



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월02일
(11) 등록번호 10-0773109
(24) 등록일자 2007년10월29일

(51) Int. Cl.

C12N 15/85(2006.01)

(21) 출원번호 10-2001-7014184

(22) 출원일자 2001년11월06일

심사청구일자 2005년05월04일

번역문제출일자 2001년11월06일

(65) 공개번호 10-2002-0013537

공개일자 2002년02월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/012177

국제출원일자 2000년05월05일

(87) 국제공개번호 WO 2000/67761

국제공개일자 2000년11월16일

(30) 우선권주장

60/132,752 1999년05월06일 미국(US)

60/132,750 1999년05월06일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Arch Pharm Res. Vol.21(5):537-542. (1998.10.)

Proc Natl Acad Sci U S A.

Vol.92(16):7570-7574 (1995.8.1.)

US05169628

전체 청구항 수 : 총 83 항

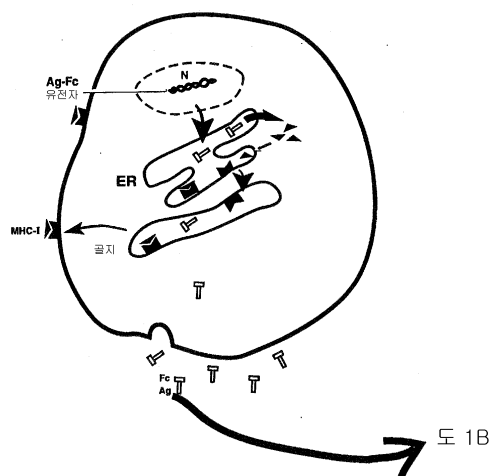
심사관 : 신원혜

(54) 면역 반응을 유발하는 항원을 동정하기 위한 조성물과 방법

(57) 요약

본 발명은 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원 단백질 또는 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 상기 발현 벡터를 세포내로 도입시키는 단계와, T-세포 반응을 유발하기 위해서 상기 항원이 상기 세포로부터 분비되고, 상기 분비된 항원이 상기 세포내로 섭취되고, 상기 항원이 처리되고, 분절들이 수용체에 제공되는 조건하에서, 상기 항원을 생산하기 위해서 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 포유동물에서 항원에 대하여 면역 반응을 유발하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1A



(81) 지정국

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

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

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

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

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

특허청구의 범위

청구항 1

모두 작용가능하게 연결된, 폴리뉴클레오타이드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 폴리뉴클레오타이드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터로서, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 발현 벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 프로모터 서열은 구조성 프로모터, 유도성 프로모터 및 조직 특이성 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 구성 프로모터는 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 새앙쥐 유방 종양 바이러스 프로모터, 인체 면역결핍 바이러스 긴 말단 반복 서열 프로모터, 몰로니(Moloney) 바이러스 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 급성 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 인간 활동 프로모터, 인간 미오신 프로모터, 인간 헤모글로빈 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 및 인간 근육 크레아틴 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 유도성 프로모터는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 황체호르몬 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 조직 특이 프로모터는 인간표피성장인자수용체 2(Human Epidermal growth factor Receptor 2:HER-2) 프로모터 및 전립선 특이항원(Prostate Specific Antigen:PSA) 관련 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 B형 간염 바이러스 E 항원 신호 서열, 면역글로불린 중쇄 선도 서열 및 시토카인 선도 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 포유 동물에서 B 세포 반응을 유발하는 적어도 하나의 항원결정부(epitope)에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 포유 동물에서 CD4+ T-세포 반응을 유발하는 적어도 하나의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 포유 동물에서 CD8+ T-세포 반응을 유발하는 적어도 하나의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 항원이 도입된 포유 동물에서 B 세포 반응, CD4+ T-세포 반응, 및 CD8+ T-세포 반응을 유발하는 적어도 하나의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 상기 항원이 도입된 포유 동물에서 B 세포 반응, CD4+ T-세포 반응, 및 CD8+ T-세포 반응을 유발하는 복수개의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 전염병, 암 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병과 관련된 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 발현 벡터.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 바이러스, 박테리아, 균류 및 원생동물로 이루어진 군으로부터 선택되는 병원성 미생물에 의해 야기된 전염병으로부터 나온 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 발현 벡터.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인체 면역결핍 바이러스, 유두종 바이러스, 및 포진바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스 유전자로부터 나온 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 발현 벡터.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 B형 간염 바이러스는 B형 간염 바이러스 e 항원 또는 B형 간염 바이러스 코어 항원인 발현 벡터.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 인체 면역결핍 바이러스는 gp160 또는 gp120인 발현 벡터.

