에 의해 초래되는 전세계적인 건강 상의 위협은 감소되지 않고 있고 오히려 국가적이고도 전세계적인 우선 사항이 되었다. 바이러스성 병원체, 예를 들어 결핵 및 말라리아의 강한 영향력은 지속적으로 전세계 규모로 여겨지고 있고, 새롭게 출현하는 병원체, 예를 들어 HIV/AIDS, SARS-코로나바이러스 (coronavirus)와 최근에 출현되고 있는 유행성 인플루엔자 또는 '조류 독감' 바이러스는 공중 보건에 대한 새로운 문제를 제시하고 있다.

[0003] 대부분의 백신 기술은 불활성화 백신 제형, 단백질 소단위체에 의거하거나 사실상 생 약독화시킨 백신 제형과 관련이 있다. 예를 들어, 최근에 인플루엔자 백신 생성 및 제작 기술은 계란을 접종하는 것에 기초하는데, 이는 여전히 시간과 비용 집중적 공정이다. 생 약독화 바이러스인 두창 (smallpox) 백신은 면역 기능저하 집단에게서 중증의 부작용과 연관이 있다. 따라서, 현재의 백신 기술은 진부한 기술이고 백신에 대한 국가적 또는 전세계적 수요를 충족시키기에는 불충분하다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0004] 따라서, 고도로 변이 가능하고 최근에 생겨난 병원체에 의해 초래된 문제를 해결해 줄 새로운 백신 기술을 개발하는 것이 시급히 요구된다. 본 발명은 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 데에 사용하고 환자에게서 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하기 위한, 양이온-리포솜에 의거한 약물 전달 시스템을 제공함으로써 상기 요구들을 충족시켜 준다.

#### 과제의 해결 수단

[0005] <발명의 간단한 요약>

[0006] 한 양태에서, 본 발명은 리간드-표적화 (예를 들어, 단백질/펩티드-표적화, 항체- 또는 항체 단편-표적화) 양이온성 리포솜을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 양태에서, 상기 방법은 리간드 (예를 들어, 트랜스페린, 갈락토스, L-37pA, 항체 또는 항체 단편)를 제조하는 단계; 및 리간드를 양이온성 리포솜과 혼합하여 리간드-표적화 양이온성 리포솜을 형성시키는 단계를 포함한다. 적합하게는, 리간드가 양이온성 리포솜과 직접적으로 연합

되고/복합체를 형성하지만, 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합되지는 않는다. 기타 양태에서는, 리간드가 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다. 이어서, 이러한 리간드-표적화 양이온성 리포솜을 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및/또는 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자와 혼합하여 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 형성시킨다. 적합한 양태에서는, 항체 단편, 예를 들어 Fab 단편, 또는 단일 체 Fv 단편, 예를 들어 항-트랜스페린 수용체 단일 체 Fv (TfRscFv)를 활용한다. 추가의 양태에서는, 상기 방법이 리간드-표적화 양이온성 리포솜을  $K[K(H)KKK]_5-K(H)KKC$  (HoKC) (서열 1) 펩티드를 포함하는 펩티드와 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0007] 적합한게는, 리간드 (예: 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)를 양이온성 리포솜과 약 1:1 내지 약 1:100, 적합하게 약 1:10 내지 약 1:50 (w:w), 보다 적합하게 약 1:20 내지 약 1:40 범위의 비로 혼합한다. 예시 양태에서는, 양이온성 리포솜이 디올레오일트리메틸암모늄 포스페이트 (DOTAP)와 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 및/또는 콜레스테롤 (cho1)의 혼합물; 또는 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB)와 디올레오일포스파티딜에탄올아민 및/또는 콜레스테롤의 혼합물을 포함한다.

[0008] 핵산은 적합하게, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 0.1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 10 몰; 내지 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 10 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 0.1 몰의 몰비로 존재한다. 예를 들어, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 1 몰의 몰비를 활용할 수 있다. 예시 양태에서는, 양이온성 면역 리포솜을, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자와 약 1:1 내지 약 1:40 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :리포솜  $\mu\text{g}$ ), 적합하게 약 1:5 내지 약 1:20 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :리포솜  $\mu\text{g}$ ), 예를 들어 약 1:10 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :리포솜  $\mu\text{g}$ )의 중량비로 혼합한다.

[0009] 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 바이러스 단백질의 예에는 HIV 바이러스 단백질, 인플루엔자 바이러스 단백질, A형, B형 또는 C형 간염 바이러스 단백질, SARS 바이러스 단백질, 조류 독감 바이러스 단백질, 에볼라 (Ebola) 바이러스 단백질, 서부 나일강 바이러스 단백질 및 두창 바이러스 단백질로 이루어진 군 중에서 선택된 바이러스 단백질이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 인터루킨의 예에는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23으로 이루어진 군 중에서 선택된 인터루킨이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 적합한 양태에서는, 상기 핵산이 IL-2, IL-12 및 IL-15를 코딩한다. 본 발명은 또한, 본 발명의 각종 방법에 의해 제조된 양이온성 면역 리포솜 복합체를 제공한다.

[0010] 추가의 양태에서, 본 발명은 양이온성 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편), 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 리간드-표적화 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체- 또는 항체 단편-표적화) 양이온성 리포솜 복합체를 제공하는데, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않는다. 추가의 양태에서는, 이러한 리간드가 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다.

[0011] 본 발명은 또한, 본 발명의 각종 리포솜 복합체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 부가의 제약 조성물은 양이온성 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편) 및 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 제1 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함하는데, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않는다. 추가의 양태에서는, 이러한 리간드가 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다. 적합한 양태에서는, 제약 조성물이 양이온성 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편) 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 제2 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 더 포함하는데, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않는다. 추가의 양태에서는, 이러한 리간드가 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다.

[0012] 부가의 양태에서, 본 발명은 양이온성 리포솜, 항-트랜스페린 수용체 단일 체 Fv (TfRscFv) (이러한 TfRscFv는 양이온성 리포솜과 직접적으로 연합되고/복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않는다) 및 하나 이상의 활성제를 포함하는 TfRscFv-표적화 양이온성 면역리포솜 복합체를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물의 항원 제시 세포 (APC)에 하나 이상의 활성제를 전달하는 방법을 제공한다. 추가의 양태에서는, TfRscFv가 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다. 적합하게는, 상기 방법이 활성제 (예: 핵산)를 전문적 및 비-전문적 APC, 예를 들어 간, 비장, 림프절, 소화관 및/또는 기도 내에 위치한 APC로 전달

시켜 준다.

[0013] 본 발명은 또한, 본 발명의 각종 양이온성 리포솜 복합체, 또는 본 발명의 제약 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다.

[0014] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 각종 양이온성 리포솜 복합체, 또는 본 발명의 제약 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0015] 고도로 변이 가능하고 최근에 생겨난 병원체에 의해 초래된 문제를 해결해 줄 새로운 백신 기술을 개발하는 것이 시급히 요구된다. 본 발명은 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 데에 사용하고 환자에게서 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하기 위한, 양이온-리포솜에 의거한 약물 전달 시스템을 제공함으로써 상기 요구들을 충족시켜 준다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 특허 또는 출원 파일은 색상으로 실행된 하나 이상의 도면을 포함하고 있다. 이러한 색 도면(들)을 수반한 특허 또는 특허 출원 공개 카피는 필요 비용 요청 및 지불시 해당 특허청에 의해 제공될 것이다.

[도 1]은 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 항체 단편(sc) 및 루시페라제 리포터(reporter) 유전자와 복합체를 형성한 리포솜(HoKC 펩티드가 봉입되거나 봉입되지 않음)으로 형질감염시킨 Hep3B 세포에서의 루시페라제 활성을 도시한 것이다.

[도 2]는 sc, Gal 또는 L-37-pA, 및 루시페라제 리포터 유전자를 발현하는 DNA와 복합체를 형성한 3가지 상이한 리포솜(A, D 및 G)으로 형질감염시킨 일차 침팬지 간세포에서의 루시페라제 발현을 도시한 것이다. 모든 데이터는 평균 + SD (n=3)로서 제시된다.

[도 3]은 처리되지 않은 마우스(UT)와 비교해서, 지질 A와 접합된 TfRscFv 리간드(sc)(scLA), 지질 A 및 HoKC와 접합된 TfRscFv 리간드(sc)(scLAHK), 지질 D 및 HoKC와 접합된 TfRscFv 리간드(sc)(scLDHK), 지질 G 및 HoKC와 접합된 TfRscFv 리간드(sc)(scLGHK), 지질 A와 접합된 갈락토스(GalLA) 및 지질 A와 접합된 L-37pA(L-37pALA)와 복합체를 형성한 EGFP를 발현하는 DNA 20 내지 25  $\mu$ g을 두 번 되풀이하여 접종한 마우스로부터의 간 추출물에서의 GFP 발현을 나타내는 웨스턴 블롯을 도시한 것이다.

[도 4]는 HCV 항원 NS3-NS5B를 발현하는 DNA 플라스미드(pAG410)로 형질감염시킨 세포의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 블롯을 NS5B에 대한 모노클로날 항체(좌측) 및 만성적으로 감염된 침팬지로부터의 혈청(우측)으로 프로빙하였다.

[도 5]는 pSCMV 및 CMV 프로모터 하에 IL-2의 비교 발현을 도시한 것이다.

[도 6]은 pAG410와 복합체를 형성한 scL 또는 자유 pAG410를 정맥내 주사한 후 마우스 간에서 NS3의 DNA PCR 증폭을 도시한 것이다.

[도 7]은 scL-HCV/scL-IL12를 접종한 마우스에서 HCV 재조합 백신니아 바이러스 복제의 억제율을 도시한 것이다.

[도 8a 및 8b]는 타고난 본래의 동물(Ch1601) 및 회복된 동물(Ch1587)에게 백신 접종하고 HCV로 시험감염시키는 동안 HCV 항-HVR1 항체(막대) 및 RNA 프로파일(검은색 삼각형)을 도시한 것이다. 항-HVR1은 P/N 비로서 표현하였다. P/N은 시험 혈청의 OD405를 동일한 침팬지로부터의 백신 전 샘플에 대해 수득된 것으로 나눔으로써 계산된다. 컷-오프(Cut-off) 값은 P/N=2이다.

[도 9a-9c]는 회복된 2마리 침팬지(Ch1588 및 Ch1606) 및 타고난 본래의 침팬지(Ch6394)에게 T 세포에 의거한 백신을 접종하고 HCV로 시험감염시키는 동안의 질병 프로파일을 도시한 것이다. RNA 역가(검은색 사각형), ALT 수준(검은색 삼각형). 면역시킨 동물을 HCV로 시험감염시키는 것은 0주째에 수행하였다(100 CID<sub>50</sub>의 cHCV).

[도 10a-10c]는 scL-HCV로 면역시키고 재조합 아데노바이러스로 부스팅시킨 침팬지(Ch1611 및 Ch6407) 또는 scL-빈(empty) 벡터로 면역시키고 비-재조합 아데노바이러스로 부스팅시킨 침팬지(Ch0257)에서 펩티드 풀에 대한 엘리스팟(elispot) 반응을 도시한 것이다.

[도 11a-11c]는 시험감염 전 및 후에 면역시킨 침팬지(Ch6407 및 1611) 및 대조군 침팬지(Ch0257)에서의 엘리

스폿 반응을 도시킨 것이다.

[도 12a-12c]는 백신 접종한 침팬지 (Ch6407 및 1611) 및 대조군 침팬지 (Ch0257)에서의 간내 사이토킨 mRNA 수준을 도시킨 것이다.

[도 13]은 대조군 침팬지 (Ch0257) 및 백신 접종한 침팬지 (Ch6407 및 1611)에서 시험감염 후 HCV RNA 역가를 도시킨 것이다.

[도 14]는 대조군 침팬지 (Ch0257) 및 백신 접종한 침팬지 (Ch6407 및 1611)에서 시험감염 후 혈청 ALT 수준을 도시킨 것이다.

[도 15]는 만성적으로 감염된 침팬지에서의 PBMC T-세포 반응을 도시킨 것이다.

[도 16a-16c]는 루시퍼라제 유전자를 자유 (네이키드) 플라스미드 DNA (LUC)(B)로서 발현하거나 또는 scL 나노면역리포솜 복합체 내에 피막화된 채로 (scLLUC)(C) 발현하는 플라스미드 DNA를 비내 투여한 다음, 연속해서 루시페린 기질을 주사한 후 BALB/c 마우스의 광학 영상화를 도시킨 것이다. 패널 A는 처리되지 않은 대조군을 나타낸다.

[도 17a-17c]는 루시퍼라제 유전자를 자유 (네이키드) 플라스미드 DNA (LUC)(B)로서 발현하거나 또는 scL 나노면역리포솜 복합체 내에 피막화된 채로 (scLLUC)(C) 발현하는 플라스미드 DNA를 정맥내 투여한 다음, 연속해서 루시페린 기질을 주사한 후 BALB/c 마우스의 광학 영상화를 도시킨 것이다. 패널 A는 처리되지 않은 대조군을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

<발명의 상세한 설명>

한 양태에서, 본 발명의 양태에 따르는 리간드-표적화 (예를 들어, 단백질/펩티드-표적화, 항체- 또는 항체 단편-표적화) 양이온성 리포솜 또는 양이온성 중합체 복합체는 적합하게, 목적하는 복합체 성분들을 한정된 비 및 한정된 순서로 함께 혼합하는 간단하고도 효율적인 비-화학적 접합 방법에 의해 제조한다. 부가의 양태에서, 리간드-표적화 양이온성 리포솜 또는 양이온성 중합체 복합체는 리간드를 화학적 결합을 통하여 양이온성 리포솜의 표면에 화학적으로 접합시키는 화학적 접합 방법에 의해 제조할 수 있다.

용어 "면역복합체", "면역리포솜", "복합체", "나노복합체", "면역나노복합체", "리포솜 복합체" 및 "나노면역리포솜"은 본 발명의 양이온성 리포솜을 지칭하기 위해 본원 전반에 걸쳐 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 예시되는 양이온성 리포솜 및 그의 생성 방법은 미국 공개특허공보 제2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호 (2006년 9월 14일자로 출원됨) (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 인용된 값 뿐만 아니라 인용된 값의 10% 이내 값을 지칭한다. 예를 들어, "약 100 nm"에는 90 nm 내지 110 nm의 값과 이러한 범위 사이 값이 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "리간드"는 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있거나, 또는 직접적으로 연합되고/복합체를 형성할 수 있지만 화학적으로 접합될 수 없는 적합한 모든 표적화 부분을 지칭한다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 예시되는 리간드에는 단백질 (예: 트랜스페린 또는 엽산염), 펩티드 (예: L-37pA), 항체, 항체 단편 (Fab' 단편 및 단일쇄 Fv 단편 포함) 및 당 (예: 갈락토스) 뿐만 아니라 기타 표적화 분자가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 양태에 따르는 복합체가 간단하고도 효율적인 비-화학적 접합에 의해 제조되는 것으로 예시되는 방법 및 조성물은 미국 공개특허공보 제2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호 (2006년 9월 14일자로 출원됨)에 기재되어 있다. 본 발명의 양태에 따르는 복합체가 화학적 접합을 통하여 제조되는 것으로 예시되는 방법 및 조성물은 미국 특허출원 제09/914,046호 (2001년 10월 1일자로 출원됨)에 기재되어 있다 (이들 특허 출원 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다).

예시 양태에서는, 완전 항체 또는 항체 단편을 리간드로서 사용하여 본 발명의 복합체를 제조할 수 있다. 적합한 양태에서는, 항체 단편을 사용하는데, 이에는 항체의 Fab 단편 및 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이 포함된다. 한 가지 적합한 항체는 항-트랜스페린 수용체 (항-TfR) 모노클로날 항체이고, 적합한 항체 단편은 항-TfR 모노클로날 항체에 기초한 scFv이다. 적합한 항-TfR 모노클로날 항체는 5E9이다 [참고: 예를 들어, Hayes, B. F., et al., "Characterization of a Monoclonal Antibody (5E9) that Defines a Human Cell Surface Antigen of



Cell Activation," *J. Immunol.* 127:347-352 (1981); Batra, J.K., et al., "Single-chain Immunotoxins Directed at the Human Transferrin Receptor Containing Pseudomonas Exotoxin A or Diphtheria Toxin: Anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-Anti-TFR(Fv)," *Mol. Cell. Biol.* 11:2200-2205 (1991); 본원에 참고로 도입된다]. 5E9 항체에 기초한 scFv는 대략 분자량 26,000의 단일 폴리펩티드 쇄로서 상기 MAb에 의해 인식된 Tfr의 에피토프에 대한 완전한 항체 결합 부위를 함유한다. scFv는 중쇄 및 경쇄 각각으로부터의 성분 VH 및 VL 가변 도메인을, 제1 가변 영역의 C-말단과 제2 가변 영역의 N-말단을 브릿징하는 적당하게 설계된 펩티드 (VH-펩티드-VL 또는 VL-펩티드-VH로서 정렬됨)와 연결시킴으로써 형성된다. 본원 전반에 걸쳐 기재된 바와 같은 부가의 리간드를 본 발명의 실시예에 사용할 수도 있다.

[0024] 한 양태에서는, 시스템인 부분을 scFv의 C-말단에 가한다. 특정 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 자유 선폴드릴 기를 제공하는 시스템은 화학적으로 결합된 양태와 비-화학적으로 결합된 양태 둘 다에서 항체와 리포솜 간의 복합체 형성을 증강시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 시스템을 수반하거나 수반하지 않지만, 단백질은 이. 콜라이 (*E.coli*) 봉입체에서 발현된 다음, 재폴딩되어 활성 형태의 항체 단편을 생성시킬 수 있다.

[0025] 복합체 형성에 있어서 입체적으로 안정화된 면역리포솜을 사용하는 것이 요망되지 않는다면, 예시되는 본 발명의 비-화학적으로 결합된 복합체를 제조하는 데 있어서의 제1 단계는 양이온성 리포솜 또는 리포솜 조합물을 선택되는 항체 또는 항체 단편과 혼합하는 것을 포함한다. 광범위한 양이온성 리포솜이 본 발명의 복합체 제조에 유용하다. PCT 공개특허공보 W099/25320에는 몇 가지 양이온성 리포솜의 제조가 기재되어 있다. 적합한 리포솜의 예에는 포스파티딜콜린 (PC); 포스파티딜세린 (PS); 및 디올레오일트리메틸암모늄 포스페이트 (DOTAP)와 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 및/또는 콜레스테롤 (chol)의 혼합물, 또는 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB)와 DOPE 및/또는 chol의 혼합물을 포함하는 것이 포함된다. 상기 지질의 비는 특이적 표적 세포 유형에 대한 치료적 분자의 흡수 효율을 최적화시키도록 다양하게 할 수 있다. 리포솜은 하나 이상의 양이온성 지질과 하나 이상의 중성 또는 헬퍼 (helper) 지질의 혼합물을 포함할 수 있다. 양이온성 지질(들) 대 중성 또는 헬퍼 지질(들)의 바람직한 비는 약 1:(0.5-3), 바람직하게 1:(1-2) (몰 비)이다.

[0026] 적합한 리간드, 예를 들어 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편은 표적 세포의 표면, 바람직하게 표적 세포 상에 차별적으로 발현되는 수용체와 결합하게 될 것이다. 리간드를 실은 하에 양이온성 리포솜 또는 중합체와 약 1:10 내지 약 1:50, 적합하게 약 1:20 내지 약 1:40 (중량:중량) 범위의 리간드 (예: 단백질):지질 비 (w:w)로 혼합한다.

[0027] 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)와 리포솜을 실은 하에 단기간, 전형적으로 약 10 내지 15분 동안 항온 배양한 다음, 이 혼합물을 선택되는 치료제 또는 진단제와 혼합한다. 리포솜 복합체와 복합체를 형성할 수 있는 치료적 분자 또는 치료제의 예에는 유전자, 고분자량 DNA (게놈 DNA), 플라스미드 DNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩티드, 리보자임, 핵산 (siRNA 및 안티센스 포함), 소분자, 바이러스성 입자, 면역조절제, 영상화하기 위한 조영제, 단백질 및 화학적 작용제가 포함된다.

[0028] 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)와 리포솜 조합물을 치료제와 약 0.5:1 내지 약 1:40 (치료제  $\mu\text{g}$ :총 지질 nmol), 적합하게 약 1:10 내지 1:20 (치료제  $\mu\text{g}$ :총 지질 nmol) 범위의 비로 혼합하고, 단기간, 전형적으로 약 10 내지 15분 동안 실은 하에 항온 배양한다. 리포솜 복합체의 크기는 전형적으로, 말베른 (Malvern) ZETASIZER<sup>®</sup> 3000 또는 말베른 ZETASIZER<sup>®</sup> NANO-ZS를 사용하여 동적 광산란시킴으로써 측정된 바와 같이 약 50 내지 500 nm의 범위 내이다 [참고: 미국 공개특허공보 제2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호 (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)].

[0029] 본 발명의 한 양태에서, 복합체를 형성하기 위해 사용된 리포솜은 입체적으로 안정화된 리포솜이다. 입체적으로 안정화된 리포솜은 친수성 중합체, 예를 들어 PEG, 폴리(2-에틸아크릴산) 또는 폴리(n-이소프로필아크릴아미드) (PNIPAM)가 통합되어 있는 리포솜이다. 이러한 변형된 리포솜은 치료제와 복합체를 형성한 경우에 특히 유용할 수 있는데, 이는 상기 리포솜이 전형적으로, 이와 같이 변형되지 않은 거의 동등한 수준의 리포솜과 동일한 수준으로 신속하게 세망내피계에 의해 혈류로부터 제거되지 않기 때문이다. 본 발명의 입체적으로 안정화된 리포솜 복합체를 제조하기 위해서는, 항체 또는 항체 단편, 리포솜 및 치료제 또는 진단제의 혼합 순서를 상기 제시된 순서와 반대로 한다. 제1 단계에서는, 상기 언급된 바와 같은 양이온성 리포솜을 먼저, 상기 언급된 바와 같은 치료제와 약 0.5:1 내지 약 1:40 (치료제  $\mu\text{g}$ :지질 nmol), 적합하게 약 1:10 내지 약 1:20 (치료제  $\mu\text{g}$ :지질 nmol) 범위의 비로 혼합한다. 이러한 리포플렉스 (lipoplex)에, 생리적으로 허용 가능한 완충액 중의 PEG 중합체 용액을 약 0.1:100 (PEG nmol:리포솜 nmol), 적합하게 약 0.5:50, 예를 들어 약 1:40 (PEG nmol:리포솜 nmol)의 비로 가한다. 이로써 생성되는 용액을, 상기 중합체가 리포솜 복합체 내로 통합될 수 있기에 중

본한 시간 동안 실온 하에 항온 배양한다. 이어서, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)를 실온 하에 안정화된 리포솜 복합체와 약 1:5 내지 약 1:40 (w:w) 범위의 리간드 (예: 단백질):지질 비로 혼합한다.

[0030]

본 발명에 따라서 제조된 리포솜 복합체는 생체내 투여를 위해 약리학적으로 허용 가능한 제형으로서 제형화할 수 있다. 상기 복합체를 약리학적으로 화합성인 비히클 또는 담체와 혼합할 수 있다. 조성물은, 예를 들어 복합체 중의 치료적 분자 또는 기타 페이로드 (payload)를 투여함으로써 이득을 보게 될 포유동물, 예를 들어 인간 환자에게 정맥내 투여용으로 제형화할 수 있다. 복합체는 정맥내 투여 후 신체 전반에 걸쳐 분포되기에 적당한 크기이다. 또 다른 한편으로, 복합체는 기타 투여 경로, 예를 들어 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여를 통하여 전달할 수 있다. 이러한 방법을 통하여 전달하기 위한 제형의 제조, 및 이러한 방법을 이용한 전달은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0031]

복합체는 지질의 선택 및 비, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편) 대 리포솜의 비, 리간드 및 리포솜 대 치료제의 비, 및 리간드 및 치료제의 선택을 통하여 표적 세포 유형에 대해 최적화시킬 수 있다.

[0032]

본 발명의 방법에 따라서 제조된 복합체는 이러한 복합체에 의해 핵산, 치료적 분자 또는 기타 페이로드를 전신 전달하는 데에 사용하기 위한 키트 형태로 제공될 수 있다. 적합한 키트는 적합한 별개의 용기 내에 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편), 및 핵산, 치료제 또는 진단제를 포함할 수 있다. 이들 성분은 멸균성 조건 하에 적당한 순서로 혼합하고, 제조 후 합리적인 시간, 일반적으로 약 30분 내지 약 24시간 내에 환자에게 투여할 수 있다. 키트 성분은 바람직하게, 용액으로서 또는 건조된 분말로서 제공된다. 바람직하게 용액 형태로 제공된 성분은 적당한 완충제, 삼투압 조절제 등과 함께 멸균성 주사용 수에서 제형화한다. 완전한 복합체는 건조된 분말 (동결건조)로서 제형화할 수도 있다 [참고: 미국 공개특허공보 제 2005/0002998호 (이의 전문이 본원에 참고로 도입된다)].

[0033]

미국 공개특허공보 제2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호 (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다) 전반에 걸쳐 논의된 바와 같이, 전반에 걸쳐 기재된 양이온성 면역리포솜 복합체는 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 Fv (TfRscFv)를 이용한 표적화를 통하여 각종 치료제 및 진단제를 종양 세포에 성공적으로 전달하였다. 구체적으로 언급하면, 핵산 분자, 예를 들어 안티센스 및 siRNA 뿐만 아니라 플라스미드 DNA (예: p53 및 RB94)는 본 발명의 면역리포솜 복합체를 사용하여 성공적으로 전달하였다 [참고: 미국 공개특허공보 제 2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호]. 소분자도 다음 문헌 전반에 걸쳐 기재된 방법 및 리포솜에 의해 전달하였다 [참고: 미국 특허출원 제11/798,296호 (2007년 5월 11일자로 출원됨) (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)]. 전반적으로 논의된 바와 같이, 표적화 부분으로서 TfRscFv를 이용하여 항원 제시 세포 (APC)가 신체 내의 어느 곳 [이에는 간세포, 쿠퍼 (Kupffer) 세포, 간 동모양 상피 세포 (LSEC) 및 수지상 세포가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다]에 존재하든지 간에 상기 항원 표시 세포를 표적으로 하여 이를 효율적으로 형질감염시킬 수 있는 백신 구조물을 제조할 수 있는 것으로 본 발명에 의해 밝혀졌다.

[0034]

#### **백신 접종을 위한 양이온성 리포솜 복합체**

[0035]

한 양태에서, 본 발명은 양이온성 리포솜 복합체를 사용하여 일차 바이러스성 복제 부위, 예를 들어 C형 간염 바이러스 (HCV)가 있는 간, 및 구체적으로는, 항원 표시 세포 (APC)에서, 포유동물 (본원에 사용된 바와 같은 포유동물에는 인간 뿐만 아니라 개, 고양이, 돼지, 양, 말, 가축, 랫트, 마우스, 침팬지, 원숭이, 유인원 등이 포함된다)에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 한 예로서 HCV에서는, 감염 시 바이러스성 복제 부위 (간)에서 T 세포 반응이 보다 신속하고 보다 유효한 것으로 결정되었다. 따라서, 본 발명은 제조할 플라스미드 DNA를 전달해주는 양이온성 리포솜을 통하여 생체 내에서 간 (예: 쿠퍼 세포, 간 동모양 상피 세포, 수지상 세포 및 간세포)에 위치한 세포를 표적으로 하는 면역 반응 (예: 예방적 백신), 및 바이러스성 백신 이용한 면역을 유도시킴으로써 HCV 회복된 포유동물에서 발생하는 T 세포 프라이밍을 모방하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 만성 (및 급성) 병원성 감염증을 예방 및 치료하기 위한 면역치료제로서 사용하기 위한 백신을 제공한다. 각종 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 신체의 정상 세포 (즉, 종양 세포가 아님)에 전달할 수 있는 능력은 예상치 못한 놀라운 결과이다. 본 발명의 예시 방법이 포유동물 (예: 인간)을 치료하기 위해 사용되긴 하지만, 본 발명의 방법, 리포솜 제형 및 조성물이 조류, 어류 등을 포함한 기타 동물을 치료하기 위해 활용될 수도 있다는 것을 인지해야 한다.

- [0036] 본 발명의 양이온성 면역리포솜 복합체는 적합하게, 그의 표면 상에 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 항체 분자 (TfRscFv)를 포함한다. 이러한 표적화 분자는 바이러스 단백질을 발현하는 피막화/연합 핵산 (예: 플라스미드 DNA)을 APC에 의해 전달 및 흡수시키는 것을 증강시키는 것으로 결정된 바 있다 [참고: 미국 공개특허공보 제 2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호]. 또한, 본 발명은 면역 반응을 자극하기 위하여 동일한 면역리포솜 복합체 중의 인터루킨 (IL) 아조반트 (adjuvant)를 발현하는 핵산을 동시에 투여하는 것을 제공한다.
- [0037] 면역 반응의 사이토킨 증강
- [0038] 사이토킨은 활성화 자극에 반응하여 신체 내의 세포에 의해 방출되는 소형 단백질 (약 25 kDa)이다. 이는 선천 및 적응 면역 반응을 조절하기 위해 특이적 수용체와 결합함으로써 자가분비 및 주변분비 방식으로 반응을 유도시킨다. 이는 정제된 단백질 [참고: Berzofsky J.A., et al., *Immunological Reviews*, 170: 151-172 (1999)] 또는 목적하는 사이토킨 생성물을 발현하는 DNA 플라스미드 [참고: Toka F. N., et al., *Immunological Reviews*, 199: 100-112 (2004)]의 공동-투여를 통하여 백신의 활성을 개선시키기 위해 광범위하게 사용되어 왔다. 이들 아조반트의 유전적 전달에 관한 대부분의 연구 조사는 근육내 또는 피내 투여 경로에 집중되어 왔고, 정맥내 전달이 광범위하게 평가되지 않았다 [참고: Toka]. CD4 세포는 그의 사이토킨 유전자 전사 및 분비에 기초하여 2가지 주요 유형으로 분류된다. Th1 세포는 IL-2 및 감마 인터페론 (IFN- $\gamma$ )의 분비를 특징으로 하는 반면, Th2 세포는 IL-4, IL-5, 및 IL-10를 생성한다. 아조반트는 Th1 또는 Th2 방향으로 편중된 T-세포 반응을 유도시킬 수 있는데, 이는 백신 결과에 심오한 영향을 미칠 수 있다. 면역을 개선시키고 효율적인 Th1-유형 반응을 자극하기 위해, IL-2, IL-12 또는 IL-15를 발현하는 핵산 (예: 플라스미드)을 본원 전반에 걸쳐 기재된 양이온성 리포솜 내에 적합하게 연합/피막화시킨다.
- [0039] IL-2: 대다수의 IL-2 (15.5-kDa 당단백질)는 CD4 Th1 유형 세포에 의해 생성되고, 그의 주요 작용은 헬퍼 및 세포독성 T 세포 (CTL) 성장, 천연 킬러 (NK) 세포, 림포카인-활성화 킬러 세포, 단구, 및 대식 세포를 자극하는 것이다. IL-2는 항원-특이적 면역 반응을 개시 및 유지시키는 데에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있고, 몇 가지 DNA 백신에 의해 유도된 면역 반응을 증강시키는 것으로 밝혀졌다. 이러한 기전은 DC에서 CD48 및 CD80의 발현을 상향 조절할 뿐만 아니라 CD8+ T 세포 상에서 그들 각각의 리간드 CD2 및 CD28을 상향 조절하는 것으로 여겨진다 [참고: Toka].
- [0040] IL-12: 인간 IL-12는 2개의 소단위체 p35 및 p40으로 구성된 이종-이량체이다. 이는 병원체 감염에 반응하여 포식세포 및 DC에 의해 생성되고 IFN- $\gamma$  생성을 유도시키는 프로-염증성 사이토킨이다. 이러한 사이토킨은 Th2 세포에 비해 Th1의 분화를 선호하고, 선천성 저항을 적응 면역과 연계시켜 준다. DNA에 의거한 HCV 백신으로 면역시킨 마우스에서는, IL-12 DNA를 전달하는 것이 CTL 반응과 코어-rVV의 제거를 개선시켰다.
- [0041] IL-15: IL-15는 다형질성 및 다기능성 방식으로 작용하는 14 kDa 당단백질이다. 이는 단구, 대식 세포, DC, 쿠퍼 세포, 간세포 및 내피 세포를 포함한 광범위한 세포에 의해 발현된다. 이는 IL-2와 공통적인 많은 생물학적 활성을 지니고 있는데, 이는 두 사이토킨이 동일한 수용체 성분을 이용하고 있기 때문이다. IL-15는 NK 세포 및 CTL의 세포용해 활성을 증강시킬 수 있고, NK 및 T 세포로부터 IFN- $\gamma$  생성을 유도시킬 수 있다. 또한, 이는 CD8+ 기억 및 효과기 T 세포의 증식을 유도시키므로, 항바이러스성 CD8+ 기억 T 세포 반응을 유도시키는 경우에 아조반트로서의 봉입에 대한 흥미로운 후보이다.
- [0042] 예시 양태에서, 양이온성 리포솜은 HK 펩티드를 수반하거나 수반하지 않는 단일쇄 트랜스페린 수용체 항체 (scL 또는 scLHK), 및 HCV 게놈의 NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B (NS3-NS5B) 부분을 발현하는 하나 이상의 플라스미드를 수반하거나 수반하지 않는 단일쇄 트랜스페린 수용체 항체 (scL-HCV 또는 scLHK-HCV)를 포함한다. 그러나, 본원 전반에 걸쳐 기재된 바와 같이, 모든 바이러스 단백질(들)을 발현하는 모든 핵산 분자를 본 발명의 리포솜과 피막화/연합시킬 수 있다는 것을 인지해야 한다.
- [0043] 백신 접종한 타고난 본래의 침팬지에서의 결과는, 아조반트로서 IL-12를 발현하는 플라스미드 DNA를 봉입시키고 재조합 아데노바이러스로 부스팅한 전신 scL-HCV 접근 방식이 HCV-특이적 면역 반응을 촉발시킬 수 있다는 것을 나타낸다. HCV 복제는 시험감염 후 현저하게 억제되었고, 이는 HCV-특이적 T 세포 반응과 연관되었다. 접종 후 HCV NS3 단백질을 발현하는 재조합 백신이나 바이러스를 이용하여 T 세포 반응 "시험감염"을 평가하기 위한 세포성 면역 실험이 또한 scL-HCV/IL 군에서 바이러스성 복제 억제를 나타낸 마우스에서는, 이들 결과가 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키기 위한 예방적 백신 접종을 위해 상기 접근 방식을 사용하는 것을 지지해 주고 있다.
- [0044] 예시 양태에서, 본 발명은 리간드-표적화 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체- 또는 항체 단편-표적화) 양이온성



리포솜 복합체의 제조 방법을 제공한다. 적합한 양태에서, 상기 방법은 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)를 제조하는 단계; 및 리간드를 양이온성 리포솜과 혼합하여 리간드-표적화 양이온성 리포솜을 형성시키는 단계를 포함하는데, 상기 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 연합되고/복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않는다. 이어서, 리간드-표적화 양이온성 리포솜을 하나 이상의 바이러스 단백질 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자와 혼합하여 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 형성시킨다. 또 다른 예시 양태에서, 본 발명은 리간드-표적화 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편-표적화) 양이온성 리포솜 복합체의 제조 방법을 제공한다. 적합한 양태에서, 상기 방법은 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)를 제조하는 단계; 및 리간드를 양이온성 리포솜과 혼합하여 리간드-표적화 양이온성 리포솜을 형성시키는 단계를 포함하는데, 상기 리간드는 화학적 접합을 통하여 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성한다. 이어서, 리간드-표적화 양이온성 리포솜을 하나 이상의 바이러스 단백질 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및/또는 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자와 혼합하여 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 형성시킨다.