청구항 17

제 14 항에 있어서, 상기 유두종 바이러스는 유두종 바이러스 E7 또는 유두종 바이러스 E6인 발현 벡터.

청구항 18

제 14 항에 있어서, 상기 포진 바이러스는 단순 포진 바이러스 유형 1, 단순 포진 바이러스 유형 2, 엡스타인-바르 바이러스, 거대세포바이러스, 인간 포진 바이러스 6, 인간 포진 바이러스 7 및 인간 포진 바이러스 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 19

제 12 항에 있어서, 상기 질병은 유방암, 자궁경부암, 흑색종, 신장암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 20

제 1 항에 있어서, 항원에 대한 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 티로시나아제, T-세포에 의해 인지되는 흑색종 항원(Melanoma Antigen Recognized by T-cell:MART), 티로신 관련 단백질(tyrosine related protein:trp), 흑색종 항원-1(Melanoma Antigen-1:MAGE-1), 흑색종 항원-2(Melanoma Antigen-2:MAGE-2), 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3), 100-kDa 글리시리진-결합 단백질(100-kDa Glycyrrhizin-binding protein:gp100), 인간표피성장인자수용체 2(Human Epidermal growth factor Receptor 2:HER-2), 라스(Ras) 및 전립선 특이항원(Prostate Specific Antigen:PSA)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 발현 벡터.

청구항 21

제 12 항에 있어서, 상기 질병은 류마티스성 관절염, 전신홍반성낭창, 다발성 경화증, 건선 및 크론병(Crohn's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 22

제 1 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 Fc 항체 분절, 인터루킨 5 또는 인터루킨 6을 암호화하는 발현 벡터.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

제 1 항에 있어서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동형 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이형 폴리뉴클레오티드 서열인 발현 벡터.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동형 Fc 분절인 발현 벡터.

청구항 30

제 28 항에 있어서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 이형 Fc 분절인 발현 벡터.

청구항 31

제 1 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 세포의 게놈 안으로 상기 발현 벡터의 통합을 촉진하는 통합 신호 서열을 더 포함하는 발현 벡터.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 상기 통합 신호 서열은 바이러스 긴 말단 반복 서열 또는 아데노-관련 바이러스 반전 말단 반복(Inverted Terminal Repeat: ITR) 서열인 발현 벡터.

청구항 33

제 1 항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 박테리아 벡터 및 포유류 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 34

발현 벡터를 포함하는 형질전환 세포로서, 상기 발현 벡터가 모두 작용가능하게 연결된, 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 형질전환 세포로서, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3: MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요

소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 형질전환 세포.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상기 세포는 원핵세포 또는 진핵세포인 형질전환 세포.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 상기 진핵세포는 효모, 곤충, 및 포유 동물로 이루어진 진핵 세포 군으로부터 선택되는 형질전환 세포.

청구항 37

신호 서열, 항원 및 세포 결합 요소를 포함하는 융합 단백질로서, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 융합 단백질.

청구항 38

발현 벡터를 포함하는 백신으로서, 상기 발현 벡터가 모두 작용가능하게 연결된, 프로모터 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 분비 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리아데닐레이션 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 백신.

청구항 39

제 37 항의 융합 단백질로 인비트로 형질도입된 항원 제공 세포(antigen presenting cells)를 포함하는 백신.

청구항 40

제 1 항의 발현 벡터로 인비트로 형질도입된 항원 제공 세포를 포함하는 백신.

청구항 41

제 37 항의 융합 단백질을 포함하는 백신.

청구항 42

적어도 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로서, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 발현 벡터.

청구항 43

모두 작용가능하게 연결된, 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터와 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물로서,

상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절이며, T-세포 매개 면역 반응을 유발하기 위해서, 상기 항원이 상기 세포로부터 분비되고; 상기 분비된 항원이 상기 세포내로 섭취되고; 상기 섭취된 항원이 세포 안에서 처리되고; 상기 처리된 항원이 세포 표면 단백질에 제공되는 조건하에서, 상기 항원을 생산하도록 상기 벡터가 발현되어지는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 상기 처리된 항원이 주 조직 적합성 복합체-I(Major histocompatibility Complex-I:MHC-I), 주 조직 적합성 복합체-II(Major histocompatibility Complex-II:MHC-II) 및 B-세포 수용체들로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표면 단백질에 제공되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 45

제 43 항에 있어서, 상기 항원은 제1 세포에 의해 분비되고 제2 세포에 의해 내재화되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 46

제 45 항에 있어서, 상기 제1 세포 및 제2 세포는 항원 제공 세포인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 47

제 45 항에 있어서, 제1 세포는 항원 비제공 세포이고 제2 세포는 항원 제공 세포인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 상기 제1 세포는 근육 세포인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 49

제 43 항에 있어서, 비경구 경로를 통해 투여하는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 50

제 43 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 프로모터 서열은 구조성 프로모터, 유도성 프로모터 및 조직 특이성 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 51

제 50 항에 있어서, 상기 구성 프로모터는 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 새앙쥐 유방 종양 바이러스 프로모터, 인체 면역결핍 바이러스 긴 말단 반복 서열 프로모터, 모로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 에프스타인-바 바이러스 급성 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 인간 활동 프로모터, 인간 미오신 프로모터, 인간 헤모글로빈 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 및 인간 근육 크레아틴 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 52

제 50 항에 있어서, 상기 유도 프로모터는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 황체호르몬 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 53

제 50 항에 있어서, 상기 조직 특이 프로모터는 인간 표피 성장인자 수용체-2(HER-2) 프로모터 및 전립선 특이 항원(PSA) 관련 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 54

제 43 항에 있어서, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 B형 간염 바이러스 e 항원 신호 서열, 면역글로블린 중쇄 선도 서열 및 시토카인 선도 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 억제학적 조성물.

청구항 55

제 43 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 전염병, 암 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병과 관련된 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 56

제 55 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 바이러스, 박테리아, 균류 및 원생동물로 이루어진 군으로부터 선택되는 병원성 미생물에 의해 야기된 전염병으로부터 나온 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 57

제 56 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인체 면역결핍 바이러스, 유두종 바이러스, 및 포진바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스 유전자로부터 나온 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 58

제 57 항에 있어서, 상기 B형 간염 바이러스는 B형 간염 바이러스 e 항원 또는 B형 간염 바이러스 코어 항원인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 59

제 57 항에 있어서, 상기 인체 면역결핍 바이러스는 gp160 또는 gp120인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 60

제 57 항에 있어서, 상기 유두종 바이러스는 유두종 바이러스 E7 또는 유두종 바이러스 E6인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 61

제 57 항에 있어서, 상기 포진바이러스는 단순 포진 바이러스 유형 1, 단순 포진 바이러스 유형 2, 엡스테인-바르 바이러스, 거대세포바이러스, 인간 포진 바이러스 6, 인간 포진 바이러스 7 및 인간 포진 바이러스 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 62

제 55 항에 있어서, 상기 질병은 유방암, 자궁경부암, 흑색종, 신장암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 63

제 55 항에 있어서, 상기 질병은 류마티스성 관절염, 전신홍반성낭창, 다발성 경화증, 건선 및 크론병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 64

제 43 항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 Fc 항체 분절, 인터루킨 5 또는 인터루킨 6을 암호화하는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

제 43 항에 있어서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동형 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이형 폴리뉴클레오티드 서열인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 71

제 70 항에 있어서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동형 Fc 분절인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 72

제 70 항에 있어서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 이형 Fc 분절인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 73

제 43 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 세포의 게놈 안으로 상기 발현 벡터의 통합을 촉진하는 통합 신호 서열을 더 포함하는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 74

제 73 항에 있어서, 상기 통합 신호 서열은 바이러스 긴 말단 반복 서열 또는 아데노-관련 바이러스 반전 말단 반복(Inverted Terminal Repeat: ITR) 서열인 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 75

제 43 항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 박테리아 벡터 및 포유류 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 약제학적 조성물.