[0045] 본원에 기재된 바와 같이, 핵산 분자는 적합하게, 프로세싱 동안 하나 이상의 핵산 분자를 리포솜과 간단히 혼합함으로써 본 발명의 리포솜 복합체와 피막화, 함유 또는 복합체 형성/연합된다. 핵산 분자:리포솜 복합체의 적합한 비는 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 예시 양태에서, 핵산은 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 1 몰의 몰비로 존재한다. 예를 들어, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 리포솜과 복합체를 형성하기에 앞서, 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자와 함께 약 0.1:10 내지 약 10:0.1, 적합하게 약 0.5:1 내지 약 2:1, 더욱 적합하게 약 1:1의 몰비로 혼합하여 핵산 용액을 형성시키는데, 상기 범위를 벗어난 부가의 몰비를 사용할 수도 있다. 기타 양태에서, 상기 핵산 분자는 목적하는 몰비를 여전히 유지하면서도 리포솜과 별개로 (즉, 상이한 용액으로) 복합체 형성할 수 있다.

[0046] 적합하게, 핵산 분자 대 리포솜 복합체의 몰비는 약 0.5:1 내지 약 1:40 (총 핵산  $\mu\text{g}$ : 리포솜  $\mu\text{g}$ ), 적합하게 약 1:5 내지 약 1:20 (총 핵산  $\mu\text{g}$ : 리포솜  $\mu\text{g}$ ), 보다 적합하게 약 1:10 (총 핵산  $\mu\text{g}$ : 리포솜  $\mu\text{g}$ )의 범위이다. 본원에 활용된 바와 같이, 핵산 분자 대 리포솜 복합체의 몰비에는 양 핵산 "집단"이 포함되는데, 즉 핵산의 총 양은 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함한다.

[0047] 전반에 걸쳐 기재된 바와 같이, 핵산 분자를 전달하기 위한 목적하는 양이온성 리포솜의 예에는 디올레오일트리메틸암모늄 포스페이트 (DOTAP)와 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 및/또는 콜레스테롤 (chol)의 혼합물; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB)와 DOPE 및/또는 chol의 혼합물을 포함하는 것이 포함된다. 상기 지질의 비는 특이적 표적 세포 유형에 대한 핵산 분자의 흡수 효율을 최적화시키도록 다양하게 할 수 있다. 리포솜은 하나 이상의 양이온성 지질과 하나 이상의 중성 또는 헬퍼 지질의 혼합물을 포함할 수 있다. 양이온성 지질(들) 대 중성 또는 헬퍼 지질(들)의 바람직한 비는 약 1:(0.5-3), 바람직하게 1:(1-2) (몰 비)이다. 본 발명을 실시하는 데에 유용한 각종 지질의 비 예에는 다음이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다:

[0048] LipA DOTAP/DOPE 1:1 몰비

[0049] LipB DDAB/DOPE 1:1 몰비

[0050] LipC DDAB/DOPE 1:2 몰비

[0051] LipD DOTAP/Chol 1:1 몰비

[0052] LipE DDAB/Chol 1:1 몰비

[0053] LipG DOTAP/DOPE/Chol 2:1:1 몰비

[0054] LipH DDAB/DOPE/Chol 2:1:1 몰비

[0055] (DOTAP = 디올레오일트리메틸암모늄 포스페이트, DDAB = 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드; DOPE = 디올레오일포스파티딜에탄올아민; chol = 콜레스테롤).

[0056] 전반에 걸쳐 논의된 바와 같이, 적합한 양태에서 본 발명의 조성물 및 방법에 사용된 리간드는 항체 단편, 예를 들어 단일쇄 Fv 단편, 예를 들면 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 Fv (TfRscFv)이다. 적합하게는, 이러한 항체 또는 항체 단편을 양이온성 지질과 약 1:1 내지 약 1:100, 적합하게 약 1:10 내지 약 1:50 (w:w), 보다 적합하게 약 1:30, 또는 약 1:33 (항체 또는 항체 단편:지질) 범위의 비로 혼합하여 표적화 양이온성 면역리포솜을 형

생시킨다. 부가의 양태에서, 리포솜은 또한, 리포솜과 연합된 엔도솜 붕괴성 펩티드, 예를 들어  $K[K(H)KKK]_5-H(K)KKC$  (HoKC) (HK) (서열 1) 펩티드 [제작사: Sigma-Genosys (The Woodlands, TX)]를 포함할 수 있다. 이러한 엔도솜 붕괴성 펩티드 HoKC는 세포의 세포질에서 작용제의 방출을 도와줄 수 있다.

[0057]

예시 양태에서, 양이온성 리포솜 제형 A (DOTAP:DOPE 1:1 몰비), B (DDAB:DOPE 1:1 몰비), G (DOTAP:DOPE:콜레스테롤 1:1:1 몰비) 및 H (DDAB:DOPE:콜레스테롤 1:1:1 몰비) 또는 전반에 걸쳐 기재된 모든 지질 제형은 본원에 기재된 바와 같은 에탄올 주사 방법을 사용하여 제조한다. 각 리포솜 제형은 또한 적합하게, MPB-DOPE를 총 지질의 5 몰%로 포함한다. HoKC 펩티드 ( $K[K(H)KKK]_5-H(K)KKC$ )가 말단 시스테인을 수반하기 때문에, MPB-DOPE가 모든 리포솜 조성물에 포함되어 펩티드를 리포솜과 접합시킬 수 있게 해주었다. 이러한 Lip-HoKC 리포솜은 말레이미드 기를 수반하는 양이온성 리포솜 (Lip-MPB)과 펩티드 간의 커플링 반응을 이용하여 제조하였다. 시스테인 상에 자유 티올 기를 수반한 펩티드 0.1 mmol 분취액을 10 mM HEPES, pH 7.4 중의 2 mmol의 Lip-MPB 용액에 가하고, 실온 하에 2시간 동안 회전시켰다 (20-30 r.p.m.). 이로써 생성되는 Lip-HoKC는 지질 농도가 1.4 mM이다.

[0058]

완전한 복합체는 HoKC를 수반하지 않은 TfRscFv:Lip:DNA 복합체를 생성시키기 위해 사용된 바와 동일한 방식으로 형성시킨다. 본원에서는 또한, 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 항체 단편 (TfRscFv)을 Lip-HoKC와 특이적 비로 온화하게 전도시킴으로써 혼합하고, 실온 하에 10분 동안 항온 배양한다. 이어서, DNA를 TfRscFv:Lip-HoKC 용액에 가하고, 온화하게 전도시킴으로써 혼합하며, 실온 하에 15분 동안 다시 항온 배양한 후, 텍스트로스 또는 슈크로스를 5 내지 10%의 최종 농도에 가하고 온화하게 전도시킴으로써 다시 혼합한다. TfRscFv:Lip-HoKC:DNA 복합체에 대한 적합한 비는 0.3 mg:7 nmol:1 mg이다.

[0059]

부가의 양태에서, 본 발명의 방법은 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)을 제조하는 단계; 및 리간드를 양이온성 리포솜의 표면과 화학적으로 접합시켜 양이온성 면역리포솜을 형성시키는 단계를 포함한다. 이어서, 양이온성 리포솜을 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자와 혼합하여 리간드-표적화 리포솜 복합체를 형성시킨다. 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)를 양이온성 리포솜과 화학적으로 적합시키는 것으로 예시되는 방법, 조성물, 비 및 조건은 미국 특허출원 제09/914,046호 (2001년 10월 1일자로 출원됨) (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0060]

본 발명의 실시예에 사용하는 것으로 예시되는 핵산 분자에는 플라스미드 및 벡터를 포함한 RNA 및 DNA가 포함된다. 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 모든 바이러스 단백질을 코딩할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단백질", "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 2개 이상의 아미노산의 모든 쇠(들)를 의미하기 위해 상호 교환적으로 사용되고, 특정 길이의 생성물을 지칭하지는 않는다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드, "단백질", "아미노산 쇠", 또는 2개 이상의 아미노산 쇠(들)를 지칭하기 위해 사용된 기타 모든 용어가 상기 용어 "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"의 정의 내에 포함된다.

[0061]

본 발명을 이용하여 전달된 핵산에 의해 코딩될 수 있는 바이러스성 펩티드/단백질의 예에는 바이러스성 병원체 [예: 인플루엔자, HIV, 에볼라, 폭스바이러스 (두창), 서부 나일강 바이러스, SARS 등] 등이 포함된다. 본 발명에 활용된 핵산에 의해 코딩될 수 있는 바이러스 단백질의 부가 예에는 아데노바이러스 폴리펩티드, 알파바이러스 폴리펩티드, 칼리시바이러스 (calicivirus) 폴리펩티드, 예를 들어 칼리시바이러스 캡시드 항원, 코로나바이러스 폴리펩티드, 디스토펜 (distemper) 바이러스 폴리펩티드, 에볼라 바이러스 폴리펩티드, 엔테로바이러스 폴리펩티드, 플라비바이러스 (flavivirus) 폴리펩티드, 예를 들어 서부 나일강 바이러스 E-단백질, 간염 바이러스 (AE) 폴리펩티드, 예를 들어 A형 간염, B형 간염 및/또는 C형 간염, 헤르페스바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 단순 포진 바이러스 또는 수두 대상포진 바이러스 당단백질, 면역결핍증 바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 인간 면역결핍증 바이러스 외피 또는 프로테아제, 감염성 복막염 바이러스 폴리펩티드, 인플루엔자 바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 인플루엔자 A 폴리펩티드, 예를 들면 적혈구 응집소 또는 세포의 M2 단백질 (M2e), 뉴라미니다제 또는 핵단백질, 백혈병 바이러스 폴리펩티드, 마르부르크 (Marburg) 바이러스 폴리펩티드, 오르토크소바이러스 폴리펩티드, 유두종 바이러스 폴리펩티드, 라사열 (lassa fever) 폴리펩티드, 파라인플루엔자 바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 적혈구 응집소/뉴라미니다제, 파라믹소바이러스 폴리펩티드, 파르보바이러스 폴리펩티드, 페스티바이러스 폴리펩티드, 피코르나 (picorna) 바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 폴리오바이러스 캡시드 폴리펩티드, 폭스 바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 백시니아 바이러스 폴리펩티드 (예: 두창), 광견병 바이러스 폴리펩티드, 예를 들어 광견병 바이러스 당단백질 G, 레오바이러스 폴리펩티드, 레트로바이러스 폴리펩티드, 및 로타바이러스 폴리펩티드가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 바이러스 단백질을 코딩하

는 핵산 분자는 당해 분야에서 입수 가능하고, 이에 는 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 플라스미드가 포함된다. 예를 들어, 공개 데이터베이스 (예: GENBANK<sup>®</sup>)는 본 발명의 실시 에 활용될 수 있는 핵산 분자의 각종 예를 함유하고 있다.

[0062]

하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자는 또한, 당해 분야에 널리 공지되어 있고 공개 데이터베이스 (예: GENBANK<sup>®</sup>)로부터 용이하게 입수 가능하다. 본 발명의 실시 에 유용한 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 예시 인터루킨에는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 적합한 양태에서, 상기 핵산은 IL-2, IL-12 또는 IL-15를 코딩한다.

[0063]

본 발명은 또한, 전반에 걸쳐 기재된 방법에 따라서 제조된 양이온성 면역리포솜 복합체를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 양이온성 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편), 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 리간드-표적화 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편-표적화) 양이온성 리포솜 복합체를 제공하는데, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하고/연합되지만, 화학적으로 접합되지는 않는다. 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)는 적합하게, 리간드와 리포솜 간의 상호 작용 [예를 들어, 정전기, 반 데르 발스 (van der Waals), 또는 기타 비-화학적으로 접합된 상호 작용]을 통하여 리포솜과 연합된다. 일반적으로, 비-화학적으로 접합되는 경우에는 리간드 및 리포솜에 부착시키기 위해 링커 또는 스페이서 분자 (예: 중합체 또는 기타 분자)를 사용하지 않는다.

[0064]

본원에 기재된 바와 같이, 부가의 양태에서는 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편)를, 예를 들어 말레이미드 기 또는 기타 설포하이드릴 반응성 기를 함유하는 양이온성 리포솜과 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편) 상의 황 원자 간의 화학적 상호 작용을 통하여 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합시킨다. 이어서, 핵산을 리포솜에 가하여 리포솜-DNA 복합체를 형성시키거나 또는 핵산을 먼저 가한 다음, 리간드와 복합체를 형성시킬 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허출원 제09/914,046호 (2001년 10월 1일자로 출원됨) (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0065]

핵산을 포함하는 트랜스페린 (Tf)-접합된 리포솜 (Tf-Lip-DNA)은 기존에 보고된 공식화에 따라서 제조한다 [참고: Xu, et al., Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts," *Hum Gene Ther.* 10(18):2941-2952 (1999)] (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다). 트랜스페린-리포솜-매개된 전신 p53 유전자 요법을 방사선과 병용하면 인간 두경부암 이종 이식편이 퇴행된다. 간략하게 언급하면, 적합한 제제의 경우에는 25 ml의 Tf (5 mg/ml, 철-포화된 홀로-트랜스페린; 공급처; Sigma, St. Louis, MO) 및 50 ml의 Lip (2 mM 총 지질) + 75 ml의 물을 폴리프로필렌 튜브에서 혼합하고, 자주 진동시키면서 실온 하에 5 내지 15분 동안 항온 배양한다. 120 ml의 20 mM HEPES 완충액, pH 7.4 중의 10 마이크로그램의 플라스미드 DNA를 상기 튜브에 가하고, 즉시 철저히 혼합하고, 자주 진동시키면서 실온 하에 20분 동안 항온 배양한다. 이어서, 30 마이크로리터의 50% 텍스트로스 용액을 튜브에 가한다. 최종 DNA:지질:Tf 비는 약 1:10:12.5 (mg/nmol/mg)이다. 부가의 양태에서는, HEPES 완충액을 물로 대체시킬 수 있다.

[0066]

핵산 분자를 양이온성 리포솜 내에 피막화시킬 수 있거나, 양이온성 리포솜의 탄화수소 쉼 영역 내에 함유시킬 수 있거나, 양이온성 리포솜의 내부 또는 외부 단층 (예: 헤드-기 영역)과 연합시킬 수 있거나, 또는 이들을 조합시킬 수 있다. 적합하게는, 본 발명의 양이온성 면역리포솜이 단층 리포솜 (즉, 단일 이중층)이긴 하지만, 수 개의 동심 이중층을 포함하는 다층 리포솜을 사용할 수도 있다. 본 발명의 단일 이중층 양이온성 리포솜은 핵산 분자가 피막화될 수 있는 내부 수성 용적을 포함한다. 이는 또한, 중성이거나 거의 전하를 띠지 않도록 적응화시킨 핵산 분자를 함유할 수 있는 탄화수소 쉼 영역 (즉, 지질의 지질 쉼 영역)을 갖는 단일 이중층을 포함한다. 또한, 핵산 분자는, 예를 들어 음 전하를 띤 핵산 분자와 양 전하를 띤 양이온성 리포솜 간의 전하-전하 상호 작용을 통하여, 리포솜 막의 내부 단층 및/또는 외부 단층 (즉, 지질의 헤드-기 영역) 중의 어느 하나 또는 둘 다와 복합체를 형성하거나 연합될 수 있다. 추가의 양태에서, 핵산 분자는 본 발명의 양이온성 리포솜 복합체의 상기 영역 모두에서 피막화/연합/복합체 형성될 수 있다.

[0067]

전반에 걸쳐 논의된 바와 같이, 핵산 분자는 적합하게, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 0.1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 10 몰; 내지 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 0.1 몰의 몰비로 존재하는데, 특히 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자

약 1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 약 1 몰을 리포솜 복합체에 사용할 수 있다. 지질, 표적화 리간드 및 핵산 분자의 적합한 양/비가 또한 전반에 걸쳐 기재되어 있다. 예시 양태에서, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 및 리포솜은 약 0.5:1 내지 약 1:40 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ ), 적합하게 약 1:5 내지 약 1:20 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ ), 예를 들어 약 1:10 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ )의 중량 비로 존재한다. 본 발명의 예시 리포솜 조성물은 총 핵산, 지질 및 리간드, 예를 들어 단일 쇠 항체 (예: TfscFv)를 약 1:10:0.33 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ :단일 쇠 항체  $\mu\text{g}$ )의 중량 비로 포함한다.

[0068] 본 발명의 양이온성 리포솜에 활용된 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 것으로 예시되는 바이러스 단백질에는 전반에 걸쳐 기재된 것, 예를 들어 HIV 바이러스 단백질, 인플루엔자 바이러스 단백질, SARS 바이러스 단백질, A형, B형 및/또는 C형 간염 바이러스 단백질, 조류 독감 바이러스 단백질 및 두창 바이러스 단백질 등이 포함된다. 본 발명의 양이온성 리포솜에 활용된 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 것으로 예시되는 인터루킨에는 전반에 걸쳐 기재된 것, 예를 들어 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23, 적합하게는 IL-2, IL-12 및 IL-15가 포함된다.

[0069] 예시 양태에서, 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 바이러스 단백질 및/또는 인터루킨을 코딩하는 핵산은 핵산 프로모터, 예를 들어 미국 공개특허공보 제2007/0065432에 기재된 바와 같은 프로모터로부터의 하류에 놓아둔다.

[0070] 본 발명은 또한, 전반에 걸쳐 기재된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 적합한 양태에서, 이러한 제약 조성물은 1종 이상의 항균제 (예: 암포테리신 B, 클로르에트라사이클린, 젠타미신, 네오마이신), 1종 이상의 보존제 (예: 벤제토늄 클로라이드, EDTA, 포름알데히드, 2-페녹시에탄올), 1종 이상의 완충제 (예: 인산염 완충제, 붕산나트륨, 염화나트륨), 1종 이상의 계면활성제 (예: 폴리솔베이트 20, 80), 하나 이상의 단백질 안정화제 (예: 알부민, 락토스, 칼륨 글루타메이트), 당, 예를 들어 슈크로스 또는 텍스트로스, 및 아주반트 (예: 수산화알루미늄, 인산알루미늄)으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 부형제를 더 포함한다. 부가의 부형제가 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 본 발명의 실시예에 용이하게 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명은 또한, 양이온성 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편), 및 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 제1 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함하는 제약 조성물을 제공하는데, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하고/연합되지만, 화학적으로 접합되지는 않는다. 추가의 양태에서, 상기 리간드는 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다. 제약 조성물은 적합하게 또한, 양이온성 리포솜, 리간드 (예를 들어, 단백질/펩티드, 항체 또는 항체 단편), 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 제2 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함하는데, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하고/연합되지만, 화학적으로 접합되지는 않는다. 추가의 양태에서, 상기 리간드는 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합될 수 있다.

[0072] 이러한 특정 양태에서, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자와 동일한 조성물로 전달되는데, 동일한 양이온성 리포솜과 피막화/연합되는 것이 아니라 2개 (이상)의 상이한 양이온성 리포솜과 연합된 다음, 동일한 조성물 (즉, 함께 혼합된 2개의 상이한 리포솜 집단)으로 전달된다. 기타 양태에서, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자는 동일한 플라스미드 벡터 내에 함께 함유될 수 있다. 본 발명은 또한, 포유동물에게 2개의 별개의 면역리포솜 조성물 (하나는 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하고, 다른 하나는 인터루킨을 코딩하는 핵산을 포함한다)을 투여하는 것을 포괄한다. 적합한 지질, 표적화 분자 및 핵산 분자의 예, 및 본 발명의 제약 조성물에 사용하기 위한 상기 분자의 비는 본원 전반에 걸쳐 기재되어 있다.

[0073] 본 발명은 또한, 하나 이상의 활성제를 포유동물의 항원 제시 세포 (APC)에 전달하는 방법을 제공한다. 적합한 양태에서, 이러한 방법은 양이온성 리포솜, 항-트랜스페린 수용체 단일 쇠 Fv (TfRscFv), 및 하나 이상의 활성제를 포함하는 TfRscFv-표적화 양이온성 면역리포솜 복합체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는데, 이러한 TfRscFv는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하고/연합되지만, 화학적으로 접합되지는 않는다. 추가의 양태에서, TfRscFv는 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합된다. 상기 본 발명의 방법을 사용하여 활성제를 신체의 모든 기관 또는 조직, 예를 들어 간, 림프절, 소화관 및/또는 기도 내에 위치한 APC로 전달할 수 있다. 적합하게는, APC가, 예를 들어 전문적 또는 비-전문적 APC일 수 있다. "전문적 APC"는 그의 표면 상에 MHC 부류 II 분자를 발현하는 것을 지칭한다.

[0074] 적합한 양태에서, 전달되는 작용제는 핵산 분자이지만, 기타 작용제, 예를 들어 화학적 작용제 (소분자 포함)



뿐만 아니라 펩티드 및 단백질을 전달할 수도 있다. 작용제는 전문적 APC 뿐만 아니라 비-전문적 APC로 전달할 수 있는데, 이에겐 간, 비장, 림프절, 소화관 및/또는 기도 내에 위치한 APC가 포함된다. 예시 양태에서, 전달되는 작용제는 하나 이상의 바이러스 단백질 (예를 들어, HIV 바이러스 단백질, 에볼라 바이러스 단백질, 인플루엔자 바이러스 단백질, SARS 바이러스 단백질, 조류 독감 바이러스 단백질 또는 두창 바이러스 단백질) 및/또는 하나 이상의 인터루킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 또는 IL-23)을 코딩한다.

[0075]

추가 양태에서, 본 발명은 포유동물에게 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 적합한 양태에서, 양이온성 리포솜 복합체는 양이온성 리포솜; 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하고/연합되지만, 화학적으로 접합되지는 않는 리간드; 양이온성 리포솜과 연합된 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자; 및 양이온성 리포솜과 연합된 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함한다. 추가 양태에서, 리간드는 리간드 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편) 상의 항기와 리포솜 상의 기, 예를 들어 말레이미드 기 간의 화학적 접합을 통하여 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합된다. 예시되는 리간드가 본원 전반에 걸쳐 기재되어 있고, 이에겐 갈락토스, L-37pA, 항체 및 항체 단편 [예: scFv 항체 단편, 예를 들면 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 Fv (TfRscFv)]이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0076]

본원에 사용된 바와 같은, "바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는" 것이란 이로 인해 포유동물 (예: 모든 포유동물, 예를 들면 인간)의 면역계가 촉발되어 바이러스 항원의 존재를 확인 및 제거하거나 이러한 존재에 대해 반응하는 과정을 지칭한다. 항원에는 이에 대하여 항체를 생성시킬 수 있는 모든 바이러스성 물질이 포함된다. 특별한 바이러스 항원(들)에 대한 면역 반응을 유도시킴으로써, 포유동물은 예방 접종되고, 상기 항원에 의한 추가의 모든 타협으로 인해 항원이 반응하고 제거될 것이다.

[0077]

그에 대한 면역 반응이 생성될 수 있는 바이러스 항원의 예에는 당해 분야에 공지된 모든 바이러스 항원이 포함되는데, 이에겐 본원 전반에 걸쳐 기재된 항원, 예를 들어 간염 (A형, B형 또는 C형) 바이러스, 인플루엔자 바이러스, HIV 바이러스, 에볼라 바이러스, SARS 바이러스, 조류 독감 바이러스, 두창 바이러스 등과 연관된 항원이 포함된다. 양이온성 리포솜이 APC를 표적화할 수 있기 때문에, 면역 반응을 프라이밍하는 데에 관여한 세포에 핵산 분자를 직접적이고도 효율적으로 전달할 수 있으므로, 포유동물에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 매우 효율적이면서 강력한 방법을 제공할 수 있게된다.

[0078]

본 발명의 치료 방법에 활용된 핵산 분자에 의해 발현될 수 있는 적합한 바이러스 단백질은 본원 전반에 걸쳐 기재되어 있고, 이에겐 HIV 바이러스 단백질, 에볼라 바이러스 단백질, 인플루엔자 바이러스 단백질, SARS 바이러스 단백질, 조류 독감 바이러스 단백질 및 두창 바이러스 단백질이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 것으로 예시되는 인터루킨에는 본원 전반에 걸쳐 기재된 것, 예를 들어 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23이 포함된다. 예시 양태에서, 본 발명의 각종 방법에서 전달된 리간드-표적화 양이온성 리포솜은 양이온성 리포솜과 연합된  $K[K(H)KKK]_5-K(H)KKC$  (HoKC) (서열 1) 펩티드를 포함하는 펩티드를 더 포함한다.

[0079]

부가 양태에서, 본 발명은 포유동물에게서 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 적합하게, 상기 방법은 포유동물에게 양이온성 리포솜 복합체를 투여하는 단계를 포함하는데, 이러한 양이온성 리포솜 복합체는 양이온성 리포솜; 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않은 리간드; 양이온성 리포솜과 연합된 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자; 및 양이온성 리포솜과 연합된 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함한다. 투여 방법에는 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이들은 볼루스 또는 주입체로서 투여할 수 있다. 부가 양태에서, 리간드는 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 각종 방법을 이용하여 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합시킬 수 있다.

[0080]

본 발명의 방법을 이용하여 치료 또는 예방할 수 있는 바이러스성 질환의 예에는 당해 분야에 공지된 모든 바이러스성 질환, 예를 들어 본원 전반에 걸쳐 기재된 것, 예를 들면 간염 (A형, B형 또는 C형), 인플루엔자, HIV, 에볼라, SARS, 조류 독감, 두창 등이 포함된다. 따라서, 포유동물에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 것 이외에도, 본 발명은 또한, 포유동물에게서 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 이에겐 최근에 (예를 들어, 약 1년 미만, 적합하게는 약 6개월 미만, 또는 약 1개월 미만) 감염된 포유동

물 뿐만 아니라 만성 감염증 포유동물 (예를 들어, 1년 이상 동안 감염된 포유동물)가 포함된다.

- [0081] 본 발명의 치료 또는 예방 방법에 사용하는 것으로 예시되는 리간드는 본원 전반에 걸쳐 기재되어 있고, 이에 는 각종 펩티드 및 단백질, 예를 들어 트랜스페린, 갈락토스, L-37pA, 항체 및 항체 단편 [예: 단일쇄 Fv 항체 단편, 예를 들어 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 Fv (TfRscFv)]이 포함된다. 본 발명의 각종 치료 및 예방 방법을 이용하여 전달된 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있는 것으로 예시되는 바이러스 단백질 및 인터루킨은 본원 전반에 걸쳐 기재되어 있다. 예시 양태에서, 본 발명의 각종 치료 및 예방 방법에서 전달된 리간드-표적화 양이온성 리포솜은 양이온성 리포솜과 연합된  $K[K(H)KKK]_5-K(H)KKC$  (HoKC) (서열 1) 펩티드를 포함하는 펩티드를 더 포함한다.
- [0082] 본 발명은 또한, 본원 전반에 걸쳐 기재된 각종 방법에 의해 제조된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 또한, 포유동물에서 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하는 방법은 본 발명의 각종 방법/공정에 의해 제조된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다. 이들 방법에 사용하기 적합한 리간드, 리포솜 및 핵산이 본원 전반에 걸쳐 기재되어 있다.
- [0083] APC로의 전달 뿐만 아니라 면역 반응을 유도시키는 방법 및 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함 한, 본 발명의 각종 치료/예방 방법에서, 본 발명의 각종 리포솜 복합체는 목적하는 어떠한 경로를 통해서도 투여할 수 있다. 예시되는 전달 경로에는 정맥내, 경구, 국소, 흡입, 근육내 주사, 종양내 주사, 피내 주사, 경피 주사, 피하 주사, 복강내 주사, 비내 주사, 안내 주사 또는 비말, 두개내 주사, 기관내 주사 (예: 간내) 또는 기타 경로, 예를 들어 서방출 임플란트 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 통한 투여 경로가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이들을 볼루스 또는 주입체로서 투여할 수 있다.
- [0084] 본 발명은 또한, 본 발명의 각종 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 제약 조성물은 또한, 하나 이상의 부형제, 예를 들어 1종 이상의 항균제, 1종 이상의 보존제, 1종 이상의 완충제 및/또는 1종 이상의 계면활성제를 더 포함할 수 있다.
- [0085] 부가의 양태에서, 본 발명은 또한, 둘 이상의 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 예를 들어, 이러한 조성물은 양이온성 리포솜, 리간드 및 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 제1 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 포함할 수 있다. 적합한 양태에서, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만 이에 화학적으로 접합되지는 않는다. 기타 양태에서, 리간드는 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합된다.
- [0086] 상기 조성물은 양이온성 리포솜, 리간드 및 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 제2 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 더 포함할 수 있다. 적합하게, 이러한 리간드는 양이온성 리포솜과 직접적으로 복합체를 형성하지만, 화학적으로 접합되지는 않지만, 기타 양태에서, 리간드는 양이온성 리포솜과 화학적으로 접합된다.
- [0087] 다음에 제시된 실시예가 C형 간염 바이러스성 (HCV) 단백질을 전달하기 위한 면역리포솜 복합체의 생성, 및 HCV 감염된 포유동물의 예방적 백신 접종/치료를 기재하고 있긴 하지만, 모든 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 본 발명의 각종 방법에 활용할 수 있고 본원 전반에 걸쳐 기재된 면역리포솜 복합체에 연합/피막화할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 핵산 분자에 의해 코딩되는 최종 바이러스 단백질은 본 발명의 면역리포솜 복합체를 형성할 수 있는 능력에 어떠한 영향력도 미치지 않는다. 간단하게, 핵산 분자의 음전하는 핵산 분자가 양이온성 면역리포솜에서 연합/피막화될 수 있도록 해주는 것으로 여겨진다. 따라서, 본 발명은 HCV 단백질의 전달로만 제한되지 않고, 대신 모든 바이러스 단백질 및/또는 인터루킨(들)을 코딩하는 모든 핵산 (예: 플라스미드, 벡터)의 전달을 포괄한다.
- [0088] 또한, 상이한 바이러스 단백질을 코딩하는 몇 가지 상이한 핵산을 상기 면역리포솜 복합체와 피막화/연합시킬 수 있으므로, 그 자체로서 본 발명은 단일 리포솜 시스템 또는 다중의 상이한 리포솜 복합체를 사용하여 광범위한 바이러스성 감염증을 예방 접종/치료하기 위한 방법 및 복합체를 제공한다.
- [0089] 본 발명의 범위 또는 그의 모든 양태를 벗어나지 않고서도 본원에 기재된 방법 및 적용에 대한 기타 적합한 변형 및 적응이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게는 용이하게 명백할 것이다. 본 발명이 상세히 기재되긴 하였지만, 본 발명은 예시 목적으로 본원에 포함되고 본 발명을 제한하지 않는 다음 실시예를 참고로 하여 보다 명백하게 이해될 것이다.

- [0090] [실시예 1]
- [0091] 양이온성 리포솜에 의거한 C형 간염 바이러스 (HCV) 백신 접종 및 치료 시스템의 제조 및 사용
- [0092] HCV 재감염으로부터의 보호가 침팬지에서의 천연 감염에 의해 유도되지 못한다는 기존의 도그마와는 달리 [참고: Farci P., et al., *Science* 258: 140 (1992); Prince A.M., et al., *J. Infect. Dis.*, 165: 438-443 (1992)], 재감염이 발생한다 할지라도, 회복된 인간 및 침팬지에서는 재감염시 바이러스성 감염을 즉시 제어하고 신속하게 제거시키는 기억 면역 반응이 존재한다는 것이 명백하다. HCV로부터 자발적으로 회복한 후, 탐지 가능한 HCV-항체가 부재하는 많은 증례에서도 수 십년 동안 휴지기 HCV-특이적 기억 T 세포가 말초혈에서 탐지될 수 있다 [참고: Takaki A., et al., *Nat. Med.*, 6:578-582 (2000)]. 회복된 침팬지에서 입증된 바와 같이, HCV-특이적 세포성 면역 반응이 또한 간에서 영속되고, 이는 재감염시 보호 면역을 매개한다 [참고: 예를 들어, Bassett S.E., et al., *Hepatology*, 33: 479-1487 (2001)]. 두 번째 감염의 지속 기간은 짧은데, 이는 초기 감염과 비교해서 혈액 및 간에서의 바이러스성 역가가 감소되고 알라닌 아미노 트랜스퍼라제 수준 (ALT)에 의해 표시된 바와 같이 간내 염증이 저하된다 [참고: Bassset et al.]. 환자 연구로부터, HCV 감염을 신속하게 제어하고 제거할 수 있는 유사한 기억 반응이 기존의 노출 후 인간에게 또한 존재한다는 징후가 있다 [참고: Mehta S.H., et al., *Lancet*, 359: 1478-1483 (2002)]. 본원 전반에 걸쳐 기재된 바와 같이, 본 발명은 예방과 치료 둘 다를 위해 간에서의 APC를 포함하지만 그에 제한되지 않는 APC로 효율적으로 전달된 HCV의 비-구조적 단백질에 관심을 집중한, T-세포에 의거한 백신을 제공한다. 간은 HCV 복제의 주요 부위이므로, 간에서 면역 반응을 유도시키는 것은 천연 감염 동안 유도된 면역 반응을 모방하고 있고, 시험감염시 바이러스의 보호 또는 신속한 제거를 유발시킨다.
- [0093] C형 간염 바이러스 (HCV)는 단일 가닥의 양성 센스 RNA 게놈을 수반한 외피 보유 바이러스이다. RNA는 길이가 약 9.6 kb이고 약 341개 염기 5' 비번역 영역 (NTR), 모든 바이러스-특이적 단백질 (약 3011개 아미노산)을 코딩하는 장 개방 리딩 프레임, 및 3' NTR로 이루어진다. 게놈 RNA의 번역은 캡 (cap)-비의존적이고, 내부 리보솜 유입 부위로서 기능하는 5'NTR에 의해 매개된다. 이로써 생성되는 폴리단백질을 2개의 숙주 및 2개의 바이러스성 프로테아제에 의해 번역과 동시에 및 번역 후에 절단시켜 다음 생성물을 생성시켰다: NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. 구조적 단백질 (C, E1, 및 E2)은 N-말단에 위치하고; 비구조적 (NS) 성분은 나머지 부분에서 코딩되었다 [참고: Major M. E., et al., *Hepatitis C Viruses*. In: *Fields Virology*, Knipe D. M. and Howley P.M. (eds.), Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1127-1161 (2001); 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다]. 모든 RNA 바이러스에 관해서는, HCV RNA 복제가 변이성이어서, 변이체가 지속적으로 발생된다. 이러한 변이체는, 예를 들어 면역 반응에 의해 발현된 바와 같은 선별 압력에 신속하게 적응될 수 있는 "유사종" 또는 풀을 제공한다. 이러한 가변성은 HCV 생존과 진화에 중요한 것으로 예상되지만, HCV 분자 생물학, 발병 기전, 면역 반응 및 궁극적으로 백신 개발에 관한 정확한 연구를 어렵게 만들기도 한다.
- [0094] HCV의 전파는 전형적으로, 비경구 경로에 의해 이루어지지만, 경점막 전파, 예를 들어 성행위 및 모성 신생아 전파가 발생하기도 한다. 만성 C형 간염 치료에 있어서 상당한 진보가 있어 왔다. 페길화 IFN- $\alpha$  및 리바비린 (Ribavirin)을 이용한 현재의 요법은 증례의 대략 50%에서 HCV 감염을 제거시켜 주지만, 이러한 치료는 여전히 비용이 매우 많이 들고, 6 내지 12개월의 치료 기간이 요구되며, 심각한 부작용 위험이 높다. 미국과 전세계적으로 HCV 관련 질환을 궁극적으로 제어하는 데에는 예방적 백신이 중요하다. 면역학적 치료 접근 방식이 또한 필요하다.
- [0095] 키메라 인간 간을 수반한 SCID 마우스 모델 개발에도 불구하고, 여전히 침팬지가 HCV 감염에 대해 유일하게 확립된 동물 모델이다 [참고: Grakoui A., et al., *Hepatology*, 33:489-495 (2001)]. 그 자체로서, 이는 실험용 백신을 투여할 수 있고 그의 유효성을 평가할 수 있는 유일한 모델이다. 침팬지 면역계에 관여한 많은 단백질이 인간 오르토토크 (orthologue)와 동일하거나 극히 밀접하게 관련되기 때문에, 탐지에 필요한 시약은 상호 교환 가능하다. 비용이 많이 들기 때문에, 가망이 있는 모든 HCV 백신 접근 방식을 침팬지에서 시험하는 것은 가능하지 않다. 현재까지의 백신 연구는 정상적인 면역 적격한 마우스를 사용하여 수 많은 면역 전략을 시험하여 왔다 [참고: 예를 들어, Forns X., et al., *Vaccine*, 17:1992-2002 (1999)]. 인간 부류 I MHC 분자를 발현하는 트랜스젠릭 (transgenic) 마우스가 특이적 HCV 에피토프 분석 및 대리 보호 시스템에 사용되어 왔다 [참고: Qiao M., et al., *Hepatology*, 37:52-59 (2003)]. 따라서, 백신 전략은 지금까지 재조합 단백질, 바이러스성 벡터, 바이러스-유사 입자 및 DNA에 의거한 면역에 기초하였다. 급성 감염증의 제거에 있어서 HCV NS3에 대한 면역 반응이 연루되었다는 강력한 증거가 있다 [참고: Diepolder H. M., et al., *J. Virol.*, 77:6011-6019 (1997)]. 이러한 항원은 현재 모든 HCV T 세포 백신의 중요한 성분으로 간주되고 있다. NS3 단백질을 발현하는 구조물에 NS4A를 봉입시키면 마우스에서의 발현이 보다 우수해지고 면역 반응이 개선되는 것으로 보고되었다

[참고: Frelin L., et al., *Gene Ther.*, 10:686-699 (2003)]. 광범위하게, 다중-특이적 T 세포 반응이 또한 HCV 감염증 제거에 있어 중요한 것으로 확인되었기 때문에, NS5A 및 NS5B 단백질은 중요한 T 세포 백신 성분일 것이다.

[0096] HCV는 미국 만성 간 질환 환자의 40 내지 60%와 연관이 있고, 이들 중 1/3은 진행성 섬유증 및 간경변으로 발전하게 된다 [참고: Liang T.J., et al., *Ann. Intern. Med.*, 132:296-305 (2000)]. C형 간염은 현재 일본에서 B형 간염을 제치고 간세포성 암종 (HCC)의 주요 원인이며, CDC에 따르면 HCV-관련 간경변 및 암으로 인해 미국에서만 매년 8,000명 내지 10,000명이 사망한다. HCV-관련 HCC 기전은 공지되어 있지 않다. 이는 주로, 수년간의 감염 기간에 걸쳐 만성 면역-매개된 간세포성 손상과 재생에 의해 유도되는 것으로 추측된다. HCV의 코어 유전자 생성물이 수 많은 세포성 단백질과 상호 작용하는 것으로 밝혀졌다. 이는 핵 국제화 신호를 함유하고 있고, RNA 결합 활성을 지니고 있고, 세포에서 다수 기능, 예를 들어 트랜스-활성화 (transactivation) 및 억제제를 수행하는 것으로 밝혀졌다 [참고: Matsumoto M., et al., *J. Virol.*, 77:1301-1309 (1997)]. HCV 코어의 트랜스-활성인자 또는 억제인자 기능을 확인하는 이들 연구는 생물학적 수준 보다 수 자리 크기 정도 높은 시험관내 발현 수준을 사용하였다. 그러나, 수 십년 동안 이러한 단백질의 저 수준 발현으로 인해, 감염된 세포에서 부작용이 유발될 수 있고, 이는 HCC 진행에 있어 일정 역할을 할 수 있다. HCC와 싸우기 위한 가장 좋은 수단은 예방, 조기 검진 및 보다 우수한 치료이다. 따라서, C형 간염 바이러스 감염을 예방함으로써, HCC를 예방할 수도 있다.

[0097] HCV 복제를 위한 주요 저장고는 간인 것으로 여겨지고, 이는 감염된 개체에서의 간 병리상태와 일치하지만, HCV 복제를 뒷받침하는 특이적 세포 유형은 아직까지 확인되지 않고 있다. 정상적인 간은 면역 반응을 매개하는 데에 있어서 중요한 역할을 한다. 대부분의 장기와는 달리, 간에서의 항원 제시는 타고난 본래의 T 세포의 활성화를 유발시킬 수 있다는 명백한 증거가 있다 [참고: Bertolino P., et al., *Cell Biol.*, 80:84-92 (2002)]. 간으로의 유입시, 혈액 내의 항원은 먼저, 동모양 세포 집단, 간 동모양 상피 세포 (LSEC) 및 쿠퍼 세포와 접촉하게 된다. 항원이 간에 전달되면, 가능하게는 이들 동일한 세포에 의해 T 세포가 국소적으로 활성화되는데, 이들 둘 다는 항원 제시 세포로서 작용하는 것으로 밝혀졌다. 항원이 간에 제시되면 T 세포 프라이밍 또는 T 세포 관용이 발생할 수 있다.

[0098] (미국 공개특허공보 제2003/0044407호 및 미국 특허출원 제11/520,796호에서와 같이) 암 치료 및 종양 표적화를 위해 양이온성 면역리포솜을 사용하는 것과는 달리, 본 실시예는 효율적으로 흡수되고 (수용체 매개된 세포내 이입 및 증강된 엔도솜성 방출) 항원 제시될 HCV 단백질을 발현하는 DNA를, 이들이 간을 포함한 신체 내의 어느 부위에서 존재하든지 간에 T 세포에 전달하기 위해 TfRscFv-리포솜 (HK 펩티드를 수반하거나 수반하지 않음)을 활용한다.

[0099] TfRscFv의 존재는 양이온성 리포솜 복합체를 세포 내로 효율적으로 이동시키기 위한 수용체-매개된 세포내 이입을 제공하지만, HK 펩티드는 DNA를 세포질 내로 엔도솜성 방출시키는 것을 (이것이 반드시 요구되지는 않는다) 증강시켜 준다.

[0100] 간세포에 대해 생체내 사용하는 데에 가장 적당한 제형을 결정하기 위해 시험관 내에서 몇 가지 리포솜 복합체를 이용한 비교 연구를 수행하였다. 2개의 간세포-특이적 리간드인 갈락토스 (GAL) (아시알로당단백질 수용체와 결합한다) 및 L-37pA (HCV에 대한 추정상 수용체인 스캐빈저 수용체 SR-B1과 결합한다)를 시험하였다. 이를 변형되지 않은 리포솜 제형 및 트랜스페린 (Tf) 수용체의 단일쇄 Fv 단편 (TfRscFv)으로 변형시킨 복합체와 비교하였다. 이러한 분석에 3개 지질 유형을 사용하였다: 지질 A (DOTAP:DOPE, 1:1 몰비); 지질 D (DOTAP:Chol, 1:1 몰비); 및 지질 G (DOTAP:DOPE:Chol, 1:1:1 몰비). 3가지 샘플 제조 방법을 비교하였다: 방법 A: DNA를 리간드-변형된 리포솜과 직접적으로 혼합하는 예비-코팅 방법. 방법 B: DNA를 리포솜과 혼합하여 양이온성 지질/DNA 코어 (리포플렉스)를 형성시킨 후, 리간드를 리포플렉스의 표면과 접합시키는 코팅 후 방법. 방법 C: DNA를 리포솜 또는 히스티딘화 올리고리신 (HoKC) 펩티드 변형물을 수반한 리포솜과 혼합하여 리포플렉스를 형성시킨 후, 특이적 리간드를 수반하는 음이온성 (PSchol) 또는 중성 (PCchol) 리포솜을 가하여 상기 리포플렉스를 피막화하는 방법.

[0101] A. 방법

[0102] 1. 복합체 형성

[0103] 화학적 접합에 의한 복합체 형성

[0104] 리포솜의 표면과 직접 화학적으로 접합되는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 양이온성 면역리포솜을 제조하기



위한 예시 방법은 미국 특허출원 제09/914,046호 (2001년 10월 1일자로 출원됨) (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. 예를 들어, 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트-DOPE (MPB-DOPE) (공급처: Avanti Polar Lipids)가 상기 언급된 7개 리포솜 제형 내에 총 지질의 5 내지 8% 몰로 포함된다. MPB-리포솜은 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조한다. 예를 들어, 문헌 [참고: Campbell MJ, *Biotechniques* 1995 Jun; 18(6): 1027-32]에 기재된 바로부터 변형된 에탄올 주사 방법을 본 발명에 사용할 수 있다. 간략하게 언급하면, 모든 지질을 에탄올에 가용화시키고 혼합하며, 해밀톤 (Hamilton) 주사기를 이용하여 소용돌이 치는 50 내지 60℃ 정제수 내로 주사하였다. 이 용액을 10 내지 15분 더 와동시킨다. 최종 농도는 1 내지 2 mM 총 지질이다. 1 M HEPES, pH 7.5 (pH 7.0-8.0)을 10 내지 20 mM의 최종 농도에 가한다. 말레이미드 기는 pH >7의 수성 용액에서 안정적이지 않기 때문에, 리포솜은 물 (pH 5-6.5)에서 제조해야 한다. 1 M HEPES 완충액, pH 7.0-8.0을 이용하여 scFv-SH와 연결시키기 전에 pH 7.0-8.0으로 조정하여 코팅 후 반응을 촉진시킬 수 있다.

[0105]

scFv-SH를 MPB-리포솜에 약 1:1 내지 약 1:100, 적당하게 약 1:10 내지 약 1:50 (w:w), 보다 적당하게 약 1:20 내지 약 1:40의 단백질/지질 비로 가한다. 이 용액을 실온 하에 30분 동안 온화하게 회전 (약 20 내지 30 RPM)시키므로써 혼합하여 scFv-Lip를 생성시킨다. 이러한 scFv-Lip를 정제하지 않고 사용하지만, 이를 세파로스 CL-4B 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 플라스미드 DNA를 물에 희석시키고 scFv-Lip에 약 0.5:1 내지 약 1:40 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ ), 적당하게 약 1:5 내지 약 1:20 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ ), 예를 들어 약 1:10 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ )의 DNA/지질 비로 가하여 scFv-Lip-DNA 복합체를 생성시킨다. 이러한 scFv-Lip-DNA를 정제하지 않고 사용하지만, 이를 세파로스 CL-4B 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 80 내지 100%의 scFv가 리포솜과 접합하는 것으로 예상할 수 있다.

[0106]

단순 혼합에 의한 복합체 형성

[0107]

접합된 TfRscFv-면역리포솜은 그의 면역학적 활성을 보유하고 있다. cys-TfRscFv는 리포플렉스와 화학적으로 접합할 수 있고 [참고: 미국 특허출원 제09/914,046호 (2001년 10월 1일자로 출원됨)], 시험관내 및 생체 내에서 인간 전립선 종양 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있는 것으로 또한 확립되었다. 각종 화학적 접합 방법을 이용하여 단일쇄 항체 단편을 리포솜에 부착시키는 것은 통상적인 실시이다. 화학적 접합 대신, cys-TfRscFv를 양이온성 리포솜 (환원 가능한 기, 예를 들어 말레이미드 DOPE 또는 모든 환원 가능한 기를 수반한 어떠한 지질도 함유하지 않는다)과 단순히 혼합하면 면역학적으로 활성인 복합체가 형성되는 것으로 또한 결정되었는데, 리간드는 링커 또는 화학적 접합 분자를 사용하지 않고서도 리포솜과 직접적으로 결합되고, 이는 여전히 종양 세포와 효율적으로 결합하여 이를 형질감염시킨다 [참고: 예를 들어, 미국 공개특허공보 제 2003/0044407호 (이에 기재된 조성물 및 방법을 포함한 전문이 본원에 참고로 도입된다)].

[0108]

cys-TfRscFv-면역리포솜 복합체는 cys-TfRscFv를 리포솜 조성물 A와, 혼합 복합체 중에서 본원 전반에 걸쳐 기재된 범위의 단일쇄 단백질 대 리포솜 및 DNA 대 nmole (또는  $\mu\text{g}$ ) 총 지질의 규정 비로 혼합함으로써 제조한다. 다음에 기재된 복합체의 제조는 다음 일반적 과정에 따랐다. 적당한 양의 2 mM 리포솜 (상기 언급된 A-H)을 목적하는 용적을 제공하는 데에 요구되는 물 (예: DI 수)와 혼합하고, 혼합을 위해 전도시킨다. 이러한 리포솜-물 혼합물에 적당한 양의 cys-TfRscFv를 가하여 목적하는 비를 수득하고, 약 1초 내지 약 2분 동안 온화하게 전도시킴으로써 혼합한다. 이 혼합물을 실온 하에 약 10분 내지 약 20분 동안 유지시킨다 (대략 5분 후에 5 내지 10초 동안 온화하게 전도시킨다). 이와 동시에, 적당한 양의 DNA를 약 1초 내지 약 2분 동안 전도시킴으로써 목적하는 용적을 제공하는 데에 요구되는 물과 혼합한다. 전형적으로, 시험관내 검정에 사용하기 위해서는, DNA의 농도가 웰당 약 0.01  $\mu\text{g}$  내지 약 2  $\mu\text{g}$ 의 범위인 것이 바람직하고; 생체 내에서 사용하는 경우에는, 1회 주사당 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 100  $\mu\text{g}$ 의 DNA를 제공하는 것이 바람직하다. DNA 용액을 cys-TfRscFv-리포솜 용액에 신속하게 가하고, 이 혼합물을 약 1초 내지 약 2분 동안 전도시킨다. 최종 혼합물을 실온 하에 약 10분 내지 약 20분 동안 유지시키는데, 대략 5분 후에 5 내지 10초 동안 온화하게 전도시킨다. 생체 내에서 사용하기 경우에는, 50% 텍스트로스 또는 50% 슈크로스를 1 내지 20% (V:V), 적당하게 5 내지 20% (V:V)의 최종 농도에 가하고, 약 1초 내지 약 2분 동안 온화하게 전도시킴으로써 혼합한다. 1:30 (cys-TfRscFv:리포솜, w:w) 및 1:14 ( $\mu\text{g}$  DNA:nmole 총 지질)의 적합한 비의 구체적 예는 다음과 같다: 최종 용적 800  $\mu\text{l}$  중의 40  $\mu\text{g}$ 의 DNA의 경우에는, 183  $\mu\text{l}$  물을 280  $\mu\text{l}$ 의 2 mM 리포솜 용액과 혼합한다. 34  $\mu\text{l}$ 의 cys-TfRscFv (0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 수반함)를 가한다. 183  $\mu\text{l}$  물을 40  $\mu\text{l}$ 의 1  $\mu\text{g}/\text{l}$  DNA와 혼합한다. 80  $\mu\text{l}$ 의 50% 텍스트로스를 최종 단계로서 가한다.

[0109]

본 발명의 방법에 의해 제조된 최종 복합체의 크기는 말베른 ZETASIZER® 3000 또는 말베른 ZETASIZER® NANO-ZS를 사용하여 동적 광산란시킴으로써 측정된 바와 같이 양성 제타 전위를 수반한 약 100 내지 400 nm이다. 이러

한 크기는 중앙 모세관 층을 효율적으로 관통하여 중앙 세포에 도달하기에 충분히 작고, 또한 모세관 층을 효율적으로 관통하여 표적 APC 세포에 도달하기에 충분히 작다.

[0110] 2. HCV-특이적 항원에 대한 면역 반응 평가

[0111] 표적 HCV 항원

[0112] 백신 연구에 포함된 HCV 항원은 NS3 내지 NS5B이다. 이들 서열은 유전자형 1a H77 균주로부터 유래된다 [참고: Major M. E., et al., Hepatitis C Viruses. In: Fields Virology, Knipe D. M. and Howley P.M. (eds.), Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1127-1161 (2001)]; 이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다]. 회복된 동물에게서 상기 항원 단독에 대한 T 세포 반응 증강으로 인해 일시적이고 임상적으로 미미한 수준의 감염이 발생한다 (하기 참고). CMV 프로모터의 제어 하에 항원을 발현하는 플라스미드의 경우에는, 293-T 및 Huh7.5 세포를 사용하였다. 아데노바이러스 벡터의 경우에는, AD-293 세포주를 사용하였다. 발현은 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 및 면역형광 염색에 의해 결정하였다.

[0113] 아데노바이러스 벡터

[0114] ADEASY<sup>®</sup> 시스템을 사용하여 HCV 유전자를 발현하는 인간 아데노바이러스 혈청형 5가지 재조합체 (공급처: Stratagene, CA)가 본 발명에 적합하게 사용되었다. 이러한 벡터는 E1 및 E3 유전자의 결실에 의해 복제 결함성이 되었다. 관심있는 유전자는 이. 콜라이에서의 재조합을 통하여 아데노바이러스 주체 내로 도입한다. 이어서, 재조합 플라스미드를 AD-293 세포 내로 형질전환시키는데, 여기서 결실된 바이러스성 어셈블리 유전자를 보충시켜 바이러스 입자를 생성시킨다. 아데노바이러스는 또한, HCV 요법에 대해 관심을 끄는 바이러스성 벡터인데, 이는 이러한 바이러스가 간에서 트랜스-유전자 (transgene)를 효율적으로 발현할 수 있었기 때문이다.

[0115] 인터루킨-12 (면역 증강)

[0116] 인터루킨-12 (IL-12)는 IFN- $\gamma$  생성을 유도시키고, Th2 세포에 비해 Th1의 분화를 선호하며, 선천성 저항을 적응 면역과 연계시켜 준다. DC 및 포식세포는 감염 동안 병원체에 반응하여 IL-12를 생성시킨다. 면역을 개선시키고 효율적인 Th1-유형 반응을 자극하기 위해, IL-12를 발현하는 플라스미드를 양이온성 면역리포솜 제형에 포함시킨다. 마우스 IL-12와 인간 IL-12 둘 다를 발현하는 플라스미드는 마우스와 영장류 연구간의 일관성을 달성하기 위해 제조하였다.

[0117] 마우스 접종

[0118] 연구는 HCV 항원을 발현하는 재조합 벡터를 이용한 DNA 프라이밍/아데노바이러스 부스팅을 포함한다. 마우스에게 0주 및 4주째에 본원에 기재된 리포솜 복합체 중의 20 내지 30  $\mu$ g의 DNA를 접종하고, 10 내지 12주째에 재조합 아데노바이러스로 부스팅하였다 [ $10^8$  감염성 단위, 피하 (s.c.)]. 이와 같이 부스팅한지 4주 후에, 간과 비장을 유동 세포계수법으로 분석하여 간에서의 T 세포의 특징을 결정한다. T 세포는 피콜 (Ficoll) 구배를 이용하여 간세포로부터 분리시킬 수 있고, 표지된 항체를 사용하여 특이적 표면 마커에 대해 염색시킬 수 있다. 대조군으로서, PBS, 리간드 결합되지 않은 리포솜/DNA 복합체, 빈 벡터를 수반하는 복합체, 근육내 (i.m.) (1 내지 50  $\mu$ g/마우스), 복강내 (i.p.), 정맥내 (i.v.), 및 피내 (i.d.) (1-50  $\mu$ g/마우스) 주사된 네이키드 DNA로 처리된 마우스 및 복합체를 근육내 또는 피내 접종한 마우스가 포함된다. 투여량과 시기를 최적화하고, 6개월에 걸쳐 간에서의 T 세포의 영속성과 회복을 평가하여 간내 T 세포 수 및 마커에 기준하여 가장 우수한 시스템을 결정한다. 트랜스페린 수용체가 수지상 세포 상에 발현되고 복합체 형성된 DNA가 수용체-매개된 세포내 이입에 의해 흡수되기 때문에, scL-HCV 또는 scLHK-HCV 복합체의 근육내 및/또는 피내 접종이, 네이키드 플라스미드 DNA 보다 더 우수한 전신 반응을 유발시키는 것으로 예상된다. T 세포 집단은 CD45RA, CD62L, CD27 및 CCR7의 발현을 기준으로 하여 확인할 수 있다. IL-7R $\alpha$ 은 단명하는 효과기 세포를 기능성 기억 세포로 발전되는 것과 구별시켜 줄 수 있는 유용한 마커를 제공한다. 이들 마커를 일차 마우스 연구에 사용하여 장기간 면역을 확립시킬 수 있는 후보 백신의 잠재력을 분석한다. 침팬지에서 HCV를 제거한 후 간에서 기억 CD8+ T 세포가 선택적으로 체류한다는 명백한 증거가 있는데, 이는 HCV 제거 6개월 후의 혈액과 비교해서 간에서 약 10배 더 높은 수준이다.

[0119] 비장 및 간내 T 세포의 특이성을 시험관내 면역검정에 의해 평가한다. 초기에는 정제된 HCV 항원 또는 중복 18량체 펩티드를 이용한 엘리스팟 검정을 사용하여 IFN- $\gamma$  또는 IL-4를 분비하는 세포를 분석한다. 완전 단백질 [공급처: Mikrogen (Germany)] 및 면역시킨 마우스의 비장으로부터 단리된 세포를 이용하여 정제 검정을 또한 수행한다. HLA-A2 트랜스제닉 마우스를 활용한다. 이들 마우스는 HLA-A2 MHC 분자를 발현하고, HLA-A2 에피토

프를 제시할 수 있다. 이들 트랜스제닉 마우스는 BALB/c 마우스에 대해 사용된 바와 동일한 프로토콜을 사용하여 면역시킬 수 있지만, HLA-A2 일배체형에 의해 인식된 펩티드를 면역학적 시험에 사용할 수 있다. 이들 분석의 경우에는, 상기 일배체형에 대해 특이적인 NS5A 및 NS5B에 대해 확인된 HLA-A2 사량체 및 에피토프를 사용한다. 간 유래된 세포를 실온 하에 또는 얼음 상에서 30분 동안 FACS 완충액 (칼슘을 수반하지 않는 PBS 중의 0.1% 나트륨 아지드, 1% BSA) 중에서 표면 마커 (CD4, CD8)에 대해 특이적인 FITC 표지된 항체 및 사량체-피코에리트린 (PE) 제시 특이적 펩티드로 염색한다. 사멸 세포를 배제시키기 위해 7AAD (공급처: BD Pharmigen)를 이용한 분석을 위한 소프트웨어 셀레스트 (Cellquest) (공급처: Becton Dickinson)를 사용하여 FACS-칼리버 (Calibur) (공급처: Becton Dickinson) 상에서 현상을 획득한다. 타고난 본래의 또는 모의-접종된 마우스로부터 유래된 T 세포를 사용하여 비-특이적 배경 염색을 결정한다. 클로닝하기 위해, 림프구를 항원 자극시키고 감마-조사된 동계 APC + IL-2 및 IL-7과 함께 제한된 희석율로 공동-배양한 다음, HCV 특이적 증식을 알아보기 위해 시험하였다.

[0120]

B. 결과

[0121]

1. 리포솜 복합체를 시험관내 인간 간세포성 암종 (Hep3B) 세포로 표적화시킴

[0122]

Hep3B HCC 세포 ( $5 \times 10^4$ )를 24 웰 디쉬에 시딩하고, 포유동물 프로모터의 제어 하에 루시페라제 유전자를 발현하는 상기 언급된 바와 같은 DNA 플라스미드와 복합체를 형성한 리포솜 ( $0.05 \mu\text{g}/\text{웰}$ )으로 형질감염시켰다. scL-HCV에 대해 사용된 비는  $0.33 \mu\text{g}:10 \mu\text{g}$  ( $14 \text{ nmol}$ ): $1 \mu\text{g}$  (TfRscFv:LipA:DNA)였고, scLHK-HCV에 대해 사용된 비는  $0.33 \mu\text{g}:7 \text{ nmol}:1 \mu\text{g}$  (TfRscFv:LipA-HoKC:DNA)였다. 형질감염시킨지 24시간 후, 루시페라제 검정 시스템 (공급처: Promega, Madison, WI)을 이용하여 루시페라제 활성을 결정하였다. 그 결과가 도 1에 평균  $\pm$  SD ( $n=3$ )로서 제시되어 있다. 항-트랜스페린 수용체 단일쇄 항체 단편 (sc)과 복합체 형성한 리포솜을 이용하여 효율적인 형질감염을 획득하였는데, sc/LipA 및 sc/LipA-HoKC 복합체에 대한 루시페라제 값은 각각 257,815 RLU 및 1,120,643 RLU이다 (도 1). 이를 변형되지 않은 지질 A (LipA)와 복합체 형성한 루시페라제 플라스미드에 대한 538.9 RLU/ $\mu\text{g}$  단백질의 루시페라제 값과 비교하였다. 이와 같이 HoKC 펩티드를 리포솜 복합체 내로 혼입시킨 경우에 DNA를 상기 간 세포주 내로 형질감염시키는 효율이 증가한다는 것은 전립선 및 췌장 세포주를 이용한 기존의 관찰 결과와 일치한다.

[0123]

2. 리포솜 복합체를 시험관내 일차 침팬지 간세포로 표적화시킴

[0124]

정상적인 간 세포는 간세포성 암종 세포와 동일한 수준의 수용체를 갖고 있지 않으므로, TfRscFv (sc), 갈락토스 (GAL) 및 L-37pA 리간드와 접합시킨 지질 복합체 세트를 일차 침팬지 간세포에서 비교하였다. 5만개의 일차 침팬지 간세포를 24 웰 판에 시딩하고, 루시페라제 리포터 유전자 (웰당  $0.1 \mu\text{g}$  DNA 플라스미드)를 수반하는 HoKC 펩티드를 갖거나 갖지 않는 복합체로 형질감염시켰다. sc/Lip-HoKC/DNA (라인 1-3) 및 sc/Lip/DNA (라인 7-9) 복합체를 상기 언급된 단순한 혼합 방법에 의해 제조하였는데, 즉 TfRscFv를 적당한 리포솜 (HoKC를 수반하거나 수반하지 않음)과  $0.33 \mu\text{g}$  sc:7 nmol Lip-HoKC 및  $0.33 \mu\text{g}$  sc:14 nmol Lip의 비로 혼합하고, 온화하게 수동으로 10회 전도시키거나 또는 20 내지 30 PRM으로 15 내지 60초 동안 회전시킴으로써 혼합한 다음, 실온 하에 10 내지 15분 동안 유지시켰다. 이어서, DNA를 sc/Lip-HoKC 또는 sc/Lip 혼합물에 가하고 [ $1 \mu\text{g}$  DNA:7 nmol (Lip-HoKC의 경우) 및  $1 \mu\text{g}$  DNA:14 nmol (Lip의 경우)의 비], 용액을 온화하게 수동으로 10회 전도시키거나 또는 20 내지 30 PRM으로 15 내지 60초 동안 회전시킴으로써 혼합한 다음, 실온 하에 10 내지 15분 동안 유지시켰다. 리간드 결합되지 않은 복합체를 또한 동일한 비로 대조군으로서 제조하고 (라인 4-6 및 10-12) 동일한 과정에 따랐다. L-37pA 리간드를 이용한 복합체 (라인 19-21)는 Lip-말레이미드를 6.7% 몰비로 함유하는 리포솜 (A, D, 또는 G)에 L-37pA 리간드를 화학적으로 접합시킴으로써 형성시켰다. Lip-Mal은 1.5 mM HEPES 완충액 (최종 농도)을 부가하면서 L-37pA와 14:7 (nmol:nmol) (Lip:L-37pA)의 비로 혼합하고, 20 내지 30 RPM으로 실온 하에 3시간 동안 회전시켰다. 그 후, DNA를  $1 \mu\text{g}$  DNA:14 nmol Lip의 비로 가하고, 상기와 같이 혼합하며 실온 하에 15분 동안 유지시켰다. 비교를 위해, 상이한 방법을 또한 사용하여 GAL 리간드를 수반한 복합체를 형성시켰다 (라인 13-18). 이어서, DNA를 필요한 모든 물에 가하고 상기와 같이 혼합하였다. 리포솜 A, D, 또는 G (HoKC를 수반하거나 수반하지 않음)을 필요한 모든 물에 가하고 상기와 같이 혼합하였다. 2가지 용액을 실온 하에 15분 동안 유지시킨 다음, 함께 가하고, 상기와 같이 혼합한 다음, 실온 하에 15분 동안 유지시켜 양이온성 리포솜/DNA 코어를 형성시켰다. GAL 리간드를 음이온성 (포스피티딜세린:콜레스테롤) 리포솜과 1:1:0.05 (PS:chol:GAL)의 몰비로 미리 접합시켰다. 이어서, 이러한 PScholGAL 혼합물을 미리-형성된 양이온성 리포솜/DNA 복합체에 가하고, 용액을 상기와 같이 혼합하며 실온 하에 15분 동안 유지시켜 양이온성 리포솜/DNA 코어를 피막화시켰다. 이들 복합체에 대한 성분 비는 7 nmol:7 nmol:1  $\mu\text{g}$  (PScholGAL:Lip-HoKC:DNA) 및 7

nmol:14 nmol:1  $\mu$ g (PScholGAL:Lip:DNA)이다. 형질감염시킨지 48시간 후, 상기 언급된 바와 같은 루시퍼라제 검정 시스템을 이용하여 루시퍼라제 활성을 결정하였다. 도 2는 일차 침팬지 간세포에서 단백질 1  $\mu$ g 당 루시퍼라제 RLU로써 결정된 바와 같은 형질감염 효율을 도시하고 있다. 3가지 방법 모두와 3가지 리간드 모두를 이용하여 형성된 복합체는 이들 일차 침팬지 간 세포를 형질감염시킬 수 있었다. 사용된 지질과는 무관하게 일차 침팬지 간세포를 사용하여, sc와 복합체 형성한 리포솜은 상이한 방법을 이용하여 GAL (15,509 RLU) 또는 L-37pA (19,662 RLU)과 복합체 형성한 가장 우수한 리포솜 보다 거의 10배 더 높은 형질감염 효율 (약 150,000 RLU)을 제공하였다. 예상된 바와 같이, 정상적인 간세포 상에서는 Tf 수용체 수가 더 낮은 것으로 예상되기 때문에, sc/리포솜의 전반적인 형질감염 효율은 동일한 복합체를 Hep3B 세포에 사용한 경우 보다 16배 정도까지 더 낮았다. 그러나, HoKC 펩티드를 봉입시키면 TfRscFv를 이용한 형질감염 효율이 10배 정도 증가하였다. Hep3B 세포를 이용하여 기존에 관찰된 바와 같이, HoKC 펩티드를 GAL 리간드와 함께 포함시킨 경우에, GAL 및 L-27pA 리간드를 이용한 가장 우수한 형질감염 효율이 관찰되었다. 따라서, 이들 연구는 scLHK-DNA 복합체가 DNA를 정상적인 간 세포로 전달하는 데에 고도로 효율적이었고, 기타 리간드를 또한 복합체에 사용하여 정상적인 간세포를 형질감염시킬 수 있다는 것을 입증해준다.

[0125] 3. 리포솜 복합체를 생체내 간세포로 표적화시킴

[0126] 시험관내 실험 후, 비-종양 보유 BALB/c 마우스 및 특이적 리포솜 복합체를 이용한 실험을 생체 내에서 수행하였다. 6주 내지 9주생 동물에게, 상기 제공된 비로 상기 언급된 바와 같이 제조된 400  $\mu$ l의 리포솜 복합체 중의 EGFP를 발현하는 DNA 플라스미드 20 내지 25  $\mu$ g을 꼬리 정맥을 통하여 24시간 동안 2 내지 3회 정맥내 접종하였다. 간으로부터의 조직 조각을 마지막을 접종한 후 24 내지 48시간째에, 비장, 신장, 폐 및 심장을 액체 질소에서 순간 동결시키고 -70°C 하에 저장하였다. 또한, 간 조직 조각을 조직학적 분석을 위해 포르말린에 고정시켰다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, 프로테아제 억제제 억제제 카테일 (공급처: Sigma)을 함유하는 T-PER 조직 추출 시약 (공급처: Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 간 조직을 추출하고, 원심분리 후에 상등액을 수집하여 세포 부스러기를 제거하였다. BCA 단백질 검정 시약 키트 (공급처: Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 단백질 농도를 평가하였고, 모노클로날 항-GFP 항체 (BABCo) 및 ECL 웨스턴 블롯 키트를 이용하여 40  $\mu$ g의 총 단백질을 분석하였다 [참고: Yu W., et al., *Nucleic Acids Research*, 32:e48 (2004)]. 동일한 막을 항-GAPDH 항체로 처리하여 웰당 동등한 단백질 부하량을 확립시켰다. 도 3은 처리되지 않은 마우스 (UT)와 비교해서, 지질 A와 접합된 TfRscFv 리간드 (sc) (scLA), 지질 A 및 HoKC와 접합된 TfRscFv 리간드 (sc) (scLAHK), 지질 D 및 HoKC와 접합된 TfRscFv 리간드 (sc) (scLDHK), 지질 G 및 HoKC와 접합된 TfRscFv 리간드 (sc) (scLGHK), 지질 A와 접합된 갈락토스 (GalLA) 및 지질 A와 접합된 L-37pA (L-37pALA)를 두 번 되풀이 하여 접종한 마우스로부터의 간 추출물의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 좌측 레인은 GFP 및 GAPDH 둘 다에 대한 양성 대조군 (PC)을 나타낸다. 모든 리포솜 복합체는 접종된 마우스의 간에서 GFP를 발현하였다. HoKC 펩티드를 봉입시키면, 지질 A가 사용된 경우에 DNA가 마우스의 간에 전달되는 것이 개선되었다 (scLA와 scLAHK를 비교한다). scLGHK 리포솜 복합체를 이용한 경우에 가장 높은 수준의 발현이 관찰되었지만, 이는 두 마리 마우스 중의 단지 한 마리에서만 관찰되었고 scLAHK 복합체는 복제 동물에서 GFP 단백질을 보다 일관되게 강력히 발현하는 것으로 나타났다. GalLA 및 L-37pALA 변형된 리포솜 또한, GFP를 발현하였지만, 보다 낮은 수준이었다.

[0127] 전반적으로, 이러한 데이터는 3가지 리간드 모두를 사용할 수 있긴 하지만, 리포솜 내에 표적화 리간드 TfRscFv 및 HoKC 펩티드를 함유하는 유전자 전달 비히클이 갈락토스 또는 L-37pA 펩티드 보다 간 세포에 보다 우수하다는 것을 나타낸다. 이들 결과는 예상치 못한 것이었는데, 이는 간 세포를 표적화하는 데에 갈락토스가 종종 사용되고 있기 때문이다 [참고: Wu, J., et al., "Targeting Hepatocytes for Drug and Gene Delivery: Emerging Novel Approaches and Applications," *Frontiers in Bioscience* 7:d717-725 (2002)].

[0128] 4. HCV에 대한 면역 반응을 유도시키기 위한 DNA 및 바이러스성 벡터의 구축

[0129] 당업자에게 널리 공지된 표준 클로닝 방법을 사용하여, 고 발현 프로모터의 제어 하에 HCV의 NS3 내지 NS5B 단백질을 발현하는 DNA 벡터를 구축하였다 (pAG410). 이들 HCV-특이적 단백질을 발현하기 위해 사용되고 있는 주쇄 벡터는 이미 FDA에 의해 임상용으로 승인되었고, 이는 현재 암-특이적 제형을 이용하여 환자에게서 제1상 임상 시험 중에 있다. 이러한 발현은 293T 및 Huh7.5 (간세포) 세포를 이용하여 시험관 내에서 시험되었고, 웨스턴 블롯 (도 4) 및 면역형광 (데이터는 도시되지 않음) 분석 둘 다를 통하여 HCV 항원을 특이적으로 발현하는 것으로 밝혀졌다. 6 웰 디쉬 중의 세포를 제작용자의 프로토콜을 이용하여 리포펙틴 (Lipofectin) (공급처: Invitrogen, CA)으로 형질감염시켰다. 48시간 후, 세포를 대상으로 하여 특이적 유전자 발현에 관하여 분석하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, 프로테아제 억제제 억제제 카테일 (공급처: Sigma)을 함유하는 250  $\mu$ l의 M-PER 시약 (공급처: Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 세포를 용해시켰다. 80 마이크로그램의 총 단백질을 8-20% SDS-



PAGE 구매 겔 (공급처: Invitrogen)을 사용하여 웨스턴 블롯함으로써 분석하였다. 단백질을 PVDF 막으로 옮기고, 1:500으로 희석시킨 NS5B에 대한 모노클로날 항체 또는 1:500으로 희석시킨 만성 침팬지 혈청으로 프로빙하였다. 항-인간 또는 항-마우스 IgG HRPO 접합체 및 화학발광 (공급처: West Pico system, Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 단백질을 가시화하였다. 도 4는 pAGVec (빈 벡터)로 형질감염시킨 세포와 비교해서 NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B에 대해 관찰된 특이적 밴드를 도시하고 있다. 표준 클로닝 방법을 사용하여 이들 동일한 항원 각각을 개별적으로 발현하는 아데노바이러스 재조합체를 또한 구축하였다. 이들 바이러스성 벡터 각각으로부터의 발현은 또한, 웨스턴 블롯 분석 (데이터는 도시되지 않음)에 의해 검증하였다.

#### [0130] 5. 고 발현 프로모터 내로 클로닝된 인간 IL-2의 효율 증강

[0131] 효율적인 아주반트 분자로서 작용하는 IL의 경우, 이는 충분히 고 수준으로 발현되어 Th-1 T 세포 반응을 효과적으로 자극할 수 있어야만 한다. 이를 달성하기 위한 한 가지 방식은 상기 분자를 고 발현 프로모터의 제어 하에 놓아두는 것이다. 이러한 접근 방식에 의해 가능한 IL의 고 수준 발현을 입증하기 위하여, 인간 IL-2를 고 발현 프로모터의 제어 하에 pSCMV 벡터 내로 클로닝하였다 [참고: 미국 공개특허공보 제2007/0065432호; 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다]. 생체내 발현 수준을 시험하고, 이를 표준 CMV 프로모터로부터의 수준과 비교하였다. 양 경우에 있어, 플라스미드를 본원에 기재된 바와 같이 제조된 HoKC 랩티드를 수반하지 않은 표적화 리포솜 나노복합체에 의해 전달하였다. PANC-1 종양 조직을 피하 접종함으로써 PANC-1 인간 췌장암 이종 이식편 종양을 4 내지 6주생 암컷 무흉선 누드 마우스에서 유도시켰다. 대략 3주 후에, 종양 크기는 평균 400 내지 700 mm<sup>3</sup>였고, 동물에게 상기 언급된 바와 같이 단순히 혼합함으로써 제조되고 표준 CMV 프로모터 또는 고 발현 프로모터의 제어 하에 IL-2에 대한 유전자를 수반하는 나노면역리포솜 복합체를 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 6일에 걸쳐 정맥내 (꼬리 정맥) 6회 접종하였다 (1회 주사당 40  $\mu$ g DNA). 마지막으로 주사한지 24시간 후에 마우스를 희생시켰다. 종양 및 폐 조직을 수집하고, 액체 질소에서 섭광 동결시키며, 표준 기술을 이용하여 ECL 탐지 및 hIL-2에 대한 시판용 폴리클로날 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석함으로써 hIL-2 단백질 발현 수준에 관하여 분석하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, psCMV-hIL-2 플라스미드를 수반하는 복합체가 투여된 동물로부터의 종양 모두는 이러한 종양에서 고 수준의 발현을 나타내었다. 이와는 달리, 종양에서 hIL-2 발현은 전혀 없었는데, hIL-2 유전자는 표준 CMV 프로모터의 제어 하에 있었다.

#### [0132] 6. scL을 통하여 정맥내 전달한 후 마우스 조직에서의 HCV DNA 서열/발현의 탐지

[0133] scL-pAG410 복합체를 전신 투여한 후 각종 비-종양 보유 마우스 조직에서 NS3 내지 NS5B를 코딩하는 유전자의 존재를 평가하기 위한 실험을 수행하였다. BALB/c 마우스 (군당 3마리)에게 scL (단일 쇠 트랜스페린 항체-표적화 양이온성 리포솜)과 복합체 형성하였거나 또는 자유 플라스미드 DNA로서의 플라스미드 pAG410 DNA를 2회 (8시간 간격) 정맥내 주사하였다 (1회 주사당 25  $\mu$ g/마우스). 복합체는 상기 언급된 바와 같이 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 단순히 혼합함으로써 제조하였다. 마우스 한 군에게 동일한 방식 및 동일한 비로 제조한 빈 pSCMV 벡터를 수반하는 scL을 투여하였다. 주사한지 48시간 후, 동물을 희생시켰다. 간, 폐, 비장 및 흉선을 수거하고 액체 N<sub>2</sub>에서 섭광 동결시켰다. 샘플 일부를 사용하여, PCR하기 위한 DNeasy 추출 키트 (공급처: Qiagen)를 이용하여 DNA를 단리하였다. Taq 골드 폴리머라제를 이용하여 NS3, NS5A 및 NS5B를 증폭시키기 위한 프라이머를 사용하여 별개의 반응에서 DNA PCR (1  $\mu$ g DNA)을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 6 ng DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM의 각 dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP; 300 nM의 각 프라이머; 및 총 용적 50  $\mu$ l 중의 1.25 단위의 AmpliTaq. 반응 혼합물을 94 $^{\circ}$ C 하에 10분 동안 항온 배양한 다음, 94 $^{\circ}$ C 하에 15초 및 60 $^{\circ}$ C 하에 30초, 이어서 60 $^{\circ}$ C 하에 7분의 40 주기로 항온 배양함으로써 증폭을 수행하였다. 도 6은 간에서의 NS3 유전자에 대한 PCR 데이터를 도시하고 있지만, 신호 차이는 NS5A 및 NS5B에 대해 유사하였다. 모든 기관 내의 카피 수는 복합체가 투여된 마우스 대 자유 pAG410가 투여된 마우스 간에 상당한 차이가 있었다. 간 (도 6)과 유사하게, 폐, 비장 및 흉선에서는 scL-pAG410이 강력한 PCR 밴드를 나타낸 반면, 자유 DNA의 경우에는 신호가 전혀 탐지되지 않았다. 예상한 바와 같이, 벡터-처리된 마우스로부터는 신호가 없었다. 따라서, 복합체 형성한 HCV 플라스미드 DNA를 정맥내 전달하면 간 및 기타 기관 내의 세포에 의해 효율적으로 흡수되었다. 이들 결과는 HCV 항원을 정상적인 간 및 기타 정상 세포에 전신 전달하는 데에 있어서 상기 접근 방식을 실행할 수 있다는 것을 확인시켜 주고 이를 뒷받침 해준다.

#### [0134] 7. 마우스 면역 반응

[0135] 마우스는 HCV로 감염시킬 수 없다. 그러나, 유도된 T 세포 반응 효능을 평가하기 위하여, HCV의 NS3 단백질을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스 (rVV)를 대리 바이러스 시험감염 모델로서 사용하였다. 이러한 유형의 rVV 모델은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, T 세포 반응의 생체내 효능을 평가하는 것으로 허용된 수단이다. 마

우스 (군당 3마리)에게 상기 언급된 바와 같이 scL과 복합체 형성하였거나 또는 자유 플라스미드 DNA로서의 IL-12 플라스미드 DNA 및 HCV를 0주 및 4주째에 정맥내 접종하였다. TfRscFv/Lip/DNA 복합체는 상기 언급된 바와 같이 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 단순히 혼합함으로써 제조하였다. DNA를 등 몰량으로 혼합하였다 (1회 주사당 총 50  $\mu$ g/마우스). 마우스를 8주째에 HCV의 NS3 단백질을 발현하는  $10^6$  플라크 형성 단위 (pfu) rVV로 시험감염시켰다. 시험감염시킨지 5일 후에, 마우스로부터 난소를 꺼내고, PBS에서 균질화시킨 다음, 동결/해동 및 초음파 처리 3회전을 수행하였다. 적정시키기 위해, 난소 추출물 (100  $\mu$ l)을 100  $\mu$ l의 트립신 및 100  $\mu$ l의 PBS와 합하고, 37°C 하에 30분 동안 항온 배양하였다. 희석 ( $10^{-1}$ 에서부터  $10^{-6}$ 까지 10배 희석)을 2% FBS/EMEM에서 수행하고, 250  $\mu$ l를 사용하여 12-웰 디쉬에서 BSC-1 세포의 이중 웰을 감염시켰다. 감염시킨지 2일 후에, 매질을 꺼내고 세포를 고정시키며, 크리스탈 바이올렛 (20% 에탄올, 20% 포름알데히드, 0.3% 크리스탈 바이올렛)으로 염색하였다. 군 1에게는 PBS를 투여하고, 군 2에게는 scL과 복합체 형성한 pAG410 및 IL-12 플라스미드를 투여하였으며, 군 3에게는 scL과 복합체 형성한 빈 벡터 및 IL-12 플라스미드를 투여하였고, 군 4에게는 네이키드 DNA로서의 pAG410 및 IL-12 플라스미드를 투여하였다. 도 7은 각 군에서 pfu/난소로서 표현된 rVV 역가를 도시하고 있다. 도트는 개별적 마우스를 나타내고, 검정색 막대는 군당 평균 역가를 나타낸다. scL pAG410/IL-12 복합체로 면역시키면, 스튜던츠 (Student's) T-분포도를 이용하여 평가한 바와 같이, PBS 군과 비교해서 바이러스성 역가가 상당히 감소되었다 ( $p=0.002$ ). Gp 2에서 평균 역가  $10^4$  대 Gp 1에서 평균 역가  $10^6$ . 흥미롭게도, 마우스에게 scL과 복합체 형성한 IL-12 벡터를 빈 주사 벡터와 함께 접종하면 바이러스성 역가가 또한 상당히 감소되었지만 (평균 역가  $2 \times 10^5$  pfu/난소), pAG410 플라스미드와 합한 경우에 관찰된 바와 같은 큰 감소는 아니었다. 이와 같이 바이러스 복제에 대한 효과는 scL을 이용하여 전달한 결과인데, 이는 네이키드 DNA로서 pAG410 및 IL-12를 이용하여 면역시키면 (Gp 4) 바이러스 역가의 상당한 감소가 유발되지 않았기 때문이다. 이러한 데이터는 scL과 복합체 형성한 DNA로 면역시키면 바이러스 시험감염에 대항하여 보호해줄 수 있는 T 세포 반응이 유발되고, 이들 면역 반응은 네이키드 DNA를 이용하여 유도시킨 것보다 탁월하다는 것을 나타낸다. 상기 데이터는 사이토킨 발현성 플라스미드 단백을 scL 전달하는 것이 바이러스 복제를 억제시키는 면역 반응을 유도시킬 수도 있다는 것을 나타낸다.

[0136] 8. scL과 복합체 형성한 DNA를 이용한 면역 후 간내 T 세포 침윤

[0137] scL과 복합체 형성한 DNA로 면역시키면, 간친화성 바이러스로의 감염시 보다 우수한 간내 T 세포 침윤이 유발되는지를 평가하기 위하여, 상기 언급된 바와 동일한 4개 군 (상기와 동일한 복합체를 이용하여 0주 및 4주째에 면역시킴)에게 면역 후 8주째에, NS3, NS5A 및 NS5B HCV 단백질을 발현하는 비-복제성 아데노바이러스 재조합체  $3 \times 10^8$  개 감염성 입자로 정맥내 시험감염하였다. 시험감염한지 10일 후에, 간 조직을 당해 분야에 널리 공지된 표준 프로토콜을 이용하여 수거하고, 포르말린 고정시키며, 파라핀 블록 위에 올려 놓았다. 박편을 H&E 염색시키고 T 세포 침윤에 관하여 분석하였다. 간-침윤성 T 세포의 수는 상이한 마우스 군에서 평가하였다. 군당 3마리 마우스 각각에 대해 3개 시야를 계수하였다. 각 군에 대한 계수치를 합하고 평균내어 각 시야 (fov)당 T 세포 수를 획득하였다. 이 데이터를 스튜던츠 T 시험에 의해 분석하였다. scL pAG410/IL-12가 투여된 마우스에서의 평균 T 세포 침윤은 PBS가 투여된 마우스에서 보다 상당히 더 높았다 [118.8 T 세포/fov 대 70.2 T 세포/fov ( $p=0.000007$ )]. 이를 scL-벡터/IL-12가 투여된 마우스에 대한 71.5 T-세포/fov와 비교하였다. 네이키드 pAG410/IL-12가 투여된 마우스에서의 T-세포 침윤 수준 [108.75 T-세포/fov ( $p=0.001$ )]은 scL-pAG410/IL-12를 이용한 경우 보다 덜한 정도이긴 하지만 상당히 더 높았다. 이러한 관찰은 HCV 항원을 발현하는, scL과 복합체 형성한 플라스미드로 면역시키면 재조합 간친화성 바이러스로의 감염시 간에서 보다 우수한 T 세포 반응이 유발된다는 것을 입증해준다.

[0138] 9. HCV-특이적 RNA를 발현하고 이에 관하여 시험하기 위한 도구, 항원 및 면역 반응의 개발

[0139] 신드비스 (Sindbis) 발현 시스템을 사용하여, HCV의 코어, E1E2, 및 NS3 단백질을 발현하도록 발현 재조합 바이러스를 공학 처리시켰다. 이어서, 이들 단백질을 히스티딘 태그화하여 니켈 칼럼을 이용하여 정제를 촉진시켰다. 효율적인 정제를 수행하고, 마우스 모노클로날 또는 토끼 폴리클로날 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석함으로써 특이성을 결정하였다. HCV의 E1E2, NS3, 및 NS5A 단백질에 대한 고 역가 항체를 나타내는 감염된 침팬지로부터 만성 기 혈청을 확인하였다. 이러한 불활성화 혈청을 몇 가지 웨스턴 블롯 및 면역형광 검정에 사용하여 재조합 DNA 및 바이러스성 벡터로부터 HCV 항원의 발현을 성공적으로 탐지하였다. NS3, NS5A 및 NS5B 단백질 [시판처: Mikrogen (Germany)]을 또한 사용하여, 엘리스팟, 증식 검정 및 유동 세포계수법 분석을 이용하여 침팬지에서 HCV에 대한 T 세포 반응을 탐지하였다. 침팬지 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 이용한 엘리스팟 검

정에서 또한 성공적으로 사용되었던 1a H77 유전자형 서열에 상응하는 중복 18량체 펩티드 세트를 공급처 [NIH AIDS Research and Reference Reagent Program]로부터 취득하였다. 대다수의 HCV 항원, 코어, E1E2, NS2, NS3, NS5A, 및 NS5B에 대한 항체에 관하여 시험하기 위한 ELISA를 개발하였다. 최근의 연구 결과, ELISA를 이용하여 취득한 항-E1E2 역가가 감염된 침팬지에서 중화 항체 역가의 우수한 지표인 것으로 입증되었다는 사실이 밝혀졌다. 혈청 중의 HCV RNA를 탐지하고 정량화하기 위한 축소 및 실시간 PCR 검정 둘 다 개발되었다. 이들 검정의 민감도와 특이도를 평가하였고, 축소 PCR을 이용해서는 40 RNA 카피/ml 정도로 적은 수가 탐지될 수 있었고, 실시간 PCR을 이용해서는 200 RNA 카피/ml (74 WHO IU/ml)가 탐지될 수 있었다. 이들 시약 및 탐지 시스템 모두는 HCV 유전자형 1a (HCV-H) 감염성 클론으로부터 전사된 RNA가 접종된 침팬지에서 초기 급성 감염기 동안에 수집한 혈장으로부터 유래된 모노클로날 바이러스에 대해 특이적이다.

[0140] 10. HCV 시험감염에 앞서 타고난 본래의 침팬지 및 회복된 침팬지의 예방적 백신 접종

[0141] HCV 감염 경로를 변경시킬 수 있는, 당단백질-특이적 또는 비구조적 단백질-특이적 면역 반응을 유발시키는 백신의 능력을 조사하였다. 이들 연구 결과, 중화 항체 (nAb)와 백신 유도된 T 세포 둘 다 침팬지 모델에서 HCV 감염을 변형시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0142] a) 외피에 의거한 백신은 HCV 감염을 변형시킨다.

[0143] 백신 실험에 사용하기 위한 HCV E1E2 단백질을 생성시키기 위한 발현 및 정제 시스템을 개발하였다. 히스티딘 태그와 E1E2 단백질은 신드비스 발현 시스템을 이용하여 발현시켰고, GNL 렉틴 및 니켈 칼럼을 이용하여 >80% 순도로 정제하였는데, 이러한 방법은 당해 분야에 널리 확립되어 있다. 특이도와 순도는 E1 및 E2에 대한 모노클로날 항체를 이용한 웨스턴 블롯 및 SDS PAGE 겔의 은 염색에 의해 평가하였다. 2마리 침팬지 [즉, 1마리는 타고난 본래의 침팬지 (Ch1601)이고 다른 하나는 급성 HCV 감염으로부터 회복된 침팬지 (Ch1587)이다]를 근육내 전달된 rE1E2 단백질 25  $\mu$ g으로 면역시키고, 100회분 침팬지 감염성 용량 (CID<sub>50</sub>)의 클로날 HCV로 시험감염시켰다 (도 8a 및 8b). 이러한 시험감염 결과를 백신 접종하지 않은 대조군 동물에서의 감염과 비교하였다. 강력하고도 특이적인 T-세포 증식 반응 이외에도, 양 동물의 면역으로 인해 E2의 초가변 영역 (HVR1)에 대해 유도된 항체를 포함한 E1E2에 대한 고 항체 역가가 생성되었다. 이러한 영역은 천연 단리물에서 가장 가변적인 것으로 밝혀졌고, 또한 nAb 에피토프를 나타내는 것으로 여겨진다. E1E2를 발현하는 백신이나 바이러스 재조합체로 감염시킨 BSC-1 세포로부터 정제한 바이오티닐화 HVR1 펩티드 또는 E1E2 단백질을 이용하는 것으로 개발된 완전 단백질 E1E2 및 HVR1 펩티드 ELISA 검정을 이용하여 항체를 측정하였다. 백신 접종한 양 동물에게서는 바이러스혈증이 3주 지연되었다. Ch1601에서는, HCV RNA 역가가  $5 \times 10^4$  카피/ml 이하로 유지되었고, ALT 수준은 최소 한도로 상승하였다. 간내 사이토킨 mRNA 수준 증가는 HCV RNA가 정량화 가능하지 않은 수준으로 떨어진 것과 동시에 발생하였다. 이러한 대조군에서 항체 역가가 줄어들고 동물이 만성적으로 감염됨에 따라 바이러스혈증이 재발됨에도 불구하고, 이러한 재발은 면역 도피와 연관이 없었다. 급성 HCV 감염로부터 회복된 침팬지에게서는 nAb가 발생하지 않는다. 일차 감염시 유도된 기존의 기억 T 세포 반응에 nAb를 추가하면 해당 동물이 재감염되지 못하게 할 수 있는 면역 반응이 산출되었다. Ch1587에서는, 바이러스혈증이 3주째에 하나의 샘플에서만 탐지 가능하였는데 ( $<10^4$  카피/ml), 감염의 명백한 증거는 없었다.

[0144] b) T 세포 백신은 HCV 감염을 변형시킨다.

[0145] 본 발명의 방법을 사용하지 않고 단지 HCV NS 항원 NS3, NS5A 및 NS5B를 포함한 백신을 구축하였다. 회복된 침팬지 (Ch1588)를 NS3에 대한 DNA 프라임/rVV (재조합 백신이나 바이러스) 부스트 섭생으로 면역시켰다. 제2의 회복된 침팬지 (Ch1606)는 NS3, NS5A 및 NS5B를 포함한 백신으로 면역시켰다. 침팬지를 100 CID<sub>50</sub>의 클로날 HCV로 시험감염시켰다. 양 동물에서, 백신 접종 후에 T 세포 반응이 부스팅되었다. 양 동물의 시험감염으로 인해 무증상 감염이 발생하였는데, 이는 감염 후 (p.i.) 6주째에 단지 1주 (Ch1606) 또는 2주 (Ch1588) 동안 지속되는 저 수준의 바이러스혈증이 나타났다 (도 9a-9c). 비교하자면, 백신 접종하지 않고 회복된 침팬지에게서는 감염 후 1주째에 바이러스혈증이 발생하는데, 이는 적어도 14주에 걸쳐 탐지 가능하다.

[0146] 이어서, 타고난 본래의 침팬지 (Ch6394)에게 NS3-NS5 백신을 접종하고, 100 CID<sub>50</sub>의 모노클로날 H77로 시험감염시켰다. 완전 항원 및 중복 펩티드를 이용하는 증식 및 엘리스팟 검정을 사용하여 T-세포 반응을 시험하였다. Ch6394는 백신 접종한 후 모든 백신 항원에 대한 특이적 T-세포 반응을 발생하였다. 시험감염시, 상기 동물은 감염 후 1주째에 바이러스혈증이 되었지만, 최대 역가는  $<10^5$  카피/ml이고 바이러스 복제는 즉시 제어되었다 (도 9a-9c). 타고난 본래의 동물에서는, 역가가 7일마다 대략 2배 증가한 반면, Ch6394에서는 역가가 동일한

기간 내에 30배 감소하였다. 그러나, 10주째에는 바이러스 제어가 상실되어 동물에게서 만성 감염증이 발생하였다. 이러한 상실은 NS3-특이적 면역 반응 (IFN- $\gamma$ -생성 T 세포 빈도 및 증식)의 상실과 동시에 일어났고, 2개의 아미노산 변이 (하나는 NS3 영역에서 일어났고 다른 하나는 NS5A 영역에서 일어났다)의 출현과 상관이 있었다. 엘리스팟 검정 결과, 이러한 변이를 수반하는 펩티드는 야생형 펩티드와 비교해서 Ch6394로부터의 PBMC에 의해 더 이상 인식되지 않은 것으로 밝혀졌는데, 이는 이들 변화가 면역 도피 변이를 나타낸다는 지표이다. CD4 T 세포로부터의 도피로 인해, 헬퍼 기능 상실이 유발될 수 있는데, 이는 상기 동물에서 NS3 특이적 반응의 상실을 설명해줄 수 있었다. 이들 결과는 HCV에 대한 T 세포에 의거한 백신이 감염을 제어할 수 있는 잠재력을 지니고 있다는 것을 제안하고 있다.

[0147] 11. HCV 시험감염에 앞서 타고난 본래의 침팬지의 예방적 백신 접종

[0148] a) 특이적 T 세포 반응은 정맥내 리간드-리포솜 나노복합체 (scL-HCV) 백신 전략을 이용하여 타고난 본래의 침팬지에서 유발되고, 이는 시험감염 후 증대된다.

[0149] 본원 전반에 걸쳐 기재된 바와 같은 scL-HCV 나노복합체를 이용한 타고난 본래의 침팬지에서의 백신 연구를 수행하였다. 면역 반응을 프라이밍하기 위한 주사는 0, 4 및 8주째에 scL-HCV 복합체를 사용하여 수행한 다음, 재조합 아데노바이러스 (rAd) 부스팅하였다 (16주). 본 동물에게 백신 접종하기 위해 사용된 복합체는 부형체로서 5% 텍스트로스를 사용하여, 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 만들었는데, 침팬지의 체중을 기준으로 하여 대략 1회 주사당 0.164 mg DNA/Kg을 사용하였다. 이와 같이 제조된 복합체를 정맥내 주입용 250 ml 5% 텍스트로스 봉지 내로 주사하고 동물에게 투여하였다. 동물을 32주째 (부스팅 후 16주째)에 시험감염시켰다. 나노복합체 및 아데노바이러스 부스트를 수반한 주입은 널리 관용되고 있고 어떠한 동물에서도 부작용이 없었다.

[0150] 백신 접종 후: 엘리스팟 연구 결과, 백신 접종한 2마리 동물 (Ch1611, Ch6407)에게서 백신 접종 후 16주째에 강력하고도 광범위하게 반응성인 HCV-특이적 IFN- $\gamma$  반응이 나타났는데 (도 10a-10c), 빈 벡터 나노복합체 및 비-rAd가 투여된 대조군 동물 (Ch0257)에서는 최소한 또는 탐지 가능하지 않은 반응이 나타났다. scLHK-HCV를 접종한 후 Ch1611 및 Ch6407에서 저 수준 IFN- $\gamma$  특이적 T 세포 반응이 관찰되었는데, 이는 이러한 백신의 프라이밍 성분에 대한 면역 반응의 지표이다. 면역시킨 후 상기 2마리 백신 접종한 동물에게서 간내 IFN- $\gamma$  및 CD3 mRNA 수준 증가가 또한 관찰되었다 (도 12a-12c, 12, 16, 및 32주). 이러한 데이터는 0주째 (백신 접종 이전)와 비교해서 mRNA 수준으로서 표현하였고, 내인성 대조군 (GAPDH)에 대해 표준화시켰다. 16주 및 32주째에 CD3 mRNA가 증가하는 것은 간에서의 T 세포 침윤을 나타낸다. 면역시킨 후 및 시험감염시키기 이전 (32주) 언제라도 대조군 동물 (Ch0257)에 대해서는 사이토킨 증가가 전혀 관찰되지 않았다 (도 12a-12c). 이러한 데이터는 T 세포 반응이 본원에 기재된 복합체 및 접근 방식을 이용하여 백신 접종한 후 말초혈에서 뿐만 아니라 간에서 유도되었고, 이는 Ch6407 및 대조군 Ch0257에서의 혈청 사이토킨 분석에 의해 뒷받침되었다는 것을 나타낸다 [TransSignal Cytokine Antibody Array kit (공급처: Panomics)를 사용한다]. 첫 번째 scL-HCV DNA 나노복합체 처리 후 2주째에, 본 발명자들은 대조군 동물에서가 아니라 백신 접종한 침팬지에서만 사이토킨 (ICAM-1, 각종 인터루킨, TGF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  포함)의 상향 조절을 관찰하였다.

[0151] 시험감염 후: 면역시킨 침팬지를 당해 분야에 널리 공지된 표준 방법을 이용하여, 100회분 감염성 용량의 HCV로 32주째에 시험감염시켰다. 시험감염시킨 후, 백신 접종한 양 동물에게서 바이러스 복제가 즉시 제어되었는데, 이는 엘리스팟 검정에 의해 측정된 바와 같이 HCV-특이적 T 세포 반응 증가 (도 11a-11c) 및 간내 사이토킨 반응 증가 (도 12a-12c)와 동시에 발생하였다. 시험감염시, 양 동물은 백신 항원 (NS3-NS5B)에 대해 특이적인 탐지 가능한 T 세포 반응을 여전히 갖고 있었다. 시험감염 후 및 바이러스 복제에 반응하여, 이들 반응이 증가하였다. 대조군 침팬지로부터의 PBMC를 이용한 엘리스팟 검정은 HCV-특이적 반응을 전혀 나타내지 않았다 (도 11a-11c). 타고난 본래의 감염된 동물의 급성 기에서 탐지 가능한 면역 반응이 존재하지 않는다는 것은 공개된 기타 관찰 사항과 일치한다. 간내 IFN- $\gamma$  mRNA 수준은 면역시킨 2마리 동물에게서 시험감염시킨 후 즉시 증가하였다 (도 12a-12c). 34주째 (시험감염 후 2주째)에는 Ch6407 및 Ch1611 각각에 대해 기준선 위로 8배 및 10배 증가하였다. 이러한 증가는 간에서의 바이러스 복제에 대한 즉각적인 면역 반응을 나타낸다. 간내 사이토킨 수준은 시험감염시킨지 수 주 후에 대조군 동물에서만 증가하기 시작하였고, 41주째까지는 상기 면역시킨 동물에서와 거의 동등한 수준을 획득하지 못하였다.

[0152] 0주에서 8주까지는 실시간 PCR 검정을 이용하여 바이러스성 역가를 측정하였고, 0주에서 6주까지는 혈청 ALT 수준을 측정하였다. 도 13은 백신 접종한 양 동물이 시험감염 후 대조군 침팬지에서 관찰된 보다 상당히 더 낮은 바이러스 역가를 나타내었다는 것을 도시하고 있다. 또한, 이러한 역가는 대조군 침팬지에서 관찰될 수 있는



바와 같이 그리고 타고난 본래의 모든 동물에게서 관찰되는 바와 같이, 처음 5주 동안 기하급수적으로 증가하지 않았다. 사실상, 백신 접종한 동물 둘 다에서는 바이러스 역가가 5주까지는 대조군 동물 보다 4  $\log_{10}$  초과하여 더 낮다. 대조군 침팬지가 아닌, 백신 접종한 양 침팬지는 또한, 감염 후 2주째에 ALT 상승을 나타내었는데, 이는 초기에 간에서의 면역 반응을 나타내는 간내 사이토킨 데이터를 확인시켜 주었다 (도 14). 예상된 바와 같이, 대조군 동물에서의 ALT 수준은 감염 후기때까지 증가하지 못하였다. 시험감염 후 모든 동물의 감염이 예상되었는데, 이는 이것이 T 세포 백신이고 중화 항체 및 살균 면역을 유도시키도록 설계되지 않았기 때문이다. 기존에 유도된 T 세포 반응을 자극하기 위해서는 바이러스의 초기 복제가 요구된다. 이러한 데이터는 상기 정맥내 scLHK-HCV 백신 전략이 바이러스 감염시 회상되는 기억 T 세포를 유도시킨다는 사실과, 이러한 회상 반응이 바이러스 복제를 즉시 제어하는 데에 유효하다는 사실을 나타낸다.

[0153] 12. 만성적으로 감염된 침팬지에서 면역요법 전략을 시험한다

[0154] T 세포 면역요법 백신이 만성적으로 HCV-감염된 침팬지에서 유효한 것으로 입증될 수도 있는지를 결정하기 위해 HCV NS3, NS5A 및 NS5B를 포함한 백신을 구축하였다. 네이키드 DNA 프라임 (NOT scL-HK) (i.m.)/재조합 백신인 바이러스 (rVV) 부스트 접생을 사용하여 만성적으로 감염된 침팬지를 치료하였는데, 이는 아주반트로서 CpG와 합한 네이키드 DNA 3회분을 근육내 전달하면서 NS3, NS5A 및 NS5B 백신으로 면역시킨 다음, rVV 부스팅하였다. rVV를 접종한 후, NS3, NS5A 및 NS5B에 대한 말초혈에서의 T 세포 반응이 12 내지 20배 증가하였다 (도 15). 그러나, HCV RNA 및 간 효소 수준은 영향을 받지 않았는데; RNA 역가는 전처리 수준과 유사하게 약  $10^4$  RNA 카피/ml로 유지되었다. 간내 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  mRNA의 분석 후, 이들 사이토킨 어느 것에 대한 증가도 인지되지 않았는데, 이는 혈중 T 세포 활성 증가가 HCV 복제 부위에서의 증가를 유발시키지 못하였다는 것을 제안하고 있다. 바이러스 제어 실패는 T 세포가 간에서 기능하지 못하기 때문에 비롯된 것일 수 있다.

[0155] 만성적으로 감염된 4마리 상이한 침팬지에게 본원에 기재된 바와 같이 단순히 혼합하고; NS3, NS4B, NS5A 및 NS5B를 코딩하는 유전자를 수반하고 IL-12를 코딩하는 유전자를 수반하는 pSCMV 플라스미드 DNA, 또는 빈 벡터를 피막화함으로써 제조된 본 발명의 scL-HCV 복합체를 정맥내 주사하였다. 상기 복합체는 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 간단히 혼합함으로써 제조하였는데, 이는 체중을 기준으로 하여 1회 주사당 0.2 mg/Kg을 이용하였다. 5% 텍스트로스를 부형체로서 가하였다. 복합체 제조에 앞서 DNA를 HCV:IL-2의 경우에는 1:1의 물비로 혼합하거나 또는 빈 벡터:IL-2의 경우에는 2.5:1의 물비로 혼합하였다. 3마리 동물에게 scL/HCV-IL-2를 백신 접종하였고, 1마리에게는 빈 벡터-IL-2를 수반하는 복합체를 투여하였다. 각 동물에게는 4 내지 6 주 간격으로 3회 주사하였다. 재조합 아데노바이러스성 벡터를 이용한 부스트는 마지막으로 백신 접종한지 4주 후에 수행하였다.

[0156] 연구는 HCV 항원 및 IL-2를 발현하는 등물량의 재조합 벡터를 정맥내 전달하는 scL-DNA 또는 scLHK-DNA 접종을 포함한다. 발현된 모든 유전자가 동일한 주체 벡터 내에 존재하기 때문에, 물 량에 기초한 DNA 양은 발현된 모든 삽입물이 동등하게 전달된다는 것을 보장해준다. 별개의 HCV 및 IL DNA를 벡터 삽입물과 등 물비로 혼합하고, scL 또는 scLHK 내로 피막화시킨다. DNA가 GLP 조건 (Aldevron, ND) 하에 내독소-무함유 제제로서 생성되었다 (< 5EU/mg DNA). DNA (1회 주사당 약 7 mg/동물)는 침팬지의 체중을 기준으로 하여 복합체 중에서 투여하였다 (0.17 mg/kg). 이러한 용량은 60 kg 인간에게 투여하는 것과 대략 등가이고, 타고난 본래의 침팬지에게 백신 접종하기 위해 기존에 사용되었던 용량이다. 복합체를 제조하고, 동결건조시키며, 재구성 및 주사하기 위해 해당 동물 위치로 선적하였다. scL-HCV/IL-2 또는 scLHK-HCV/IL-2를 3마리 동물에게 0, 4, 8 및 12주째에 정맥내 전달하였다. 이러한 스케줄은 해당 접종물에 반응하기 위한 면역계 시간을 제공하기 위해 사용된다. 4 주 후에 T 세포 반응 또는 RNA 역가에 대한 효과가 전혀 관찰되지 않는다면, 본 발명자들은 부가의 접종을 수반하지 않고서는 새로운 어떠한 효과도 관찰하지 못할 것으로 예상하였다. 4번째 동물 (대조군 동물)에게는 scL 또는 scLHK와 복합체 형성한 빈 벡터 및 IL-2 플라스미드를 동시에 투여하였다. 이는 HCV 감염에 대한 상기 사이토킨 단독의 효과를 구별시켜 준다. 4회분 투여 후 바이러스학적 반응이 관찰되지 않은 경우에는, 예방적 백신 연구에서 사용된 바와 같은 HCV 항원 NS3-NS5B를 발현하는 rAd ( $10^{11}$  감염성 단위)를 이용한 부스팅을 제공하고, 면역 반응과 바이러스 역가 모니터링을 지속한다. 간전화성 바이러스성 벡터를 사용하는 것이 또한, 간 구획을 표적화하기 위한 목표를 달성시켜 준다.

[0157] **C. 샘플링**

[0158] 동물을 24주 정도까지 연구하였다. 첫 번째 접종하기 4주 전에 샘플 수집을 시작하였는데, 이들 샘플은 기준선 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 마지막 접종 후 8주까지는 샘플링을 지속하여, 해당 처리로 인해 양성 반응

이 산출되었는지를 결정할 수 있는 시간을 확보하였다. 본 연구 내내, NIRC SOP에 의해 규정된 바와 같은 멘기니 (Menghini) 기술에 의해 간 생검을 격주로 수행하고, 다음에 상세된 연구에 사용하기 위하여 대퇴 정맥을 통하여 매주 혈액을 채집하였다. 짝수 주 (-4, -2, 0, 2주 등)에는 40 ml의 전혈을 수득하고, 홀수 주 (-3, -1, 1주 등)에는 5 ml의 혈장을 수득하였다. 플라스미드의 안정성을 결정하기 위해, 투여 전 및 첫 번째 접종 후 15분, 1시간, 3시간, 8시간, 24시간, 48시간, 및 72시간째에 1 ml의 혈액을 수집하였다. 접종에 앞서 기타 모든 혈액을 채집하고 간 생검을 획득하였다. 이러한 출혈 스케줄은 비-인간 영양류에서의 혈액 수집에 대한 NIRC에 의해 제정한 지침서에 근거한 것이다. 매달 90 ml를 수집하는데, 이는 허용 가능한 한계치 내에 있다. 항응고제로서 헤파린을 이용하여 혈액을 수집한다. 2700 rpm 하에 10분 동안 원심분리함으로써 5 ml 및 1 ml 용적으로부터 혈장을 수득하였다. 혈장 샘플을 500  $\mu$ l 분취액으로 분리시키고, -80°C 하에 저장하였다. 간 생검의 절반을 포르말린에 고정시키고, 나머지 절반을 2 mm 박편으로 나누어 액체 N<sub>2</sub>에서 순간 동결시켰다.

[0159]

**D. 혈액 중의 scL-HCV 또는 scLHK-HCV 복합체의 안정성 및 간에서의 존재를 결정한다.**

[0160]

본 발명자들의 마우스에서의 예비 연구는 피막화가 간에서 발견된 핵산의 양을 상당히 증가시키고 이를 혈액 중에서 탐지할 수 있는 시간을 연장시킨다는 것을 나타낸다. 이러한 발견은 침팬지에서 피막화된 HCV NS3-NS5B 플라스미드를 이용하여 확인하였다. HCV DNA가 주사 후 순환계에 얼마나 장시간 존재하는 지를 결정하기 위해, 1 ml의 혈액을 투여 전 및 첫 번째 주사 후 15분, 1시간, 3시간, 8시간, 24시간, 48시간, 및 72시간째에 수집하였다. 혈장을 2개 분취액으로 분리시키고 -80°C 하에 동결시켰다. 1개 분취액을 사용하여 플라스미드를 분리시켰다 [High Pure PCR Template Preparation kit (Roche)]. 순간-동결시킨 간 조직 2 mm 조각 1개로부터 DNA를 분리시켰다 [DNeasy Extraction Kit (Qiagen)]. 음성 대조군 샘플은 접종에 앞서 취한 동일한 동물로부터의 혈장 및 간 조직이다. 외인성 HCV 플라스미드를 PCR에 의해 평가하였다. PCR을 역전사효소의 부재 하에 사용하는 것이 상기 플라스미드를 만성적 감염으로 인해 존재하는 모든 바이러스성 RNA와 구별시켜 준다. 또한, pSCMV 주체 내에 위치한 하나의 프라이머와 HCV 삽입물에 위치한 하나의 프라이머를 사용하였다. 따라서, 외인성 DNA 만이 증폭되었다. 이러한 접근 방식은 pSCMV 벡터 내의 기타 삽입물 (IND 생체내 분포 연구를 위한 p53)을 이용하여 성공적으로 사용하여 왔다. 정량화하기 위해, 공지된 양의 NS3-NS5B 플라스미드를 감염되지 않은 침팬지로부터의 혈장 또는 간 조직에 가한 다음 추출함으로써 신호 표준물을 제조하였다. FDA는 사용되고 있는 동물로부터의 다량의 샘플을 기록 보관소에 갖고 있다. IMAGEQUANT<sup>®</sup> 영상 분석 소프트웨어 (공급처: Molecular Dynamics)를 이용하여 스캐닝된 겔을 정량화하고, 이를 표준물과 비교함으로써 플라스미드 양을 계산하였다. 스트라타젠 (Stratagene) DNA 추출 키트를 사용하여 서던 분석하기 위하여 순간 동결시킨 간 조직의 두 번째 조각 및 혈장의 두 번째 분취액으로부터 DNA를 분리하였다. 접종에 앞서 취한 혈장 및 간 조직은 음성 대조군으로서 포함된다. 유전자 영상 알칼리성 포스파타제 DNA 표지화 및 탐지 시스템 (공급처: Amersham)을 이용하여 혼성화를 수행하였다. 상기와 같이, 서던 분석에 의해 외인성 DNA를 탐지하기 위한 프로브는 벡터와 삽입물 간의 연결부에 걸쳐 있다. 이러한 프로브는 IDT, 인코포레이티드 (Coralville, IA)가 합성하였다. 이 방법은 또한, 조직 내의 외인성 DNA를 분석하기 위해 사용되어 왔다. 표준물을 상기와 같이 제조하였다. 이어서, 샘플을 아가로스 겔, 블로팅 및 혼성화에 의해 분석하였다. 10배 내지 50배 과량의 프로브를 사용하여 모든 밴드의 포화도를 보장하였다. IMAGEQUANT<sup>®</sup> 소프트웨어 (공급처: Molecular Dynamics)를 이용하여 스캐닝된 자가방사선상을 정량화하고, 이를 표준물과 비교함으로써 플라스미드 DNA 양을 계산하였다. 이러한 비-방사성 방법의 민감도 수준이 너무 낮을 경우,  $\gamma$ <sup>32</sup> P-ATP를 이용한 5' 말단 표지화를 사용할 수 있거나 기존에 보고된 바와 같이 축소 PCR을 수행할 수 있다 [참고: Fernandez J., et al., *J. Virol.*, 78, 9782-9789 (2004)]. 혈액 및 간 중에서의 DNA를 평가하기 위한 양 방법론을 이용하는 것이, 한 가지 방법은 성공적이지 못해야 한다는 수득 결과를 보장해준다. 시험을 세 번 되풀이 하여 수행하고, 각 동물로부터의 순차적 혈장 샘플 중의 혈장 수준을 t-시험을 이용하여 15분째에 관찰된 것과 통계적으로 비교하여 시간 경과에 따른 DNA 농도 상의 상당한 감소를 평가하였다. 통계적 비교가 간에 대해서는 이루어지지 않았는데, 이는 이러한 조직에 대한 연구는 시간 경과에 따른 안정성이 아니라 상기 기관 중에서의 DNA의 존재를 입증하는 것이기 때문이다.

[0161]

**E. 만성적으로 감염된 침팬지에게 정맥내 접종한 후 scLHK-HCV 복합체에 대한 반응을 시험한다**

[0162]

1. 말초혈에서의 면역 반응을 평가한다

[0163]

치료 백신을 투여한 만성적으로 HCV 감염된 침팬지의 말초혈에서의 특이적 T 세포 활성 증가가 간에서의 보다 높은 T 세포 활성과 바이러스 역가 감소를 반드시 가져다 주진 않는다. 따라서, 이들 동물의 간에서의 T 세포 침윤과 사이토킨 반응을 분석하는 것이 중요하다. 그러나, 유도된 면역 반응의 특이도와 정도를 평가하기 위한

제1 공급원으로서 말초혈을 사용할 수 있다. 간 생검은 값비싸고 제한되므로, 말초혈로부터 더 많은 T 세포를 수득하였다. 간 연구를 이용하여 말초혈에서의 면역 반응 증가가 간에서의 보다 큰 T 세포 활성화와 상관 관계가 있는지를 결정하였다. 당해 분야에서 기존에 보고된 바와 같이 피콜 구배 원심분리를 이용하여 격주로 수득한 전혈로부터 PBMC를 분리하였다 [참고: Puig M., et al., *Vaccine*, 22, 991-1000 (2004)]. 구배 상단으로부터 혈장을 꺼내고, 이를 1 ml 및 200  $\mu$ l 분취액 중에서  $-80^{\circ}\text{C}$  하에 저장하였다. 대략  $10^8$ 개 PBMC 및 15 ml의 혈장을 40 ml의 전혈로부터 수득하였다. 동결된 세포의 단일 분취액 ( $10^7/\text{ml}$ )을 해동시키고, AIM-V 배지 (공급처: Invitrogen) + 2% 인간 AB 혈청 (공급처: Biowhittaker)에서 세척하였다. 생존 세포 수를 평가하고 세포를 엘리크스에 의해 시험하였다 [참고: Shoukry N.H., et al. *J. Exp. Med.*, 197, 1645-1655 (2003)]. 각 분석에 사용된 세포의 총 수는 하나의 검정에서 시험된 항원의 수에 좌우된다. 1a 게놈을 포괄하고 이에 상응하는 중복 펩티드의 전 패널을 사용하였다 (11 aa가 중복되는 18량체; 공급처: NIH Reagent Program). 이들 펩티드는 침팬지를 감염시키기 위해 사용된 바이러스에 상응하고, scL-HCV 또는 scLHK-HCV 중의 HCV 플라스미드에 사용된 서열과 상응한다. 샘플을 스크리닝하기 위한 30 내지 45개 중복 펩티드를 함유하는 10개 펩티드 풀을 사용하였다. 음성 오브알부민 펩티드 대조군, 양성 식물적혈구응집소 대조군 및 매질 대조군이 각 검정에 포함되었다.  $10^5$ 개 세포/웰을 이용하여 샘플을 세 번 되풀이 하여 시험하였다. 전체 바이러스성 게놈을 포괄하는 펩티드에 대항하여 샘플을 시험하였다. 백신이 항원 NS3-NS5B에 대한 반응을 자극하는 것으로 예상되긴 하지만, 이러한 자극은 T 헬퍼 반응을 개선시키거나 또는 IL-2 생성을 증가시켜 해당 백신에 포함되지 않은 바이러스 항원에 대한 반응을 증강시킬 수 있다. PBMC의 예비-자극 및 IFN  $\gamma$ , IL4, IL2 및 IL10을 생산하는 세포의 엘리크스 분석은 96-웰 판에서 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 각 개별적 펩티드 및 인간 엘리크스 시험 키트 (공급처: U-Cytech, Netherlands) [참고: Shoukry N.H., et al. *J. Exp. Med.*, 197, 1645-1655 (2003)]에서 수행하였다. 특이적 반점 형성 단위 (SFU) 수는 세 번 되풀이하여 수행한 시험 웰의 평균 값에서 세 번 되풀이하여 수행한 대조군 (항원 없음)의 평균 값을 공제함으로써 계산하였다. 96-웰 판 ( $10^5$  세포/웰, 3회)을 이용하여 당해 분야에서 기존에 보고된 바와 같이 PBMC 상에서 T 세포 증식 검정을 수행하였다 [참고: Puig M., et al., *Vaccine*, 22, 991-1000 (2004)]. 세포를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 단백질 (NS3, NS5A 또는 NS5B) (공급처: Mikrogen, Germany) 또는 펩티드로 자극하였다. 나중 연구를 위해, 항-인간 CD4+ 또는 CD8+ 다이나비드 (dynabead) (공급처: Dynal) [참고: Puig M., et al., *Hepatology*, 44, 736-745 (2006)]를 이용하여 총 집단으로부터 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 고갈시키고 시험하여 특이적 항원을 인식하는 특이적 세포 유형을 결정하였다. 이들 연구로부터 생성된 데이터는 증강된 HCV-특이적 T 세포 반응의 가장 우수한 지표를 제공해준다. 각 동물에 대한 백신 접종 전 샘플과 백신 접종 후 샘플 간의 결과를 비교하였다. t-시험을 사용하여 백신 접종 후 SFU에 있어서의 상당한 증가를 평가하였다. 말초혈에 대한 연구 결과를 간내 T 세포 침윤, 사이토킨 반응 및 바이러스성 RNA 수준 상의 변화 분석과 연계시켜 본 치료 전략의 효능을 결정하였다.

## [0164] 2. 혈장 사이토킨 수준 상의 변화 탐지

타고난 본래의 침팬지에게 scL-HCV를 접종한 후 혈청 사이토킨을 분석한 결과, 백신 접종한 동물에게서는 사이토킨 (ICAM-1, TGF- $\beta$  및 IFN- $\beta$ ) 수적 변화가 나타났지만, 대조군에서는 그렇지 않았다. 치료 백신 접종 후 혈청 사이토킨 패널 상의 변화를 조사하고, 이를 전처리 샘플 및 대조군 동물과 비교하였다. 백신 접종 전 및 백신 접종 후에 취한 혈장 1 내지 2 ml을 이용하고 트랜스시그널 (TransSignal) 인간 사이토킨 항체 어레이 키트를 사용하여 사이토킨을 분석하였다. 감염되지 않은 침팬지로부터의 정상적인 혈청이 음성 대조군으로서 포함되었다. 혈청 사이토킨에서 관찰된 변화 (유형 및 수준 상 변화)를 간에서의 mRNA 수준상 발견된 것과 비교하였다. mRNA의 간내 분석에 덧붙여 혈청 사이토킨에 대한 이들 연구를 수행하였다. mRNA 분석을 정량화하고, 통계적으로 분석하여 간에서의 사이토킨 수준의 지표를 제공한다. 이들 분석 결과를 연계하여 말초혈에서의 반응이 간에서 관찰된 것에 영향을 미치는지를 결정하는 것이 중요하다. 사이토킨 패턴 상의 모든 변화는 기억 T 세포의 영속성과 상관 관계가 있다. 양성적 상관 관계는 제거와 연관된 특이적 T 세포의 존재를 결정하는 보다 단순화된 수단 개발을 위한 첫 번째 단계이다.

## [0166] 3. 조직학적 및 사이토킨 분석에 의한 간에서의 HCV-특이적 반응 평가

### a) 간 침윤성 T-세포의 존재를 알아보기 위한 시험

조직학적 분석 및 사이토킨 반응에 의해 간에서의 침윤성 T 세포의 흔적에 관하여 시험하였다. 치료 백신을 투여한 만성적으로 감염된 침팬지의 말초혈에서의 HCV-특이적 T 세포 활성화 증가가 간에서의 보다 높은 T 세포 활성화와 바이러스 역가 감소를 반드시 가져다 주진 않는다. 따라서, 이들 동물의 간에서의 T 세포 침윤과 사이토

킨 반응을 분석하는 것이 중요하다.

[0169]

b) 포르말린-고정된 간 조직의 분석:

[0170]

포르말린 고정된 파라핀-봉매된 조직을 박편화하고, 특이적 단백질 및 세포 마커에 대해 염색하였다: CD4; CD8; 페르포린 (Perforin); IFN- $\gamma$ ; IL-2; CD45RA/RO 및 CCR-7. CD45RA 및 CCR7의 발현을 기준으로 하여 T 세포 집단을 확인할 수 있다 [참고: Campbell J.J., et al., *Journal of Immunology*, 166, 877-884 (2001); Sallusto F., et al. *Nature*, 401, 708-712 (1999); Seder R.A. and Ahmed R., *Nature Immunology*, 4, 835-842 (2003)]. 간 박편의 면역조직학적 분석을 수행하여 각 생검에 대해 간에 존재하는 림프구의 수, 유형 및 위치를 구별하였다. 박편을 크실렌에서 탈파라핀화하고, 알코올에서 수화시킨 다음, PBS에서 세척하였다. 항원 회복을 위해, 조직을 100°C 하에 10분 동안 10 mM 시트레이트 완충액 pH 6.0으로 처리하였다. 조직 박편 상의 비-특이적 부위를 5% 밀크로 차단시킨 후, 특이적 항체와 함께 항온 배양하였다. 감염 전 (조직학적으로 저장된 샘플) 및 처리 이전 동일한 동물로부터 수득한 간 생검을 비교용으로 사용하였다. 이들 연구는 DAB를 이용하여 개발된 생성물 및 표지된 스트렙타비딘-바이오틴 기술을 사용하여 수행하였다. 처리 전 및 처리 후 박편에 대한 6개 시야를 분석하고, 양성 세포 유형을 계수하였다. 이러한 염색 방법을 이용하여, 간 문맥 또는 특별한 간 세포 유형과 비교하여 간 내에서의 세포 위치를 평가하였다. T 세포 침윤에 대한 t-시험을 이용하여 통계적 분석을 수행하였다.

[0171]

c) 순간-동결시킨 간 조직의 분석:

[0172]

RNeasy 미니 키트 (공급처: Qiagen, CA)를 이용하여 순간 동결시킨 조직 일부로부터 총 RNA를 단리하였다. 제1가닥 cDNA 합성 키트 (공급처: Pharmacia)를 사용하여 RNA를 역전사시키고, 당해 분야에서 기존에 보고된 바와 같이 [참고: Major M.E., et al. *Hepatology*, 39, 1709-1720 (2004)] IFN- $\gamma$ , IL2, CD3, CD8, 및 CD4에 대한 특이적 프라이머 프로브 세트를 이용하여 사이토킨 mRNA 수준에 관하여 실시간 PCR함으로써 시험하였다. 이들 사이토킨 수준을 내인성 대조군 (GAPDH)에 대해 표준화시키고, 각 동물에 대한 전처리 생검에서의 수준과 통계적으로 비교하였다 [참고: Thimme R., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 15661-15668 (2002)]. 이와 동시에 동결된 간 조직의 소 분획을 이용하여, 트랜스시그널 인간 사이토킨 항체 어레이 키트 (공급처: Panomics)를 사용하여 36개 사이토킨 패널의 단백질 수준을 동시에 분석하였다.

[0173]

## F. 독성 평가

[0174]

만성적으로 감염된 개체에서 간 관련 치료 백신의 효과를 연구하는 것이 특히 중요하다. 이러한 백신이 바이러스성 역가를 감소시킬 수는 있지만, 간에서의 면역 반응 증강으로 인해 간염이 악화되어 간 질환을 유발시킬 수 있다. 침팬지로부터의 혈청 및 간 조직을 대상으로 하여 간 특이적 효소 및 독성을 표시하는 조직병리학적 변화를 분석하였다. 간 기능에 대해 특이적인 마커 패널에 관하여 알아보기 위하여 상업적 실험 (ANTECH Diagnostics)에 의해 혈장 분취액 (2 ml)을 매주 시험하였다: 총 빌리루빈, ALT, 알칼리성 포스파타제 (ALP), 혈청 알부민,  $\gamma$ -글루타밀 트랜스퍼라제 (GGT) 및 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (GST). 접종 후 이들 마커 수준이 정상 범위 보다 <2주 동안 증가하는 것이 허용 가능한 것으로 간주된다. 정상 범위 보다 지속적으로 높은 수준은 독성을 표시한다. 이는 간 질환에 대해 특이적인 몇 가지 시험 중의 하나이기 때문에 [참고: McIntyre, N. and Rosalki, S. Biochemical investigations in the management of liver disease. In: Oxford Textbook of Clinical Hepatology McIntyre, Benhamou, Bircher, Rizzetto and Rodes (eds). Oxford University Press, 293-309. (1991)], 각 동물에 대한 처리 전 및 처리 후 ALT 수준을 비교하여 독성을 통계적으로 평가하였다.

[0175]

세포자멸 (apoptosis)을 평가하기 위하여, 계내 세포 사멸 탐지 키트 TMR 레드 (공급처: Roche)를 이용하여 변형된 형광 TUNEL 검정으로 조직을 염색하였다. 이러한 신호는 원적회선 범위에서 방출되고, 간 박편에서 세포 소멸에 대한 신호로서 FITC 보다 우수한데, 이는 적혈구가 아르곤 레이저 하에 자가-형광되기 때문이다. 형광 세기 및 분포도는 레이저 스캐닝 세포계수기 (LSC)를 이용하여 평가하였다. 이는 유동 세포계수기와 유사한 방식으로 수행되고 FITC, PE, PI, Cy5 및 DAPI를 탐지하는 슬라이드에 의거한 기기이다. 스캔 환경을 최적화하고, 이를 모든 샘플에 적용하는데, 배경, 음성 및 양성 신호를 측정하는 동일한 프로토콜이 사용된다. 히스토그램으로 디스플레이된 데이터는 컴퓨사이트 (Compucyte) 프로그램에 의해 신호를 통계적으로 분석시켜 줄 수 있고, 신호의 세기 뿐만 아니라 조직 내의 양성 세포소멸 신호 면적 (%)을 정량적으로 평가해줄 수 있다.

[0176]

조직병리학적 변화를 알아보기 위하여 광범위하게 인증된 수의 병리학자가 H&E 염색된 간 박편을 평가하였다. 만성 간염을 평가하기 위하여 이삭 (Ishak) 스코어링 시스템 (0 내지 4 등급)을 이용하여 처리 전 및 처리 후



박편에 등급을 매겼다 [참고: Ishak K., et al., *Journal of Hepatology*, 22, 696-699 (1995)]. 이는 간 생검에 등급을 매기기 위해 확립된 방법이고, 임상 환경에 광범위하게 사용되고 있다. 등급 매기는 것에는 간 문맥, 문맥 주변 및 선방내 염증성 세포 침윤 및 간 세포 손상 및 괴사를 평가하는 것이 포함된다. 간 독성을 분석하기 위한 이들 3가지 방법을 이용하여, 추가의 임상 사용에 대한 안전성을 평가하기 위해 상기 기관에 대한 상기 치료 백신의 효과의 전체 상 (complete picture)을 제공한다.

[0177] **G. 바이러스성 역가 상의 변화를 모니터링한다.**

[0178] 면역학적 반응의 일차 시험 및 scL-HCV 또는 scLHK-HCV 치료적 접근 방식의 성공은 혈중 HCV RNA 역가 상의 변화이다. 이는 사내 실시간 RT-PCR 검정을 이용하여 결정하였다 [참고: Major M.E., et al., *J. Virol*, 73, 3317-3325 (1999); Major M.E., et al., *J. Virol*, 73, 3317-3325 (1999)]. 트리졸 (TriZol) (공급처: Invitrogen)을 이용하여 처리 전 및 처리 후 혈액으로부터의 혈장 200  $\mu$ l로부터 총 RNA를 분리하고, 당해 분야에서 기존에 보고된 바와 같이 RT-PCR을 수행하였다 [참고: Major M.E., et al., *J. Virol*, 73, 3317-3325 (1999); Fernandez J., et al., *J. Virol*, 78, 9782-9789 (2004)]. 이러한 RNA를 복제 웰 (n=4) 간에 나누고, HCV RNA 표준물 세트를 이용하여 RNA 농도를 계산하며, 이를 RNA 카피/혈장 ml로서 표현하였다. 본 발명자들은 청정하고 제어된 조건 하에 HCV 서열을 증폭시키는 광범위한 실험을 수행하였다 [참고: Major M.E., et al., *J. Virol*, 73, 3317-3325 (1999); Fernandez J., et al., *J. Virol*, 78, 9782-9789 (2004)]. 오염을 피하기 위해 별개의 방에서 과정을 수행하고, 모든 경우에는 지정된 피펫과 시약을 사용하였다. 모든 추출에서는 감염되지 않은 침팬지로부터의 음성 대조군 혈장이 포함되었고, 추출된 RNA가 RT-PCR 검정에 사용되었다. 처리 전 및 처리 후 RNA 역가를 비교하여 역가에 있어서 통계상 유의적 변화를 결정하였다. 간 보다는 혈장을 대상으로 하여 바이러스성 RNA 역가에 관해 분석하였다. 간 생검은 제한되는데, 혈장에서의 역가가 간 내에서의 수준을 직접적으로 표시한다. 동물에게서 바이러스 제거가 나타난 경우에만, 보다 민감한 축소 PCR (이는 40 RNA 카피/ml 정도로 적은 수를 탐지한다)에 의해 바이러스성 RNA를 알아보기 위해 간을 시험하였다 [참고: Major M.E., et al. *Hepatology*, 39, 1709-1720 (2004), Puig M., et al. *J. Virol. Methods*, 105, 253-263 (2002)].

[0179] 표적화 치료 백신으로 인해 RNA 역가가 감소하고, 간내 T 세포, 간내 사이토킨 및 말초 HCV T 세포 반응이 증가하게 되면, 이는 HCV-특이적 반응이 특히 대조군 동물과 비교해서 간에서 기능적이라는 강력한 지표이다. 간내 T 세포와 사이토킨 수준은 증가하지만, 바이러스성 RNA 역가는 감소하지 않는다면, 이는 유도된 T 세포가 도피 돌연변이 또는 T 세포 기능이상으로 인해 바이러스성 에피토프를 인식하지 못하였다는 것을 제안하고 있다. RNA 역가가 일시적으로 감소한 다음, 처리 전 수준으로 회복되는 것은 새로이 유도된 T 세포 반응을 도피시키기 위해 바이러스에서 돌연변이가 발생하고 있다는 지표이다. 이는 처리 전 수준으로 회복되기 전 및 후에 바이러스의 서열 분석을 통하여 연구 조사되었다. 돌연변이가 관찰된다면, 이러한 돌연변이를 함유하는 것으로 밝혀진 영역 전반에 걸친 신규 및 기존의 아미노산 서열을 나타내는 펩티드 및 PBMC를 이용하여 시험관 내에서 T 세포 도피를 시험할 수 있다.

[0180] 만성적으로 HCV 감염된 침팬지에서의 상기 연구는 만성적으로 감염된 환자에게 사용될 수 있는 모든 HCV-특이적 치료 백신을 평가하는 데에 중요하다. HCV-특이적 T 세포 반응의 증강이 간 염증을 임상 치료에 허용되지 않는 수준으로 증가시키지 않는다는 것을 밝혀내는 것이 중요하다.

[0181] [실시예 2]

[0182] **면역리포솜의 비내 (IN) 투여**

[0183] IN 경로를 통한 백신 투여는 두경부 조직 (이에는 코 및 목구멍이 포함된다)에 대해 친화성인 것과 같은 특정 유형의 바이러스에 특히 유용하다. 이의 예에는 인플루엔자 뿐만 아니라 SARS 및 조류 독감을 포함하는 호흡기 질환을 유발시키는 바이러스가 포함된다. 그러나, 이러한 경로는 또한, 기타 유형의 백신을 전달하는 데에 사용될 수 있었다. IN 투여되는 경우에는 국소 조직을 표적으로 하여 이를 형질감염시킬 수 있는 scL 복합체의 능력을 비교하기 위하여, 비-종양 보유 BALB/c 마우스에게 루시페라제 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA를 피막화하는 scL 나노면역리포솜 복합체 (scLLUC), 또는 복합체를 형성하지 않은 (네이티브) 등량의 자유 플라스미드 DNA (LUC)를 투여하거나 (양 처리의 경우에 1회분당 10  $\mu$ g/마우스를 투여한다) 또는 처리하지 않았다 (CTL). scLLUC 복합체는 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 간단히 혼합함으로써 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였는데, 부형제로서 5% 텍스트로스를 이용하였다. 2회 용량을 24시간 이내에 투여하였다. 마지막으로 투여한지 48시간 후에, 동물에게 루시페린 기질을 약 3 mg/마우스로 주사하고 (복강내 투여), IVIS 100 광학 영상화 시스템 (공급처: Xenogen, Alameda CA)을 이용하여 마취 하에 완전 동물을 가시화하였다 (도 16a-16c). 발현된 신호 세기는 실제 측정치로 색상 표시하였다. 적색/황색은 가장 높은 세기를 나타내는데, 이는

형질감염된 루시퍼라제 유전자의 가장 높은 발현 수준에 상응하고, 반면 청색은 최소 발현을 나타내고, 녹색은 중간 수준의 발현을 나타낸다. 이들 발현 수준 (고/중간/최소)은 색상 표시 대신 도 16a-16c 및 17a-17c 상에 표시하였다. 도 16a-16c에서는, scL 복합체 (scLLUC)를 IN 투여하면 (패널 C) 네이키드 자유 DNA (LUC) (패널 B)와 비교해서 코 영역에서 훨씬 더 높은 수준의 형질감염/발현이 발생한다는 것은 명백하다. 패널 A는 처리되지 않은 대조군을 나타낸다. scL 나노면역리포솜 복합체가 네이키드 DNA (현재 사용되고 있는 바와 같음) 보다 훨씬 더 우수한 결과를 가져다준다는 것은, 이들을 둘 다 형질감염시키고자 하는 조직에 직접 투여하는 경우에 (국소 전달) 전혀 예상치 못한 놀라운 일이었다.

[0184]

A. 정맥내 투여 후 네이키드 DNA와 비교해서 플라스미드 DNA 페이로드의 증강된 분포도 및 국제화 입증

[0185]

IVIS 100 광학 영상화 시스템 (공급처: Xenogen, Alameda CA)을 이용하여, 루시퍼라제 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA를 피막화하는 scL 나노면역리포솜 복합체 (scLLUC) (상기와 같음), 또는 복합체를 형성하지 않은 (네이키드) 등량의 자유 플라스미드 DNA (LUC)를 정맥내 꼬리 정맥 투여 (양 처리의 경우에 1회분당 25  $\mu$ g/마우스를 투여한다)를 통하여 투여하였거나, 또는 처리하지 않은 (CTL), 비-종양 보유 BALB/c 마우스를 또한 영상화하였다. 2회 용량을 24시간 이내에 투여하였다. 마지막으로 투여한지 48시간 후에, 동물에게 루시페린 기질을 약 3 mg/마우스로 주사하고 (복강내 투여), 마취 하에 완전 동물을 가시화하였다. 도 17a-17c에 도시된 바와 같이, 꼬리 내의 주사 부위를 제외하고는 어느 곳에서도 네이키드 DNA (LUC)를 투여한 마우스에서는 명백한 신호가 없었다 (패널 B). (입 주변의 소량은 주사 부위에서 입맛을 다셨기 때문인 것으로 예상된다). 이와는 달리, 동일한 량의 플라스미드 DNA를 수반하는 scL 복합체 (scLLUC)를 정맥내 투여한 후에는 (패널 C), 동물 거의 전반에 걸쳐 중간 수준 내지 고 수준의 신호가 존재하였다. 패널 A는 처리되지 않은 대조군을 나타낸다. 림프절과 간이 위치한 부위에 보다 집중되어 있다. 이는 수지상 세포와 쿠퍼 세포가 트랜스펜린 수용체를 발현하므로, 복합체를 흡수할 수 있다는 사실 때문인 것으로 예상된다. 그러나, 정상적인 비-종양 조직에서도 이와 같이 고 수준의 흡수와 발현은 예상치 못한 놀라운 일이다.

[0186]

[실시예 3]

[0187]

마우스 모델을 이용하여 scL-HCV 또는 scLHK-HCV를 생체내 간세포로 전달하는 것을 최적화시킴.

[0188]

지질 A와 제형화시킨 scL 또는 scLHK를 마우스 연구에 사용하였다. 20 내지 30 마이크로그램의 DNA를 리포솜 복합체를 통하여, 24시간에 걸쳐 2 내지 3회 점종을 이용하여 꼬리 정맥을 통하여 복제 마우스에게 전달하였다. 리포솜이 특이적 세포 유형 내로 세포내 이입되는 것을 추적하기 위하여, 로다민-DOPE로 표시시킨 인지질을 총 지질 (공급처: Avanti Polar Lipids, AL)의 0.05 몰%로 사용하였다. 조직 샘플을 웨스턴 블롯에 의해 분석하고, HCV 특이적 단백질의 발현을 위해 주사한지 24 내지 48시간 후에 유동 세포계수법에 의해 세포의 조직학적 염색 및 고 해상도 영상화를 만들었다. 조직학적 분석을 위해, 조직을 조직-텍 배지에 순간 동결시키거나 포르말린 고정시켰다. 저온유지 장치 (cryostat) 또는 박절기 (microtome)를 이용하여 조직을 박편화하고 특이적 단백질 또는 세포 마커에 대하여 염색하였다. 파라핀-봉매된 포르말린 고정된 조직에 대해서는, 박편을 크실렌에서 탈파라핀화하고, 알코올에서 수화시킨 다음, PBS로 세척하였다. 항원 회복을 위해, 조직을 100°C 하에 10 분 동안 마이크로파에서 10 mM 시트레이트 완충액 pH 6.0으로 처리하였다. 냉각 및 세척한 후, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용하여 내인성 퍼옥시다제 활성 켄칭을 달성하였다. 이어서, 조직 박편 상의 비-특이적 부위를 5% 밀크 또는 정상 혈청으로 차단시킨 후, 특이적 항체와 함께 항온 배양하였다.

[0189]

유동 세포계수법에 의해 간 세포를 분석하기 위하여, 유동 세포계수법 분석을 위해 마우스로부터 총 간 세포 및 상주 T 세포를 분리시키는 관류 기술을 개발하였다. 마우스는 과정 내내 마취 하에 유지시켜 혈압이 초기에 유지되도록 하였다. 이로써 정맥 허탈이 방지되므로, 후속 캐놀라 삽입 성공율이 증가된다. 마우스는 이소플루오란으로 마취시키고 코 원뿔 부착을 통하여 본 과정 내내 마취시켜 두었다. 개복하여 간을 노출시키고, 내장을 마우스의 좌측에 옮겨 놓아 간 문맥을 노출시켰다. 24G 정맥내 주입 세트를 간 문맥 내로 삽입하였다. 간을 예비-가온시킨 간 관류 매질 (공급처: Gibco; 간 혈액을 깨끗하게 하고, 응고를 방지시키며, 세포 대 세포 접촉을 느슨하게 하는 것을 개시시키기 위해 제형화시킨 완충 벨런스 염 용액)로 5분 동안 3 ml/min으로 관류시켰다. 이어서, 예비-가온시킨 간 분해 매질 [공급처: Gibco; 살아있는 간 세포를 해리시키기 위한 것으로 자격을 갖춘 콜라게나제-디스파제 (Collagenase-Dispase) 매질]을 10 내지 12분 동안 3 ml/min으로 간 내로 관류시켰다. 이어서, 마우스로부터 간을 꺼내고, 이를 얼음 위에 놓아두었다. 간세포를 꺼내고, 100  $\mu$ m 체 내로 통과시킨 다음 저속 원심분리함으로써 세포 부스러기로부터 정제하였다. 로다민 표지된 리포솜을 이용하여, 세포를 유동 세포계수법에 의해 직접 분석하여 리포솜/DNA 복합체의 형질감염 효율 또는 세포성 국제화를 결정할 수 있다. 유동 세포계수법을 이용하여, 상기 복합체가 간 세포 내로 흡수되는 것을 비장 세포에 의한 흡수 또는

비-표적화 리포플렉스에 의한 흡수와 비교하였다. 저속 원심분리에 의해 세포를 비장 세포 부스러기로부터 분리시켰다. 적혈구를 ACK 용해 완충액 (공급처: Biowhittaker, MD)으로 용해시키고, 세척한 후, 세포를 100  $\mu$ m 세포 거르개 (공급처: Falcon, BD, NJ) 내로 통과시켰다. 부가의 조직을 꺼내어 DNA가 기타 기관 내로 흡수되는 것을 분석하였다. 구체적으로 언급하면, 신장, 심장 및 폐 조직을 꺼내고 단백질 추출물을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.

[0190] A. 생체내 효능을 알아보기 위한 scL-HCV 또는 scLHK-HCV의 용량 최적화

[0191] BALB/c 마우스를 사용하여 지속성 간 효소 상승 부재하에서 우수한 면역 반응을 달성하기 위한 최적의 생물학적 용량 (OBD)을 결정하였다. 대조군으로서, HCV 유전자가 결여된 비-재조합 아데노바이러스 및 빈 벡터를 수반하는 자유 (복합체를 형성하지 않음) 플라스미드, 변형된 리포솜을 사용하였다. 군당 5마리 동물을 사용하였다. 투여되는 가장 높은 용량은 약 50  $\mu$ g이다. 마우스 군에게 1회 주사당 1, 5, 10, 20, 및 50  $\mu$ g을 함유하는 리포솜/DNA 복합체 (실시에 1에 기재된 바와 같이 제조됨)를 정맥내 주사하였다. 이들에게 0주 및 4주째에 접종한 다음, 10주째에 아데노바이러스 부스팅하였다. 이와 같이 부스팅한지 4주 후에, 간 및 비장을 유동 세포계수법으로 분석하고, 시험관내 시험하여, 상기 언급된 바와 같은 면역을 통하여 유도된 T 세포의 특징과 특이성을 결정하였다. 이러한 실험을 단순화시키기 위해, 대조군 동물에게는 가장 고 용량의 DNA와 아데노바이러스 만을 투여하였다. 동물을 대상으로 하여 간 효소 및 간에서의 조직학적 변화에 관하여 모니터링하였다. 일단 OBD가 확립되면, 상기 용량을 각 주사시에 사용하지만, 주사 횟수는 4주 간격으로 1회 내지 5회로 다양하며, 이어서 마지막으로 주사한지 6주 후에 아데노바이러스 부스팅하였다. 4주 후에 간 및 비장을 상기와 같이 분석하여 최적의 반응을 가져다 주는 주사 횟수를 결정하였다.

[0192] B. 유도된 T 세포 반응의 교차 반응성

[0193] 미국 내에서 주요 HCV 유전자형은 1a이긴 하지만, 백신 개발에 있어서는 하나 이상의 HCV 유전자형으로부터 바이러스성 에피토프를 인식하는 것에 역점을 둘 필요가 있다. 유전자형 1b 및 2a로부터의 컨센서스 서열에 상응하는 중목 펩티드를 이용하여 마우스에서 유도된 면역 반응의 교차 반응성을 평가하였다. 1a H77 게놈서열에 상응하는 중목 18량체 펩티드의 완전 세트가 다음 프로그램 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)에 의해 제공되었다. 이와 동일한 프로그램으로, 1b J4 유전자형에 상응하는 유사한 중목 펩티드 세트를 입수하였다. 유형 2 펩티드 세트는 다음 공급처로부터 구입하였다 [Mimotopes (Washington, NC)]. 환자 집단에게서 일어날 수 있는 교차 반응성을 보다 잘 평가하기 위하여, 이들 분석을 상기 언급된 HLA-A2 트랜스제닉 마우스를 이용하여 수행하였다. 이들 마우스는 HLA-A2 MHC 분자를 발현하고, HLA-A2 에피토프를 제시할 수 있다. 상이한 유전자형을 나타내는 펩티드 풀에 대한 반응을 엘리스팟 검정으로 평가하고, 면역을 위해 사용되고 있는 1a H77 서열에 상응하는 펩티드와 병행해서 수행하였다. 교차 반응성이 관찰되지 않는 경우에는, 3가지 모든 유전자형에 상응하는 DNA 플라스미드를 함유하는 나노리포플렉스를 이용하여 3가 백신을 시험한 다음, 상기 3가지 상이한 유전자형에 각각 상응하는 3개의 rAd를 이용하여 부스팅해야 한다. 각 개별적 유전자형에 대한 면역 반응을 평가하고, 개별적 유전자형 서열 단독을 이용하는 경우에 수득된 반응과 비교하였다.

[0194] C. 생체내 안전성 연구

[0195] scL-HCV 또는 scLHK-HCV의 마우스 LD<sub>10</sub>는 상기 언급된 바와 같이 결정된 OBD에 기초한 것이다. OBD로 출발하여 증가 용량의 플라스미드 DNA (100  $\mu$ g 이하)를 5주 동안 주 1회 주사하였다. 복합체 중의 성분 비는 설정되어 있기 때문에, 플라스미드 DNA의 양이 증가하게 되면 복합체 (실시에 1에서와 같이 제조됨) 중의 TfRscFv 및 Lip 또는 Lip-HK의 양이 또한 증가하게 된다. scL-HCV 또는 scLHK-HCV를 4 내지 6주생 숫컷 및 암컷 BALB/c 마우스 (군당 10마리 마우스) 내로 정맥내, 복강내, 근육내 또는 피내 주사하였다. 동물의 체중을 매주 2회씩 평가하고, 이를 대상으로 하여 독성 징후 (예: 쇠약)에 관하여 매일 모니터링하였다. 자유 플라스미드 DNA 또는 리간드 결합되지 않은 리포솜-DNA를 투여한 동물을 대조군으로서 사용하였다. 단기간 독성을 평가하기 위하여, 마지막으로 주사한지 2일 후에 마우스 절반을 희생시켰다. 나머지는 마지막으로 투여한지 2주 후에 희생시켜 장기간 독성을 평가하였다. 간, 생식샘, 폐, 췌장, 신장, 심장, 피부, 비장, 뇌, 소화관 및 골수를 포함한 각종 기관 및 조직을 조직학적으로 조사하였다. 간 효소 수준을 또한, 매주 모니터링하였다 (Antech Diagnostics). 기관으로부터의 조직 샘플을 순간 동결시키고, DNA 추출을 위해 -70°C 하에 저장하였다. 모든 조직 샘플에 대해 PCR 분석을 수행하여, 접종 후 모든 조직에서 DNA의 영속성과 scLHK-HCV의 생체내 분포도를 평가하였다. HCV 유전자에 대해 특이적인 프라이머가 이용 가능하다.

[0196] 일단 DNA/리포솜 복합체에 대한 LD<sub>10</sub>이 확립되면, 다음 1 단계 용량을 증가 용량의 재조합 아데노바이러스와 병

행해서 사용하여 슛컷 및 암컷 BALB/c 마우스를 치료하였다. 10마리 마우스 각 군에게 scL-HCV 또는 scLHK-HCV (실시에 1에서와 같이 제조됨)을 5주 동안 매주 1 또는 3회씩 정맥내, 복강내, 근육내 또는 피내 주사한 다음, 증가 용량의 재조합 아데노바이러스 ( $10^8$  내지  $10^9$  감염성 단위)를 3주 동안 매주 2회씩 피하 (s.c.) 투여하였다. 상기와 같이, 마지막으로 투여한지 2일 후에 마우스 절반을 희생시켜 단기간 반응을 평가하고, 나머지 절반은 2주 후에 희생시켜 장기간 반응을 평가하였다. 생식샘, 폐, 췌장, 신장, 심장, 피부, 비장, 뇌, 소화관 및 골수를 포함한 기관 및 조직을 조직학적으로 조사하였는데, 간 조직학이 특별히 강조되었다. 이러한 연구 동안에 혈액을 채집하고 간 효소를 매주 평가하였다. 비장을 꺼내고 T 세포 반응에 관하여 분석하여, 이들 동물에게서 관용되는 어떠한 유도도 발생되었는지를 평가하였다.

[0197]

혈장 약동학적 분석 및 생체내 분포 연구를 슛컷 및 암컷 누드 마우스에서 수행하였다. 이러한 동물에게 scL-HCV 또는 scLHK-HCV 복합체 (실시에 1에서와 같이 제조됨)를 OBD에서 1회씩 정맥내, 복강내, 근육내 또는 피내 주사하였다. 복합체 투여 전 및 투여 후 5분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 72 시간째에 항응고제로서 나트륨 헤파린을 함유하는 튜브에서 마취 하에 심장 천자를 통하여 혈액 샘플을 수득하였다. 마우스를 안락사시키고, 간, 췌장, 생식샘, 비장, 신장, 폐, 심장, 림프절 및 뇌를 신속하게 절개하고, 빙냉 정상 식염수에서 세정한 다음, 드라이 아이스 상에서 순간 동결시켰다. 혈액 샘플을 4℃ 하에 10분 동안 3000 rpm으로 원심분리시켜 혈장을 세포로부터 분리시켰다. 혈장과 조직 샘플 둘 다를 -80℃ 하에 저장하였다.

[0198]

혈장 및 조직 샘플 중에서의 HCV 플라스미드 농도를 결정하였다. 간략하게 언급하면, 플라스미드 DNA는 페놀-클로로포름 추출 방법을 이용하여 혈장 샘플로부터 분리시키고, DNA 추출 키트 (공급처: Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 조직 샘플로부터 분리시켰다. 블랭크 혈장 또는 블랭크 조직 샘플 중의 공지된 양의 플라스미드를 가한 다음, 추출시킴으로써 HCV 농도 표준물을 제조하였다. 이어서, 이러한 추출물을 아가로스 겔에 의해 분석하고, 블롯팅 및 혼성화하였다. 혼성화는 프로브로서 HCV 서열을 이용하는 유전자 영상 알칼리성 포스파타제 DNA 표지화 및 탐지 시스템 (공급처: Amersham)을 사용하여 수행하였다. 10배 내지 50배 과량의 프로브를 사용하여 모든 밴드의 포화도를 보장하였다. 자가방사선상을 스캐닝하고, IMAGEQUANT<sup>®</sup> 소프트웨어 (공급처: Molecular Dynamics)를 이용하여 정량화하며, 각종 샘플 중의 플라스미드 DNA 양을 표준물과 비교함으로써 계산하였다. 또 다른 한편으로, 프로브를  $\gamma$  <sup>32</sup> P-ATP로 5'-말단 표지시키거나 또는 HCV에 대해 특이적인 촉진 PCR을 수행하였다. 혈장 약동학적 파라미터를 표준 방법에 의해 평가하였다 [참고: 예를 들어, Gokhale, P. C, et al., *Gene Therapy* 4: 1289-1299 (1997)].

[0199]

영장류에서 간 표지화의 안전성과 효능을 평가한다.

[0200]

scL-HCV 또는 scLHK-HCV (실시에 1에서와 같이 제조됨) 및 아데노바이러스 재조합체를 이용하여 붉은털 원숭이에서 용량 반응 연구를 수행하였다. 특이적 기억 마커를 수반하는 가장 우수한 HCV-특이적 T 세포를 유도시키는 면역 시스템 및 투여량을 붉은털 원숭이 모델에서 출발 용량으로서 사용하였다. 붉은털 원숭이에게 scL-HCV 또는 scLHK-HCV를 접종하고, 피하 전달된  $10^{12}$  감염성 단위 이하의 재조합 아데노바이러스로 부스팅하였다. 제안된 백신 접종 섭생은 0개월 및 3개월째에 DNA 프라이밍 및 부스팅한 다음, 6개월째에 아데노바이러스로 부스팅하는 것으로 이루어진다. 대조군에게는 빈 벡터 자유 플라스미드 DNA와 복합체 형성한 scL-HCV 또는 scLHK 및 비-재조합 아데노바이러스를 접종하였다.

[0201]

첫 번째 연구는 4개 군 (3개는 백신 접종하였고, 1개는 대조군이다) (군당 2마리 마우스이다)을 사용하였다. 군 1 내지 3에게는 상기 언급된 마우스에서 용량 최적화 연구로부터 결정된 수준으로 rAd 접종하면서, 증가 용량의 나노복합체 scL-HCV 또는 scLHK-HCV를 투여하였다. 군 4는 대조군인데, 이에는 scL 또는 scLHK-빈 벡터를 투여한 다음, 비-재조합 아데노바이러스로 부스팅하였다. 반응이 안정 수준에 도달한 것이 관찰되면, 안정 수준 중앙에 있는 scL-HCV 또는 scLHK-HCV 용량에서 나머지 4마리 동물을 이용하여 면역 연구를 수행하고 rAd 용량을 0.5 log<sub>10</sub> 정도 증가시켰다 (동물 2개 군, 군당 2마리 동물, 2개 증가 용량의 rAd). 연구 1에서 대조군으로부터의 데이터는 이들 동물에 대한 대조군 데이터를 제공한다. 안정한 수준에 도달한 것이 관찰되지 않고 최소 ALT 상승을 수반하는 단계적 용량 상승과 비교해서 면역 반응이 증가하는 경우에는, 증가된 용량의 scLHK-HCV를 이용하여 나머지 4마리 동물에게서 두 번째 연구를 수행하였다.

[0202]

백신 접종한 짧은 꼬리 원숭이에서는, 엘리스포트, 유동 세포계수법 및 조직학적 분석을 이용하여 말초혈과 간 둘다에서 특이적 면역과 기억 T 세포의 명백한 증거를 평가하였다. 경피 간 생검을 매달 2회 수행하였는데, 조직 샘플의 절반은 배양 배지에 놓아두고, 1/4은 액체 질소에서 순간 동결시키며, 나머지 1/4은 포름알데히드에 고정시켰다. 간 박편을 면역조직학적 분석하여 각 접종 후 2 내지 4주 간격으로 간에 존재하는 림프구의 수, 유



형 및 위치를 구별하였다. 상기 중에서 기억 T 세포 서브세트를 확인하는 데에 유용한 마커인 것으로 여겨지는 CD95, CD45RA/CD45RO, CD62L 및 CD28의 발현을 평가하였다.

[0203]

붉은털 원숭이의 일배체를 결정하였는데, 이는 말초혈에서 확인된 T 세포 에피토프를 사용하였다. 사량체를 만들고 이를 사용하여 상기 마우스 T 세포 분석에 대해 기재된 바와 같은 유동 세포계수법 분석에 의해 기억 T 세포의 특이성을 나타내었다. 공지된 T 세포 에피토프 및 다중색 유동 세포계수법 표현형을 이용하여, 극히 소수의 세포를 사용하여 T 세포와 연관된 사이토킨 및 세포용해 분자를 평가할 수 있다. 혈액을 대상으로 하여 ALT 상승에 관하여 분석하고, 조직을 세포소멸 마커에 대해 염색하여, 간내 세포가 프라이밍 동안 유도된 HCV 항원에 대해 특이적인 세포독성 T 림프구 (CTL)의 작용으로 인해 세포소멸을 진행하는 지를 결정하였다.

[0204]

E. 만성 침팬지를 리포솜/DNA 복합체로 처리함

[0205]

scL-HCV 또는 scLHK-HCV/아데노바이러스 백신을 만성 침팬지에서 치료 백신으로서 사용하였다. 만성적으로 감염된 4마리 침팬지는 모두 유전자형 1a (H77 균주)에 상응하는 단일 서열 모노클로날 바이러스로 초기에 감염되었다. 이들 동물은 3.5 내지 5년 동안 만성적으로 감염되어 왔다. HCV는 RNA 바이러스이므로, 게놈은 복제 동안 돌연변이를 진행한다. 상기와 동일한 모노클로날 스톱을 접종한 후 지속적으로 감염된 동물로부터의 바이러스에서는 감염 약 6개월 후에 돌연변이가 서서히 늘어나는데, 이는 면역 압력에 따른 결과인 것으로 추정된다. 감염 후 38주째에 Ch6412로부터 단리된 바이러스에 대한 서열 데이터를 제조하였다. 전체 코딩 영역을 분석한 결과, 9개 아미노산에서 변화가 있었는데, 그 중 6개가 NS3, NS5A 및 NS5B 영역에 위치하였다. 이들 돌연변이가 순환성 바이러스 게놈에 존재함에도 불구하고, 이들 동물에서는 야생형 서열을 치료 백신에 사용하였다. 잘 보존된 에피토프의 수에 상응하는 야생형 서열을 사용하는 것이 바이러스성 역가를 감소시키는 데에 유효하다. 일차 종말점으로서, 이차 종말점으로서의 처리 전 수준과 비교해서 각 동물의 혈청에서 바이러스성 RNA 역가 상의 감소를 평가하였다. T 세포 활성 증가가 간에서 측정되었고, 이는 간내 사이토킨 mRNA 수준을 증가시켰다. 처리 전 수준과 비교해서 RNA 역가가 0.5 log<sub>10</sub> 이상 감소하고 T 세포 수 또는 사이토킨 mRNA 수준이 2배 이상 증가하는 것은 유의적인 것으로 간주되었다. 2마리 동물에게 치료 백신을 접종하고, 2마리 동물에게 벡터 대조군을 접종하였다.

[0206]

치료 백신의 경우에는, scL-HCV 또는 scLHK-HCV (실시에 1에서와 같이 제조됨)를 OBD에서 3주 간격으로 3회 정맥내 전달하거나, 또는 대조군 동물의 경우에는 빈 DNA 벡터를 전달하였다. DNA를 마지막으로 접종한지 4주 후에 (13주), 이들과 동일한 HCV 항원 또는 비-제조함 바이러스를 발현하는 제조함 아데노바이러스 (10<sup>12</sup> 감염성 단위, 정맥내)를 투여하였다. 동물을 6개월 정도 추적할 것이다. 연구 내내, 생검을 격주로 수득하고, 혈액 (20 내지 50 ml)은 매주 수득하며, 동물을 대상으로 하여 혈청 ALT 상승, HCV RNA 역가 및 간내 T 세포 침윤에 관하여 모니터링하였다. HCV의 5'UTR 및 코어 영역을 표적으로 하는 프로브 및 프라이머를 이용하는 실시간 RT-PCR 검정을 사용하여 HCV RNA 역가를 결정하였다. 엘리스프, 유동 세포계수법 및 조직학적 분석을 이용하여 말초혈과 간 둘 다에서 특이적 면역과 기억 T 세포 증강의 명백한 증거를 조사하였다. 경피 간 생검을 클라트스킨 (Klatskin) 기술에 의해 수행하였는데, 조직 샘플의 절반은 배양 배지에 놓아두고, 1/4은 액체 질소에서 순간 동결시키며, 나머지 1/4은 포르말린에 고정시켰다.

[0207]

F. 신선한 간 조직의 분석

[0208]

기계적으로 균질화시킨 다음, 세척 및 계수함으로써 림프구를 간 생검으로부터 단리시켰다. 세포를 CD4, CD8, CD45RA/CD45RO, CD95, CD62L 및 CD28에 대한 항체 (공급처: BD Pharmingen)로 염색시키고, 유동 세포계수법으로 그 수를 결정하였다. 사멸 세포를 배제시키기 위해 7AAD (공급처: BD Pharmingen)를 이용한 분석을 위한 소프트웨어 셀렉스트 (공급처: Becton Dickinson)를 사용하여 FACS-칼리버 (공급처: Becton Dickinson) 상에서 현상을 획득한다. 마우스 및 붉은털 원숭이 연구에 대해 기재된 바와 같이, 사량체를 사용하여 상기 처리된 침팬지로부터의 특이적 T 세포의 기능을 연구하였다.

[0209]

침팬지에서는 MHC 일배체형이 Patr (*Pan Troglodytes*) 유형인 것으로 공지되어 있다. 이들 Patr 대립 유전자 중의 몇 가지가 침팬지 및 만성 동물에 대해 확인되었으며, 이들 동물 각각으로부터의 T 세포에 의해 인식된 HCV 에피토프 서열 및 Patr 대립 유전자가 확인되었다. 이들 동물에서 순환되는 바이러스가 지속적 감염 동안 돌연변이를, 가능하게는 기존에 확인된 에피토프에 도입시켰다. T 세포 에피토프를 상세히 분석한 후, 유동 세포계수 분석에 사용하기 위하여 T 세포 에피토프를 이용하여 신규 사량체를 합성하였다. 장기간 분석을 위해 또한, T 세포 클론을 시험관 내에서 발생시켰다. 림프구를 100,000개 감마선 조사된 PBMC, 0.01 µg/ml의 항-CD3 및 100 U/ml의 IL-2로 클로닝하였다.

- [0210] G. 순간 동결시킨 간 조직의 분석
- [0211] RNeasy 미니 키트 (공급처: Qiagen, CA)를 이용하여 순간 동결시킨 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. 제1 가닥 cDNA 합성 키트 (공급처: Pharmacia)를 사용하여 RNA를 역전사시키고, IFN- $\gamma$ , CD3, CD8, 및 CD4에 대한 특이적 프라이머 프로브 세트 (공급처: Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA)를 이용하여 사이토킨 mRNA 수준에 관하여 실시간 PCR함으로써 시험하였다. 이들 사이토킨 수준을 내인성 대조군 (GAPDH)에 대해 표준화시키고, 각 동물에 대한 전처리 생검에서의 수준과 비교하였다. 사이토킨 mRNA 수준이 2배 이상 증가 또는 감소하는 것은 유의적인 것으로 간주된다.
- [0212] H. 포르말린-고정된 간 조직의 분석
- [0213] 박절기를 이용하여 포르말린 고정된 조직을 박편화하고, 특이적 단백질, 세포 마커 또는 세포소멸 마커에 대하여 염색하여 간내 세포가 백신 접종 동안 유도된 HCV 항원에 대해 특이적인 CTL 작용으로 인해 세포소멸을 진행하는 지를 결정하였다. 면역조직학적 분석을 간 박편 상에서 수행하여 각 생검에 대해 간에 존재하는 림프구의 수, 유형 및 위치를 구별하였다. 박편을 크실렌에서 탈파라핀화하고, 알코올에서 수화시킨 다음, PBS로 세척하였다. 항원 회복을 위해, 조직을 100°C 하에 10분 동안 마이크로파에서 10 mM 시트레이트 완충액 pH 6.0으로 처리하였다. 이어서, 조직 박편 상의 비-특이적 부위를 5% 밀크 또는 정상 혈청으로 차단시킨 후, 특이적 항체와 함께 항은 배양하였다. 감염 전 (조직학적으로 저장된 샘플) 및 처리 이전 동일한 동물로부터 수득한 간 생검을 비교용으로 사용하였다.
- [0214] I. 제1 상 임상 시험용 제제에서의 표준 약동학 및 독성학 연구
- [0215] 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 scL-DNA 또는 scL-HK-DNA 복합체의 저 용량 (OBD 또는 LD<sub>10</sub> 10배 미만) 및 고 용량 (OBD 또는 LD<sub>10</sub> 10배 초과)을 이용하여 1개 대조군 (30마리 마우스)와 2개 처리군 (각 30마리 마우스, 절반은 숫컷이고 나머지 절반은 암컷이다)으로 독성학 연구를 수행하였다. 상기 복합체를 상기 결정된 투약 스케줄에 따라서 1일째에 주사하기 시작하였다. 마지막으로 주사한지 2일, 3주 및 6주 후에, 각 군으로부터 10마리 마우스를 희생시켰다. 체중과 음식물 섭취량을 매일 모니터링하였다. 대조군 및 처리군에 대한 임상 병리학 (노 혈액학, 임상 화학, 구체적으로는 간 효소) 및 조직 병리학을 평가하였다. 다음 기관이 포함되었다: 주사 부위, 뇌, 췌장, 서혜부 림프절, 골수 (조직 및 도말 표본), 간, 신장, 고환/난소, 비장, 폐, 심장.
- [0216] 생체내 분포도 연구: 본 연구에는 복합체를 단일 주사한 후 4가지 시점 (2일, 2주, 4주 및 6주)에 최고 용량을 주사한 4개 처리군 (각 10마리 마우스) 및 1개 대조군 (10마리 마우스)이 포함된다. 모든 군에서 다음 기관에 대해 상기와 같은 DNA PCR에 의한 분석을 수행하였다: 간, 골수, 췌장, 신장, 비장, 주사 부위, 고환/난소, 서혜부 림프절, 폐, 심장, 뇌.
- [0217] [실시예 4]
- [0218] 화학적 접합에 의해 제조된 나노면역리포솜 복합체에 의해 인간에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도 시킴
- [0219] 본 발명은 또한, 바이러스 단백질 및 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자, 예를 들어 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 항원 유전자로서 작용하는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 하나 이상의 플라스미드를 포함하는 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 (및 기타 포유동물 및 동물)에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 각종 표적화 리간드를 포함하는 복합체는 리포솜의 표면과 직접 화학적으로 접합시킬 수 있고, 다음과 같이 필수적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다:
- [0220] MPB-리포솜은 문헌 [참고: Campbell MJ (Biotechniques 1995 Jun; 18(6): 1027-32)에 기재된 바로부터 변형된 에탄올 주사 방법에 의해 제조하였다. 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트-DOPE (MPB-DOPE) (공급처: Avanti Polar Lipids)가 리포솜 제형 [지질 A (DOTAP:DOPE, 1:1 몰비); 지질 B (DDAB:DOPE, 1:1 몰비); 지질 D (DOTAP:Chol, 1:1 몰비); 및 지질 G (DOTAP:DOPE:Chol, 1:1:1 몰비)]에 포함시켜 총 지질의 5 내지 8% 몰이 되도록 하였다. 간략하게 언급하면, 모든 지질을 에탄올에 가용화시키고 혼합한 다음, 해밀톤 주사기를 이용하여 50 내지 60°C의 소용돌이 치는 정제 수 내로 주사하였다. 이 용액을 10 내지 15분 더 와동시켰다. 최종 농도는 1 내지 2 mM 총 지질이다. 1 M HEPES, pH 7.5 (pH 7.0-8.0)을 10 내지 20 mM의 최종 농도에 가하였다. 말레이미드 기는 pH >7의 수성 용액에서 안정적이지 않기 때문에, 리포솜은 물 (pH 5-6.5)에서 제조하는 것이 적합하다. 1 M HEPES 완충액, pH 7.0-8.0을 이용하여 scFv-SH와 연결시키기 전에 pH 7.0-8.0으로 조정하여 코

탕 후 반응을 촉진시킬 수 있다.

[0221] scFv-SH 또는 -SH 기를 수반한 모든 항체 또는 항체 단편 (Fab' 또는 Mab 포함)을 MPB-리포솜에 약 1:1 내지 약 1:100, 적합하게 약 1:10 내지 약 1:50 (w:w), 보다 적합하게 약 1:20 내지 약 1:40, 예를 들어 1:30의 단백질/지질 비로 가하였다. 이 용액을 실온 하에 30분 동안 온화하게 회전 (약 20 내지 30 RPM)함으로써 혼합하여 scFv-Lip를 생성시켰다. 이러한 scFv-Lip를 정제하지 않고 사용하지만, 이를 세파로스 CL-4B 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. scFv-Lip-DNA 복합체를 생성시키기 위해, 플라스미드 DNA를 필요한 경우 물에 희석시키고 scFv-Lip에 약 0.5:1 내지 약 1:40 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ ), 적합하게 약 1:5 내지 약 1:20 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ ), 예를 들어 약 1:10 (총 핵산  $\mu\text{g}$ :지질  $\mu\text{g}$ )의 DNA/지질 비로 가하고, 혼합물을 5 내지 10초 동안 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시켰다. 최종 혼합물을 10 내지 15분 동안 실온으로 유지시키고, 대략 5분 후에 5 내지 10초 동안 다시 온화하게 전도시켰다. 생체 내에서 사용하는 경우에는, 50% 텍스트로스 또는 50% 슈크로스를 5 내지 20% (V:V)의 최종 농도에 가하고, 5 내지 10초 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하였다. 상기 scFv-Lip-DNA를 정제하지 않고 사용하지만, 이를 세파로스 CL-4B 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 80 내지 100%의 scFv (또는 -SH 기를 수반한 모든 항체)가 리포솜과 접합하는 것으로 예상된다.

[0222] 복합체와 연합/피막화하기에 앞서, 바이러스 항원 및 인터루킨을 코딩하는 플라스미드를, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰; 내지 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 몰의 삽입물 대 삽입물의 몰비로 함께 혼합하였다. 예를 들어, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 삽입물 1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 삽입물 1 몰의 몰비를 사용하였다.

[0223] 대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 HIV인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 외피 단백질 [참고: Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. Current Gene Therapy, 5:203-212; Ferrantelli, F. and Ruprecht, R.M. (2002): Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? Current Opinion in Immunology, 14:495-502] 및/또는 Nef 단백질 [참고: Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. Current Gene Therapy, 5:203-212; Lichterfeld, M., Yu, X.G., Cohen, D., Addo, M.M., Malenfant, J., Perkins, B., Pae, E., Johnston, M.N., Strick, D., Allen, T.M., Rosenberg, E.S., Korber, B., Walker, B.D., and Altfeld, M. (2004): HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. AIDS, 18:1383-1392]; 및/또는 gp140 [참고: Smith, S.M. (2002): HIV vaccine development in the nonhuman primate model of AIDS. Journal of Biomedical Science, 9: 100-111] 중의 하나 이상을 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨-2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0224] 대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 인플루엔자인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 적혈구응집소 (HA) [참고: Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. Japanese Journal of Infectious Diseases, 58:195-207; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. Japanese Journal of Infectious Diseases, 53:219-228], 및/또는 뉴라미니다제 (NA) [참고: Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. Japanese Journal of Infectious Diseases, 58: 195-207; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. Japanese Journal of Infectious Diseases, 53:219-228], 및/또는 뉴클레오펜시드 [참고: Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29] 및/또는 매트릭스

단백질 M2 [참고: Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0225]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 SARS인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 스파이크 당단백질, 및/또는 뉴클레오펜시드 및/또는 구조적 단백질 S1, 및/또는 구조적 단백질 M, 및/또는 구조적 단백질 N [참고: Weiss, S.R. and Navas-Martin, S. (2005): Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 69:635-664]을 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0226]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 조류 독감 (H5N1으로서 공지되기도 함)인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 적혈구응집소 [참고: Wong, S. S. and Yuen, K. Y. (2006): Avian influenza virus infections in humans. *Chest*, 129:156-168; Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K.G., Podda, A., Wood, J.M., Zambon, M. C, and Katz, J. M. (2005): Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *Journal of Infectious Diseases*, 191:1210-1215; Treanor, J. J., Wilkinson, B.E., Masseoud, F., Hu-Primmer, J., Battaglia, R., O'Brien, D., Wolff, M., Rabinovich, G., Blackwelder, W., and Katz, J.M. (2001): Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*, 19: 1732-1737]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0227]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 에볼라, 마르부르크 또는 모든 필로비리대 (filoviridae)인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, VP24, 및/또는 VP30, 및/또는 VP35, 및/또는 VP40, 및/또는 sGP, 및/또는 당단백질, 및/또는 핵단백질 [참고: Hart, M. K. (2003): Vaccine research efforts for filoviruses. *International Journal for Parasitology*, 33:583-595; Wilson, J.A., Bosio, C.M., and Hart, M.K. (2001): Ebola virus: the search for vaccines and treatments. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 58:1826-1841]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0228]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 B형 간염인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, B형 간염 표면 항원 (HBsAg) [참고: Hanke, T. (2006): On DNA vaccines and prolonged expression of immunogens. *European Journal of Immunology*, 36:806-809; Zuckerman, J.N. (2006): Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19:456-459], 및/또는 뉴클레오펜시드 (HBc) [참고: Michel, M.L. and Mancini-Bourguine, M. (2005): Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Virology*, 34 Suppl 1: S108-S114]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0229]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 서부 나일강 바이러스, 뎅기 열, 황열, 또는 모든 플라비비리대인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 대부분의 바이러스-중화항체를 유발시키는 단백질인 E-당단백질 [참고: Sampathkumar, P., "West Nile Virus: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Prevention," *Mayo Clinic Proceedings* 78:1137-1144 (2003); King, N.J.C., "Immunopathology of Flavivirus Infections, *Immunology*," *Immunology and Cell Biology* 85:33-42 (2007)]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유



전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

- [0230] 상기와 같이 제조된 최종 복합체의 크기는 적합하게, 말베른 ZETASIZER® 3000 또는 말베른 ZETASIZER® NANO-ZS를 사용하여 동적 광산란시킴으로써 측정된 바와 같이 양성 제타 전위를 수반한 약 50 내지 500 (nm)이다. 이러한 크기는 모세관 층을 효율적으로 관통하여 표적 APC 세포에 도달하기에 충분히 작다.
- [0231] 상기와 같이 제조된 복합체를 예방 또는 치료 백신으로서 사용한다. 예방용인 경우에는, 상기 제조된 바와 같은 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 기존에 바이러스성 질환에 노출된 적이 전혀 없는 포유동물 (예: 인간)에게 정맥내 주사하였다. 주사는 상기 복합체를 사용하여 0, 4 및 8주째에 수행하였다. 대상체에게 백신 접종하기 위해 사용된 복합체는 적합하게, 부형제로서 5% 텍스트로스를 이용하여 0.33  $\mu\text{g}$ :10  $\mu\text{g}$ :1  $\mu\text{g}$  (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 만들었다. 복합체 중의 DNA의 총 양은 1회 주사당 0.01 내지 10 mg/kg이다. 적합한 양은 대상체의 체중을 기준으로 하여 1회 주사당 0.164 mg/kg인데, 이는 1회 주사당 7 내지 12 mg DNA이다. 제조된 복합체는 정맥내 주입용 또는 정맥내 주사용의 250 ml 5% 텍스트로스 봉지 내로 주사하거나, 또는 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 주사하였다.
- [0232] 치료용인 경우에는, 상기와 같이 제조된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 바이러스성 질환 (예: B형 간염)에 만성적으로 감염되어 있거나 또는 바이러스성 질환 (예: 에볼라, SARS, H5N1, 두창, 서부 나일강 바이러스)에 급성 노출된 포유동물 (예: 인간) 내로 정맥내 주사하였다. 예방용인 경우와 동일한 범위 내의 DNA 양을 포함하는 복합체를 250 ml의 5% 텍스트로스 용액 중에서 정맥내 전달하거나, 또는 0, 4 및 8주째에 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 3회 주사하였다.
- [0233] [실시예 5]
- [0234] 단순한 혼합에 의해 제조된 나노면역리포솜 복합체에 의해 인간에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도 시킴
- [0235] 본 발명은 또한, 바이러스 단백질 및 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자, 예를 들어 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 항원 유전자로서 작용하는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 하나 이상의 플라스미드를 포함하는 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 (및 기타 포유동물 및 동물)에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 리포솜의 표면과 직접적으로 복합체를 형성하고/연합되지만, 화학적으로 결합되지 않는 각종 표적화 리간드를 포함하는 복합체는 다음과 같이 필수적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다:
- [0236] 리포솜 [지질 A (DOTAP:DOPE, 1:1 몰비); 지질 B (DDAB:DOPE, 1:1 몰비); 지질 D (DOTAP:Chol, 1:1 몰비); 및 지질 G (DOTAP:DOPE:Chol, 1:1:1 몰비)]을 문헌 [참고: Campbell MJ (Biotechniques 1995 Jun; 18(6): 1027-32)]에 기재된 바로부터 변형된 에탄올 주사 방법에 의해 제조하였다. 간략하게 언급하면, 모든 지질을 에탄올에 가용화시키고 혼합한 다음, 해밀톤 주사기를 이용하여 50 내지 60°C의 소용돌이 치는 정제 수 내로 주사하였다. 이 용액을 10 내지 15분 더 와동시켰다. 최종 농도는 1 내지 2 mM 총 지질이다.
- [0237] TfRscFv 또는 모든 항체 또는 항체 단편 (모든 scFv, Fab' 또는 Mab 포함)-면역리포솜 복합체는 TfRscFv를 리포솜 조성물 A (또는 상기 제공된 모든 리포솜 조성물)와, 혼합 복합체 중에서 규정된 비의 단일 쇠 단백질 대 리포솜 및 DNA로 혼합함으로써 제조하였다. 이러한 복합체의 제조는 다음 일반적인 과정에 따라서 수행하였다. 적당한 양의 2 mM 리포솜 (상기 언급된 A-H)을 목적하는 용적을 제공하는 데에 요구되는 모든 물 (예: DI 수)과 혼합하고, 온화하게 10회 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하였다. 이러한 리포솜-물 혼합물에, 적당한 양의 TfRscFv를 가하여 목적하는 비를 제공하고, 약 5 내지 10초 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하였다. 이 혼합물을 실온 하에 10 내지 15분 동안 유지시켰다 (대략 5분 후에 5 내지 10초 동안 다시 온화하게 전도시켰다). 이와 동시에, 적당한 양의 DNA를 5 내지 10초 동안 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하였는데, 목적하는 용적을 제공하기에 요구되는 모든 물을 사용하였다. 전형적으로, 생체내 사용하는 경우에는 1회 주사당 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 100 mg의 DNA를 제공하는 것이 바람직하다. 이러한 DNA 용액을 TfRscFv-리포솜 용액에 신속하게 가하고,

혼합물을 5 내지 10초 동안 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시켰다. 최종 혼합물을 10 내지 15분 동안 실온으로 유지시키고, 대략 5분 후에 5 내지 10초 동안 다시 온화하게 전도시켰다. 생체 내에서 사용하는 경우에는, 50% 텍스트로스 또는 50% 슈크로스를 5 내지 20% (V:V)의 최종 농도에 가하고, 5 내지 10초 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하였다. 1:30 (TfRscFv:리포솜, w:w) 및 1:14 ( $\mu\text{g}$  DNA:nmole 총 지질)의 적합한 비의 구체적 예는 다음과 같다: 최종 용적 800  $\mu\text{l}$  중의 40  $\mu\text{g}$ 의 DNA에 대해서는, 183  $\mu\text{l}$  물을 280  $\mu\text{l}$ 의 2 mM 리포솜 용액과 혼합하였다. 34  $\mu\text{l}$ 의 TfRscFv (0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 수반함)를 가하였다. 183  $\mu\text{l}$  물을 40  $\mu\text{l}$ 의 1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DNA와 혼합하였다. 마지막 단계로서 80  $\mu\text{l}$ 의 50% 텍스트로스를 가하였다.

[0238]

Tf-Lip-DNA 복합체는 기존에 보고된 생체내 제형화에 따라서 제조하였다 [참고: Xu et al., *Human Gene Therapy*, 10(18): 2941-52 (1999)]. 트랜스페린-리포솜-매개된 전신 p53 유전자 요법을 방사선 요법과 병행하면 인간 두경부암 이중 이식편이 퇴행된다. 최적화된 생체내 제형화를 이용한 전형적인 제제의 경우에는, 25 ml의 Tf (5 mg/ml, 철-포화된 할로-트랜스페린; 공급처: Sigma, St. Louis, MO) 및 50 ml의 Lip (2 mM 총 지질) + 75 ml의 물을 폴리프로필렌 튜브에서 혼합하고, 자주 진동시키면서 실온 하에 5 내지 15분 동안 유지시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시켰다. 120 ml의 20 mM HEPES 완충액, pH 7.4 중의 10 마이크로그램의 플라스미드 DNA를 상기 튜브에 가하고, 10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 즉시 철저히 혼합하며, 자주 진동시키면서 실온 하에 10 내지 20분 동안 유지시켰다. 이어서, 30 마이크로리터의 50% 텍스트로스 용액을 튜브에 가하고, 10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 즉시 철저히 혼합하며, 실온 하에 10 내지 15분 동안 유지시켰다. 최종 DNA:지질:Tf 비는 1:10:12.5 (mg/nmol/mg)이다. HEPES 완충액을 물로 대체시킬 수 있다.

[0239]

A. Lip-HoKC의 제조

[0240]

{K[K(H)KKK]<sub>5</sub>-K(H)KKK} 펩티드 (HoKC)가 복합체에 포함되는 경우, 양이온성 리포솜 제형 A (DOTAP:DOPE, 1:1 몰비), B (DDAB:DOPE, 1:1 몰비), G (DOTAP:DOPE:콜레스테롤, 1:1:1 몰비) 및 H (DDAB:DOPE:콜레스테롤, 1:1:1 몰비) (또는 상기 제공된 모든 리포솜 제형)은 상기 언급된 바와 같은 에탄올 주사 방법을 이용하여 제조하였다. 각 리포솜 제형에는 또한, MPB-DOPE가 총 지질의 5 몰%로 포함되었다. HoKC 펩티드는 말단 시스템을 수반하기 때문에, MPB-DOPE가 모든 리포솜 조성물에 포함되어 펩티드가 리포솜과 접합할 수 있도록 해준다. Lip-HoKC 리포솜은 말레이미드 기를 수반하는 양이온성 리포솜 (Lip-MPB)과 펩티드 간의 커플링 반응을 이용하여 다음과 같이 제조하였다: 시스테인 상에 자유 티올 기를 수반한 펩티드 0.1 mmol 분취액을 10 mM HEPES, pH 7.4 중의 2 mmol의 Lip-MPB 용액에 가하고, 실온 하에 2시간 동안 회전시켰다 (20-30 r.p.m.). 이로써 생성되는 Lip-HoKC는 지질 농도가 1.4 mM이다.

[0241]

리포솜이 HoKC를 포함하는 경우, 완전한 복합체는 HoKC를 수반하지 않은 TfRscFv-Lip-DNA 복합체를 생성시키기 위해 사용된 바와 동일한 방식으로 형성시켰다. 본원에서는 또한, TfRscFv 또는 모든 항체 또는 항체 단편 (Fab' 또는 Mab 포함)을 Lip-HoKC와 특이적 비로 혼합하고 (10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킨다), 실온 하에 10 내지 15분 동안 항온 배양하였다. 이어서, DNA를 TfRscFv-Lip-HoKC 용액에 가하고, 10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1 내지 2분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하며, 실온 하에 10 내지 15분 동안 다시 항온 배양한 후, 텍스트로스 또는 슈크로스를 5 내지 20%의 최종 농도에 가하고, 10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 보다 큰 용적인 경우에는 1분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시킴으로써 혼합하며, 실온 하에 10 내지 15분 동안 항온 배양하였다. 복합체 중의 TfRscFv:LipA-HoKC:DNA의 비는 0.3 mg:7 nmol:1 mg이다.

[0242]

복합체와 피막화하기에 앞서, 바이러스 항원 및 인터루킨을 코딩하는 플라스미드를, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰; 내지 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 몰의 삽입물 대 삽입물의 몰비로 함께 혼합하였다. 예를 들어, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 삽입물 1 몰 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 삽입물 1 몰의 몰비를 사용하였다.

[0243]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 HIV인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 외피 단백질 [참고: Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. *Current Gene Therapy*, 5:203-212; Ferrantelli, F. and Ruprecht, R.M. (2002): Neutralizing antibodies against HIV --

back in the major leagues? *Current Opinion in Immunology*, 14:495-502] 및/또는 Nef 단백질 [참고: Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. *Current Gene Therapy*, 5:203-212; Lichterfeld, M., Yu, X.G., Cohen, D., Addo, M.M., Malenfant, J., Perkins, B., Pae, E., Johnston, M.N., Strick, D., Allen, T.M., Rosenberg, E.S., Korber, B., Walker, B.D., and Altfeld, M. (2004): HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS*, 18:1383-1392]; 및/또는 gp140 [참고: Smith, S.M. (2002): HIV vaccine development in the nonhuman primate model of AIDS. *Journal of Biomedical Science*, 9: 100-111] 중의 하나 이상을 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0244]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 인플루엔자인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 적혈구응집소(HA) [참고: Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58:195-207; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53:219-228], 및/또는 뉴라미니다제(NA) [참고: Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58: 195-207; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53:219-228], 및/또는 뉴클레오캡시드 [참고: Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29] 및/또는 매트릭스 단백질 M2 [참고: Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0245]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 SARS인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 스파이크 당단백질, 및/또는 뉴클레오캡시드 및/또는 구조적 단백질 S1, 및/또는 구조적 단백질 M, 및/또는 구조적 단백질 N [참고: Weiss, S.R. and Navas-Martin, S. (2005): Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 69:635-664]을 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

[0246]

대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 조류 독감(H5N1로서 공지되기도 함)인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 적혈구응집소 [참고: Wong, S. S. and Yuen, K. Y. (2006): Avian influenza virus infections in humans. *Chest*, 129:156-168; Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K.G., Podda, A., Wood, J.M., Zambon, M. C., and Katz, J. M. (2005): Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *Journal of Infectious Diseases*, 191:1210-1215; Treanor, J. J., Wilkinson, B.E., Masseoud, F., Hu-Primmer, J., Battaglia, R., O'Brien, D., Wolff, M., Rabinovich, G., Blackwelder, W., and Katz, J.M. (2001): Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*, 19: 1732-1737]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.

- [0247] 대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 에볼라, 마르부르크 또는 모든 필로비리대인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, VP24, 및/또는 VP30, 및/또는 VP35, 및/또는 VP40, 및/또는 sGP, 및/또는 당단백질, 및/또는 핵단백질 [참고: Hart, M. K. (2003): Vaccine research efforts for filoviruses. *International Journal for Parasitology*, 33:583-595; Wilson, J.A., Bosio, C.M., and Hart, M.K. (2001): Ebola virus: the search for vaccines and treatments. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 58:1826-1841]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.
- [0248] 대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 B형 간염인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, B형 간염 표면 항원 (HBsAg) [참고: Hanke, T. (2006): On DNA vaccines and prolonged expression of immunogens. *European Journal of Immunology*, 36:806-809; Zuckerman, J.N. (2006): Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19:456-459], 및/또는 뉴클레오캡시드 (HBc) [참고: Michel, M.L. and Mancini-Bourgine, M. (2005): Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Virology*, 34 Suppl 1: S108-S114]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.
- [0249] 대항하여 백신 접종하고자 하는 질환이 서부 나일강 바이러스, 뎅기 열, 황열, 또는 모든 플라비비리대인 경우, 사용된 플라스미드 DNA는 적합하게, 대부분의 바이러스-중화성 항체를 유발시키는 단백질인 E-당단백질 [참고: Sampathkumar, P., "West Nile Virus: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Prevention," *Mayo Clinic Processings* 78:1137-1144 (2003); King, N.J.C., "Immunopathology of Flavivirus Infections, *Immunology*," *Immunology and Cell Biology* 85:33-42 (2007)]를 코딩하는 유전자(들)를 함유하는 것이다. 이러한 DNA에 의해 코딩된 단백질(들)은 면역 반응을 유도시키기 위한 항원으로서 작용한다. 또한, 동일한 복합체는 적합하게, 모든 인터루킨, 적합하게 인터루킨 2, 및/또는 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함한다.
- [0250] 이들 방법에 의해 제조된 최종 복합체의 크기는 말베른 ZETASIZER<sup>®</sup> 3000 또는 말베른 ZETASIZER<sup>®</sup> NANO-ZS를 사용하여 동적 광산란식임으로써 측정된 바와 같이 양성 제타 전위를 수반한 약 50 내지 400 (nm)이다. 이러한 크기는 모세관 층을 효율적으로 관통하여 표적 APC 세포에 도달하기에 충분히 작다.
- [0251] 상기와 같이 제조된 복합체를 예방 또는 치료 백신으로서 사용하는 것이 적합하다. 예방용인 경우에는, 상기 제조된 바와 같은 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 기존에 바이러스성 질환에 노출된 적이 전혀 없는 포유동물 (예: 인간)에게 정맥내 주사하였다. 정맥내 주사는 상기 복합체를 사용하여 0, 4 및 8주째에 수행하였다. 대상체에게 백신 접종하기 위해 사용된 복합체는 적합하게, 부형제로서 5 내지 210 % 텍스트로스 또는 슈크로스를 이용하여 1:10:12.5 (mg/nmol/mg) (DNA:지질:Tf)의 비로 만들었고; HoKC가 복합체의 성분이 아닌 경우에는 부형제로서 5 내지 20% 텍스트로스 또는 슈크로스를 이용하여 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 만들었으며; 복합체가 HoKC를 포함하는 경우에는 부형제로서 5% 텍스트로스 또는 슈크로스를 이용하여 0.3 mg:7 nmol:1 mg (TfRscFv:Lip-HoKC:DNA)의 비로 만들었다. 복합체 중의 DNA의 총 양은 1회 주사당 0.01 내지 10 mg/kg이다. 적합한 양은 대상체의 체중을 기준으로 하여 1회 주사당 0.164 mg/kg 인데, 이는 1회 주사당 7 내지 12 mg DNA이다. 제조된 복합체는 정맥내 주입용 또는 정맥내 주사용의 250 ml 5 % 텍스트로스 봉지 내로 주사하거나, 또는 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 주사하였다.
- [0252] 치료용인 경우에는, 상기와 같이 제조된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 바이러스성 질환 (예: B형 간염)에 만성적으로 감염되어 있거나 또는 바이러스성 질환 (예: 에볼라, SARS, H5N1, 두창, 서부 나일강 바이러스)에 급성 노출된 포유동물 (예: 인간) 내로 주사하였다. 예방용인 경우와 동일한 범위 내의 DNA 양을 포함하는 복합체를 250 ml의 5% 텍스트로스 용액 중에서 정맥내 전달하거나, 또는 0, 4 및 8주째에 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는



피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 3회 전달하였다.

[0253] [실시에 6]

[0254] 화학적 접합에 의해 제조된 2개의 나노면역리포솜 복합체를 공동-주사함으로써 인간에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시킴

[0255] 본 발명은 또한, 바이러스 단백질 및 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자, 예를 들어 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 항원 유전자로서 작용하는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 하나 이상의 플라스미드를 포함하는 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 (및 기타 포유동물 및 동물)에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 리포솜의 표면과 직접 화학적으로 접합된 각종 표적화 작용제를 포함하는 복합체는 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0256] 항원으로서 제공되는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자(들)를 수반하는 플라스미드 DNA(들)는 실시예 4에 기재된 바와 동일하였다. 예를 들어, 인터루킨 2, 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드 DNA를 포함하는 별개의 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자(들)를 수반하는 플라스미드 DNA(들)를 이용한 경우에 사용된 바와 동일한 과정 및 비를 이용하여 제조하였다.

[0257] 상기와 같이 제조된 최종 복합체의 크기는 말베른 ZETASIZER<sup>®</sup> 3000 또는 말베른 ZETASIZER<sup>®</sup> NANO-ZS를 사용하여 동적 광산란시킴으로써 측정된 바와 같이 양성 제타 전위를 수반한 약 50 내지 500 (nm)이다. 이러한 크기는 모세관 층을 효율적으로 관통하여 표적 APC 세포에 도달하기에 충분히 작다.

[0258] 상기와 같이 제조된 복합체를 예방 또는 치료 백신으로서 사용한다. 백신으로서 사용하는 경우, 두 복합체는 각 복합체 중의 플라스미드 DNA 삽입물의 물비를 반영하는 복합체:복합체의 비로 함께 혼합하였다. 따라서, 두 복합체의 비는 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 몰을 함유하는 복합체의 양 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰을 함유하는 복합체의 양; 내지 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 몰을 함유하는 복합체의 양 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 몰을 함유하는 복합체의 양이다. 예를 들어, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 1 몰을 함유하는 복합체의 양 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 1 몰을 함유하는 복합체의 양의 비를 활용하였다. 바이러스 단백질(들)을 코딩하는 플라스미드 DNA(들)를 포함하는 복합체를 인터루킨(들)을 코딩하는 플라스미드 DNA(들)를 포함하는 복합체에 가하고, 이 용액을 10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 1분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시켜 인간 대상체에게 사용하기 위한 최종 백신을 형성시켰다.

[0259] 예방용인 경우에는, 상기 제조된 바와 같은 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 기존에 바이러스성 질환에 노출된 적이 전혀 없는 포유동물 (예: 인간)에게 정맥내 주사하였다. 주사는 상기 복합체를 사용하여 0, 4 및 8주째에 수행하였다. 대상체에게 투여된 백신을 형성시키기 위해 사용된 각 복합체 [이는 바이러스성 유전자(들)를 포함하는 복합체 및 인터루킨 유전자(들)를 포함하는 복합체이다]는 적합하게, 부형제로서 5% 텍스트로스를 이용하여 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 만들었다. 백신 중의 DNA의 총 양은 1회 주사당 0.01 내지 10 mg/kg이다. 적합한 양은 대상체의 체중을 기준으로 하여 1회 주사당 0.164 mg/kg인데, 이는 1회 주사당 7 내지 12 mg DNA이다. 제조된 복합체는 정맥내 주입용 또는 정맥내 주사용의 250 ml 5% 텍스트로스 봉지 내로 주사하거나, 또는 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 주사하였다.

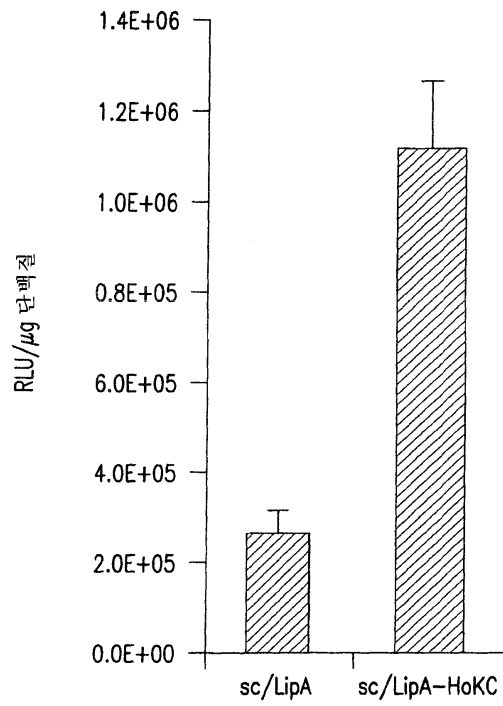
[0260] 치료용인 경우에는, 상기와 같이 제조된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 바이러스성 질환 (예: B형 간염)에 만성적으로 감염되어 있거나 또는 바이러스성 질환 (예: 에볼라, SARS, H5N1, 두창, 서부 나일강 바이러스)에 급성 노출된 포유동물 (예: 인간) 내로 주사하였다. 예방용인 경우와 동일한 범위 내의 DNA 양을 포함하는 복합체를 250 ml의 5% 텍스트로스 용액 중에서 정맥내 전달하거나, 또는 0, 4 및 8주째에 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 3회 전달하였다.

- [0261] [실시예 7]
- [0262] 단순한 혼합에 의해 제조된 2개의 나노면역리포솜 복합체를 공동-주사함으로써 인간에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시킴
- [0263] 본 발명은 또한, 바이러스 단백질 및 인터루킨을 코딩하는 핵산 분자, 예를 들어 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 항원 유전자로서 작용하는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 하나 이상의 플라스미드를 포함하는 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체를 개체에게 동시에 투여하는 것을 포함하는, 인간에게서 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공한다. 리포솜 (HoKC를 수반하거나 수반하지 않음)의 표면과 직접 복합체 형성하지만, 화학적으로 접합되지 않는 각종 리간드를 포함하는 복합체는 상기 실시예 5에 기재된 바와 같이 제조하였다. 항원으로서 제공되는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자(들)를 수반하는 플라스미드 DNA(들)는 실시예 5에 기재된 바와 동일하였다. 모든 인터루킨, 예를 들어 인터루킨 2, 인터루킨 12 및/또는 인터루킨 15를 코딩하는 유전자를 함유하는 플라스미드 DNA를 포함하는 별개의 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체는 바이러스 단백질을 코딩하는 유전자(들)를 수반하는 플라스미드 DNA(들)를 이용한 경우에 사용된 바와 동일한 과정 및 비를 이용하여 제조하였다.
- [0264] 상기와 같이 제조된 최종 복합체의 크기는 적합하게, 말베른 ZETASIZER® 3000 또는 말베른 ZETASIZER® NANO-ZS를 사용하여 동적 광산란시킴으로써 측정된 바와 같이 양성 제타 전위를 수반한 약 50 내지 400 (nm)이다. 이러한 크기는 모세관 층을 효율적으로 관통하여 표적 APC 세포에 도달하기에 충분히 작다.
- [0265] 백신으로서 사용하는 경우, 두 복합체는 각 복합체 중의 플라스미드 DNA 삽입물의 물비를 반영하는 복합체:복합체의 비로 함께 혼합하였다. 따라서, 두 복합체의 비는 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 물을 함유하는 복합체의 양 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 물을 함유하는 복합체의 양; 내지 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 10 물을 함유하는 복합체의 양 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 0.1 물을 함유하는 복합체의 양이다. 예를 들어, 하나 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 1 물을 함유하는 복합체의 양 대 하나 이상의 인터루킨을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 1 물을 함유하는 복합체의 양의 비를 활용하였다. 바이러스 단백질(들)을 코딩하는 플라스미드 DNA(들)를 포함하는 복합체를 인터루킨(들)을 코딩하는 플라스미드 DNA(들)를 포함하는 복합체에 가하고, 이 용액을 10회 동안 온화하게 전도시키거나 또는 1분 동안 20 내지 30 RPM으로 회전시켜 인간 대상체에게 사용하기 위한 최종 백신을 형성시켰다.
- [0266] 상기와 같이 제조된 복합체를 예방 또는 치료 백신으로서 사용하였다. 예방용인 경우에는, 상기 제조된 바와 같은 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 기존에 바이러스성 질환에 노출된 적이 전혀 없는 포유동물 (예: 인간)에게 주사하였다. 주사는 상기 복합체를 사용하여 0, 4 및 8주째에 수행하였다. 대상체에게 백신 접종하기 위해 사용된 복합체는 적합하게, 부형제로서 5 내지 20% 텍스트로스 또는 슈크로스를 이용하여 1:10:12.5 (mg/nmol/mg) (DNA:지질:Tf)의 비로 만들었고; HoKC가 복합체의 성분이 아닌 경우에는 부형제로서 5 내지 20% 텍스트로스 또는 슈크로스를 이용하여 0.33  $\mu$ g:10  $\mu$ g:1  $\mu$ g (TfRscFv:Lip:DNA)의 비로 만들었으며; 복합체가 HoKC를 포함하는 경우에는 부형제로서 5% 텍스트로스 또는 슈크로스를 이용하여 0.3 mg:7 nmol:1 mg (TfRscFv:Lip-HoKC:DNA)의 비로 만들었다. 복합체 중의 DNA의 총 양은 1회 주사당 0.01 내지 10 mg/kg이다. 적합한 양은 대상체의 체중을 기준으로 하여 1회 주사당 0.164 mg/kg인데, 이는 1회 주사당 7 내지 12 mg DNA이다. 제조된 복합체는 정맥내 주입용 또는 정맥내 주사용의 250 ml 5% 텍스트로스 봉지 내로 주사하거나, 또는 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 주사하였다.
- [0267] 치료용인 경우에는, 상기와 같이 제조된 리간드-표적화 양이온성 리포솜 복합체 나노리포플렉스 백신을, 바이러스성 질환 (예: B형 간염)에 만성적으로 감염되어 있거나 또는 바이러스성 질환 (예: 에볼라, SARS, H5N1, 두창, 서부 나일강 바이러스)에 급성 노출된 포유동물 (예: 인간) 내로 주사하였다. 예방용인 경우와 동일한 범위 내의 DNA 양을 포함하는 복합체를 250 ml의 5% 텍스트로스 용액 중에서 정맥내 전달하거나, 또는 0, 4 및 8주째에 정맥내 (IV), 종양내 (IT), 병변내 (IL), 에어로솔, 경피, 경구, 내시경, 국소, 근육내 (IM), 피내 (ID), 안내 (IO), 복강내 (IP), 경피 (TD), 비내 (IN), 뇌내 (IC), 기관내 (예: 간내), 서방출 임플란트, 또는 피하 투여, 또는 삼투압 또는 기계적 펌프를 이용한 투여에 의해 볼루스로서 3회 전달하였다.
- [0268] 본 명세서에 언급된 모든 공개 문헌, 특허 및 특허원은 각 개별적 공개 문헌, 특허 또는 특허원이 본원에 구체

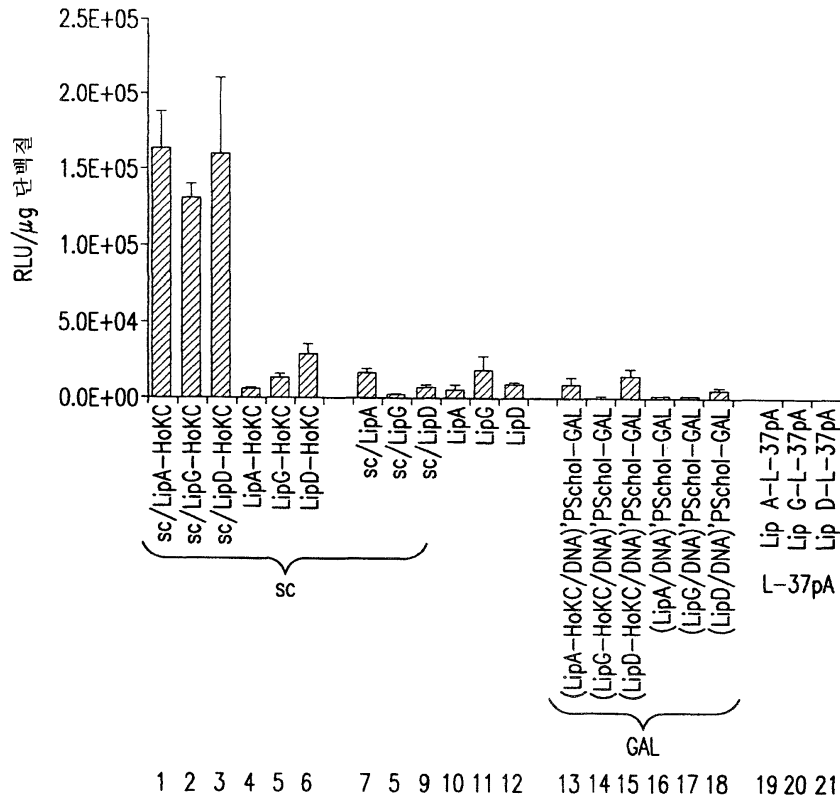
적이고도 개별적으로 참고로 표시되는 바와 동일한 정도로 본원에 참고로 도입된다.

## 도면

### 도면1

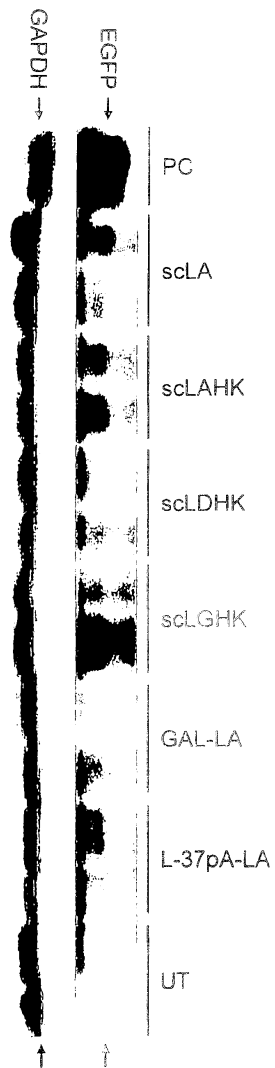


도면2

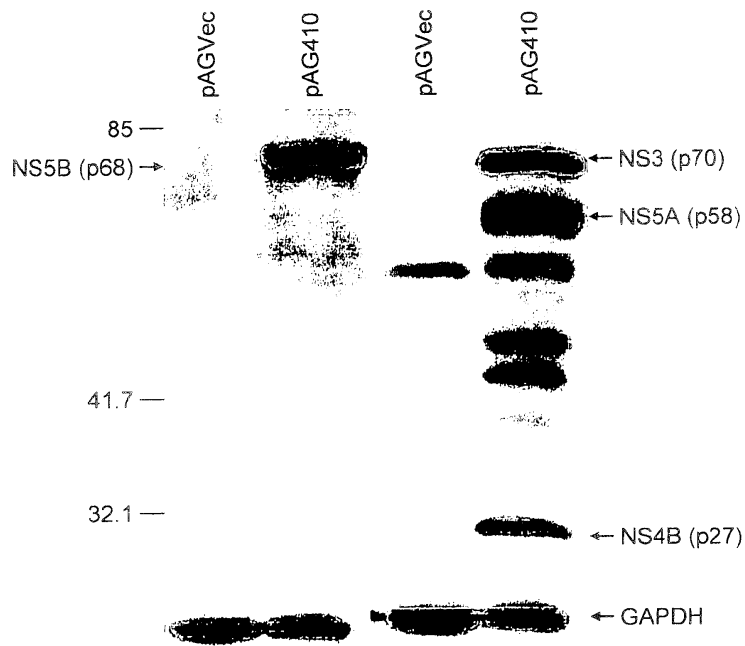




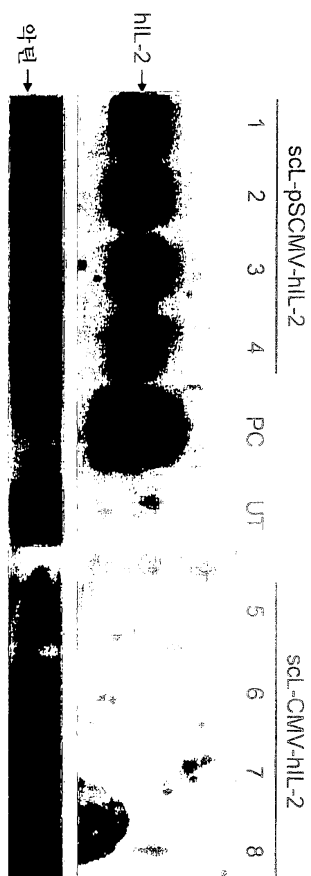
도면3



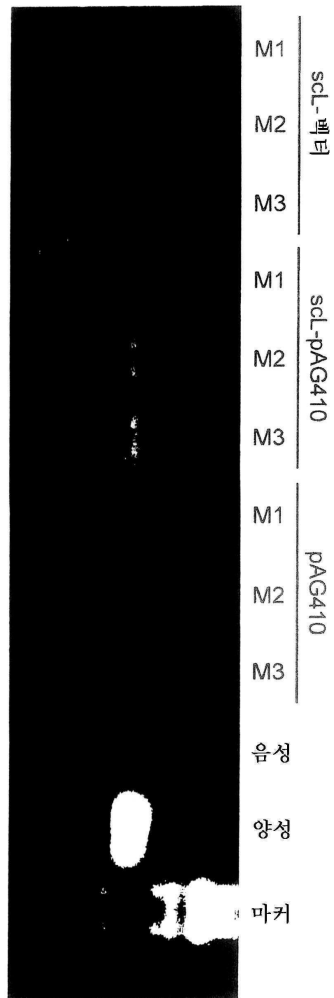
도면4



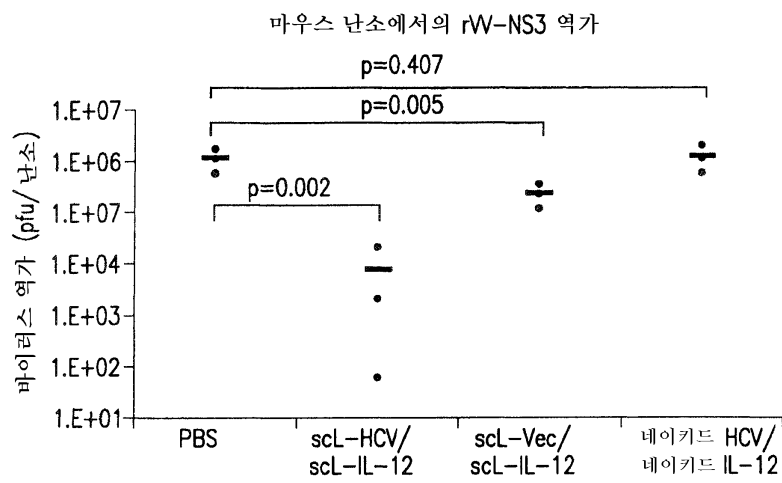
도면5



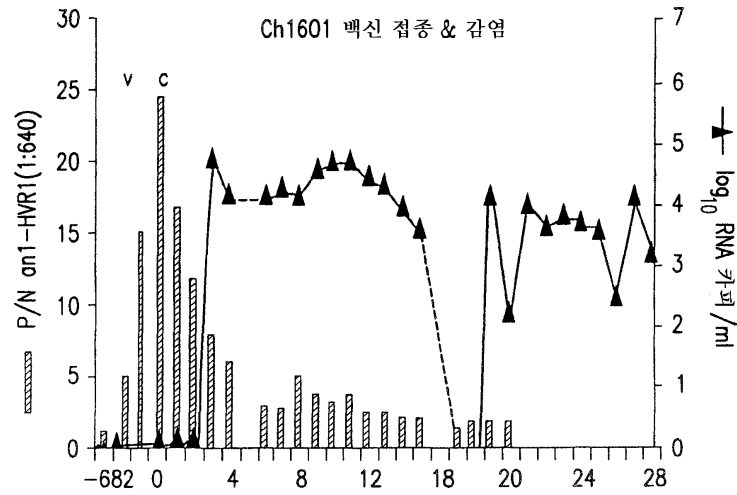
도면6



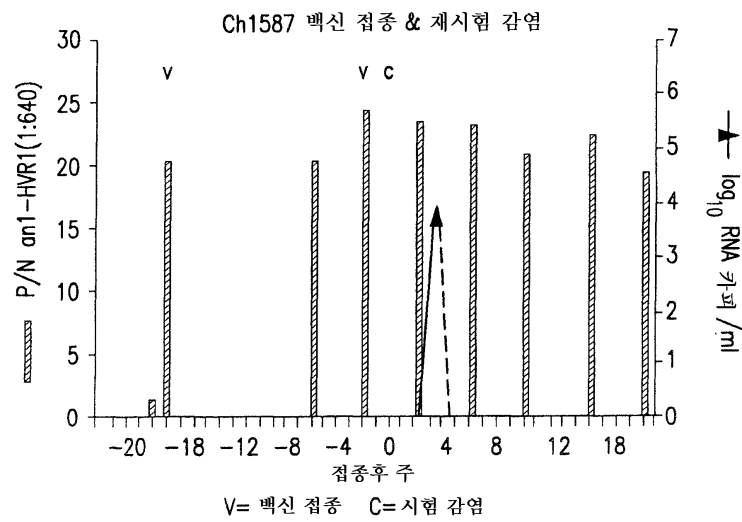
도면7



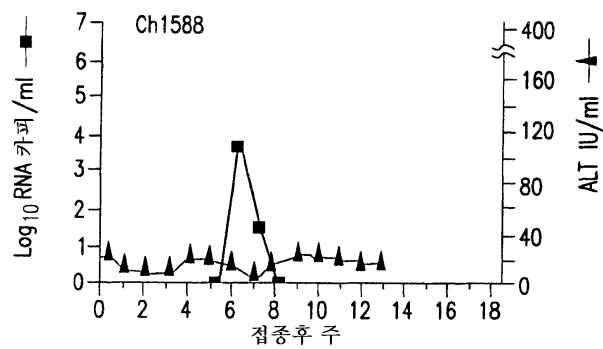
도면8a



도면8b

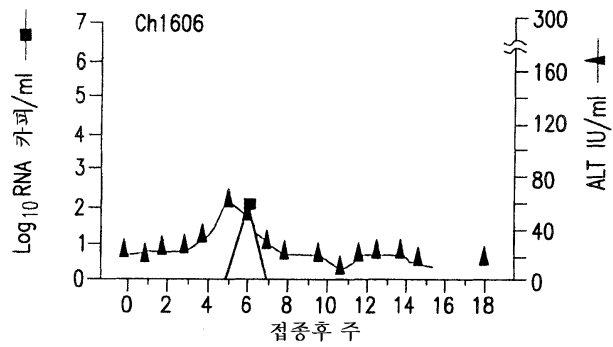


도면9a

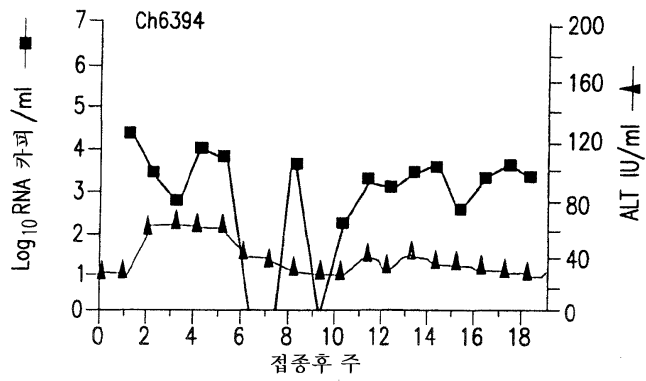




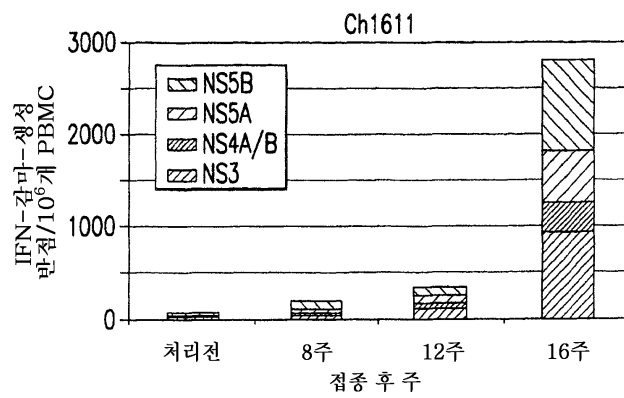
도면9b



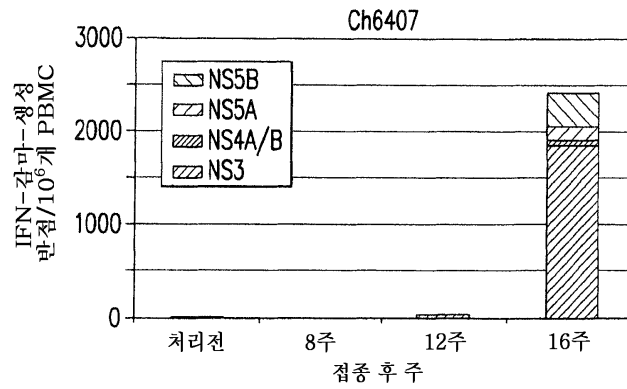
도면9c



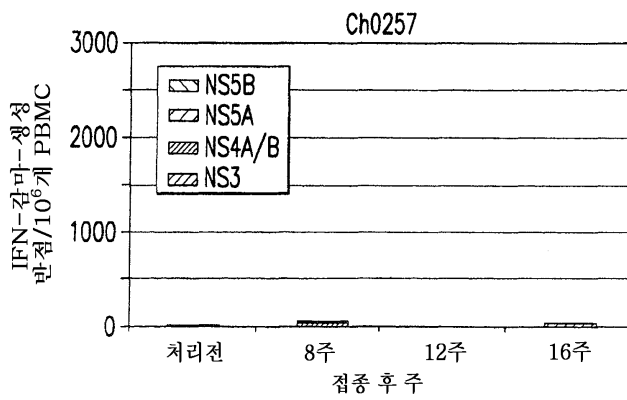
도면10a



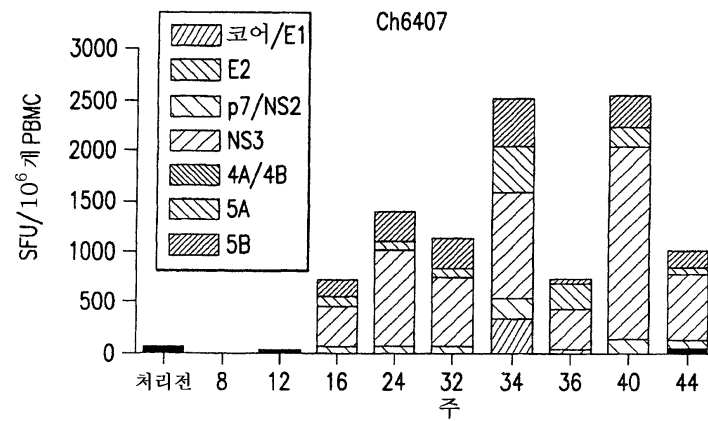
도면10b



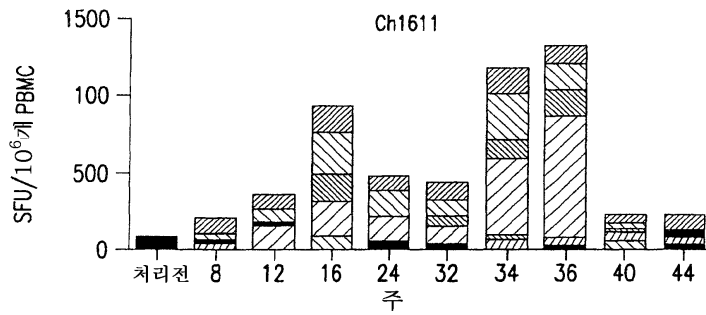
도면10c



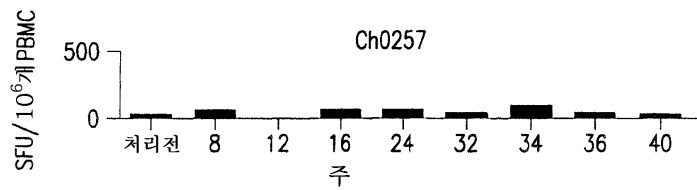
도면11a



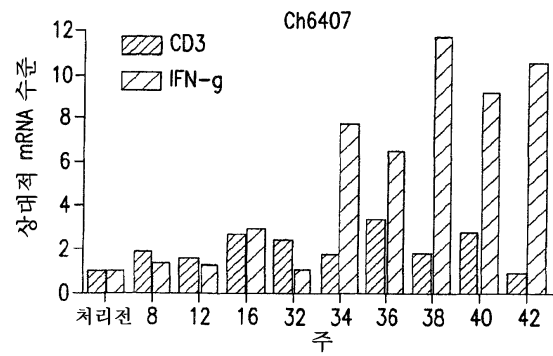
도면11b



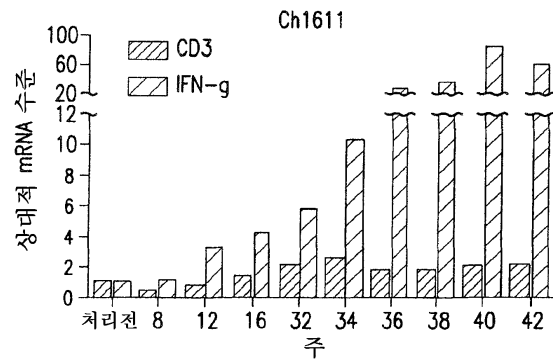
도면11c



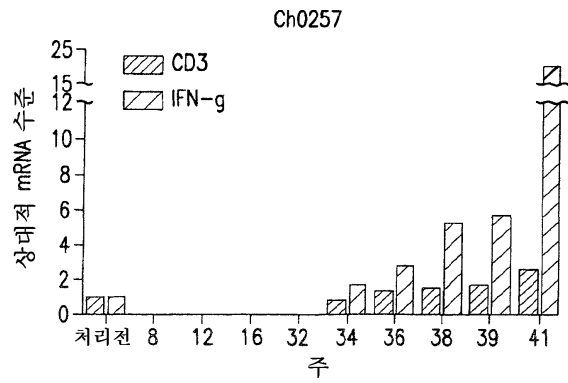
도면12a



도면12b

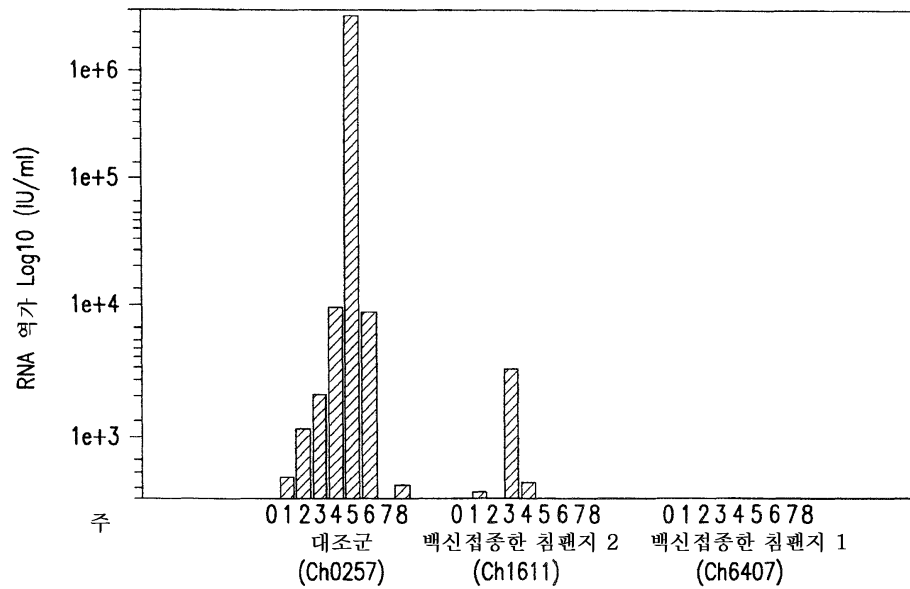


도면12c



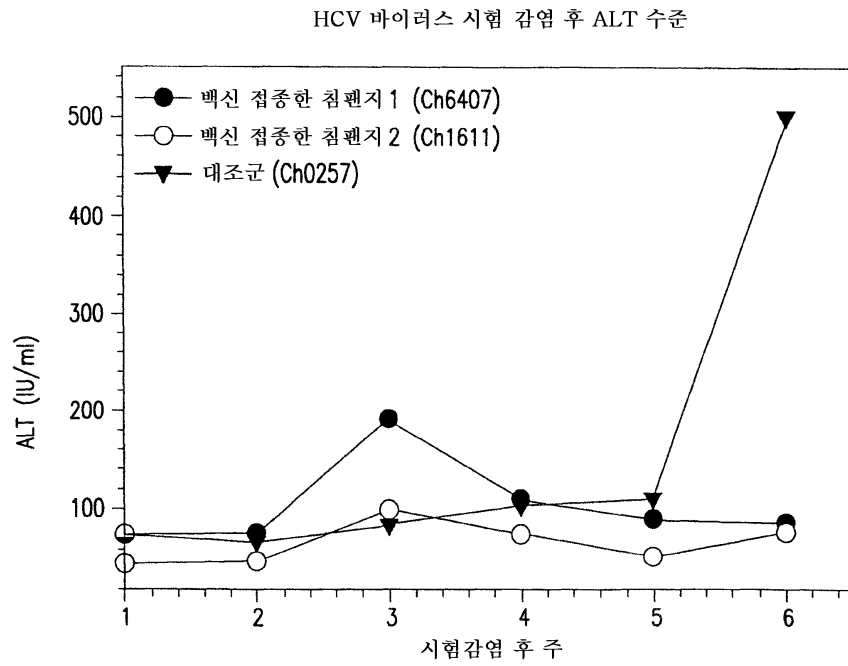
도면13

바이러스 시험 감염 후 HCV 역가

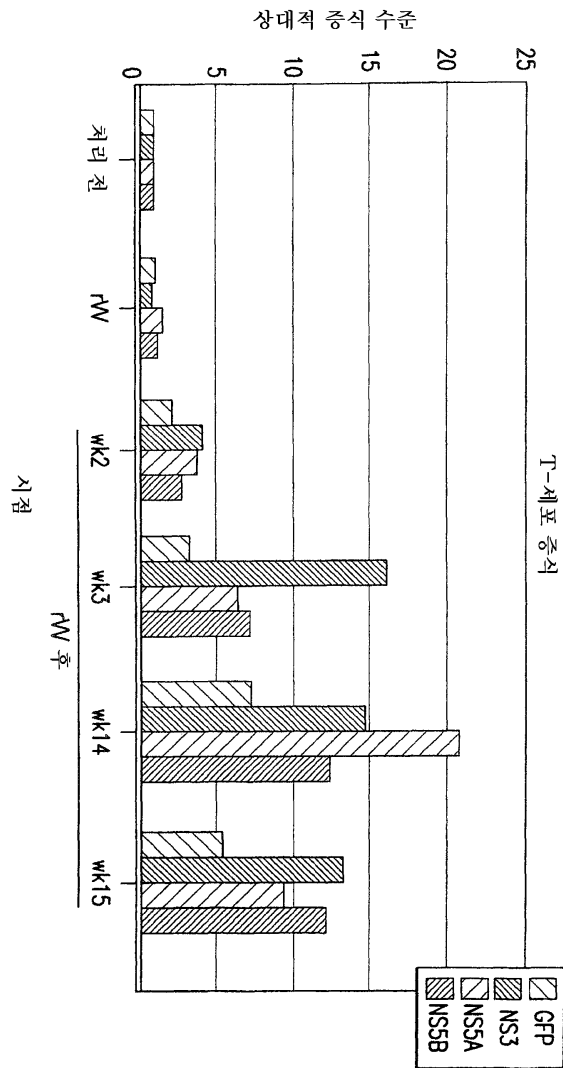




도면14



도면15



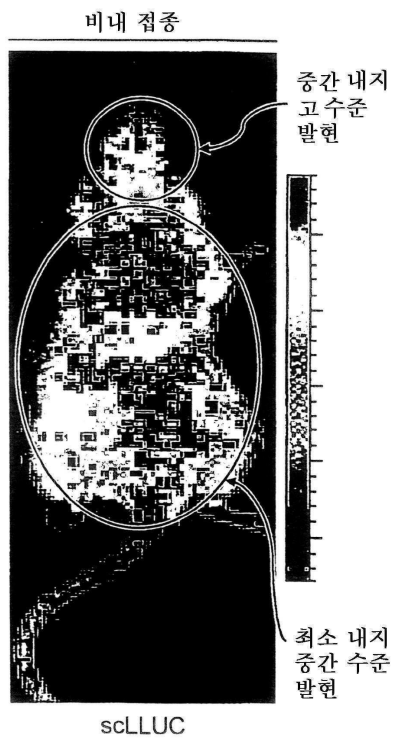
도면16a



도면16b



도면16c



도면17a

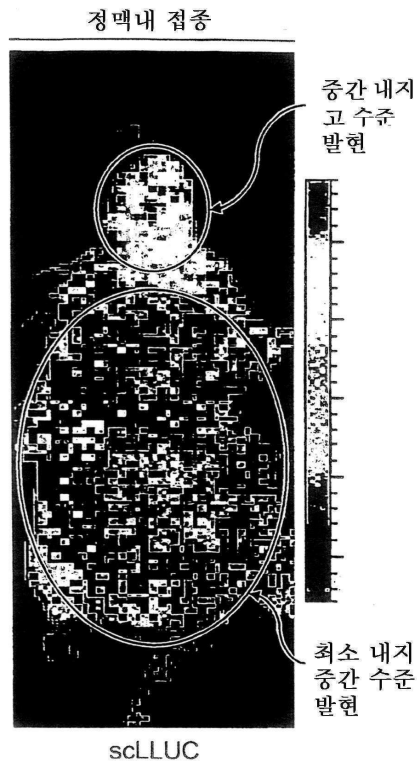




도면17b



도면17c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Georgetown University  
 <120> Methods for Generating Immune Response Using Cationic-Liposome-Mediated Nucleic Acid Delivery  
 <130> 2474.012PC01  
 <140> To Be Assigned  
 <141> Herewith  
 <150> US 60/929,685  
 <151> 2007-07-09  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Chemically synthesized - HoKC  
 <400> 1

Lys Lys His Lys Lys Lys Lys His Lys Lys Lys Lys His Lys Lys Lys

1	5	10	15
Lys His Lys Lys Lys Lys His Lys Lys Lys Lys His Lys Lys Cys			
20	25	30	