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포 안으로 도입시킴으로써 항원 제공 세포를 형질도입시켜 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하는 단계; 및

상기 항원이 세포로부터 분리되는 조건하에서 항원을 생산하기 위해 상기 벡터를 발현시키는 단계

를 포함하고 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 포유 동물을 면역화시키기 위한 백신 생산 방법.

청구항 92

제 41 항의 백신을 유효성분으로서 함유하는 바이러스, 박테리아, 균류 및 원생동물로 이루어진 군으로부터 선택되는 병원성 미생물에 의해 야기된 전염병을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서 포유 동물에게 투여하기 전에 항원 제공 세포를 백신으로 인비트로 형질도입시키는 약제학적 조성물.

청구항 93

제 38 항의 백신을 유효성분으로서 함유하고 비경구적으로 투여하는 바이러스, 박테리아, 균류 및 원생동물로

이루어진 군으로부터 선택되는 병원성 미생물에 의해 야기된 전염병을 치료하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 94

제 41 항의 백신을 유효성분으로서 함유하는 바이러스, 박테리아, 균류 및 원생동물로 이루어진 군으로부터 선택되는 병원성 미생물에 의해 야기된 전염병을 치료하기 위한 억제학적 조성물로서 포유 동물에게 투여하기 전에 항원 제공 세포를 백신으로 엑스 비보(ex vivo) 형질도입시키는 억제학적 조성물.

청구항 95

시토카인 발현 벡터 및 레트로젠(retrogen) 발현 벡터를 유효성분으로서 함유하는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물로서, 상기 레트로젠 발현 벡터는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하고, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 면역 반응 유도용 억제학적 조성물.

청구항 96

제 95 항에 있어서, 시토카인 발현 벡터는 과립구-대식세포 집락-자극 인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor:GM-CSF)에 대한 서열을 함유하는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물.

청구항 97

제 95 항에 있어서, 시토카인 발현 벡터는 인터루킨-2(Interleukin-2:IL-2)에 대한 서열을 함유하는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물.

청구항 98

하나의 발현벡터를 유효성분으로서 함유하는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물로서, 상기 발현 벡터는 하나의 프로모터의 전사 조절하에서 시토카인 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 융합 단백질은 신호 서열, 항원 및 세포 결합 요소를 포함하고 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 면역 반응 유도용 억제학적 조성물.

청구항 99

제 98 항에 있어서, 시토카인 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 별개의 전사 조절하에 있고, 시토카인 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 하나의 발현 벡터에서 앞뒤 일렬로 연결되어 있는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물.

청구항 100

두 개의 다른 레트로젠 발현 벡터를 유효성분으로서 함유하는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물로서, 제 1 레트로젠 발현 벡터는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 제 1 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하고; 제 2 레트로젠 발현 벡터는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 제 2 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하고, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 면역 반응 유도용 억제학적 조성물.

청구항 101

하나의 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는 면역 반응 유도용 억제학적 조성물로서, 상기 발현 벡터는 하나의

프로모터의 전사 조절하에서 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 제 1 융합 단백질은 제 1 신호 서열, 제 1 항원 및 제 1 세포 결합 요소를 포함하며 상기 제 2 융합 단백질은 제 2 신호 서열, 제 2 항원 및 제 2 세포 결합 요소를 포함하고, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 102

제 101 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 신호 서열은 동일한 신호 서열이고, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 Fc 분절인 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 103

제 101 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 신호 서열은 동일한 신호 서열이고, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 동일한 세포 결합 요소인 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 104

제 101 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 신호 서열은 상이한 신호 서열이고, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 동일한 세포 결합 요소인 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 105

제 101 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 신호 서열은 동일한 신호 서열이고, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 상이한 세포 결합 요소인 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 106

제 101 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 신호 서열은 상이한 신호 서열이고, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 상이한 세포 결합 요소인 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 107

제 101 항에 있어서, 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 별개의 전사 조절하에 있고, 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 하나의 발현 벡터에서 앞뒤 일렬로 연결되어 있는 면역 반응 유도용 약제학적 조성물.

청구항 108

삭제

청구항 109

모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 폴리뉴클레오타이드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내로 도입시킴으로써 항원 제공 세포를 형질도입시켜 형질도입된 항원 제공 세포를 생산 하는 단계; 및

융합 단백질이 세포로부터 분비되는 조건하에서 융합 단백질을 생산하기 위해 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하고, 상기 항원은 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3) 또는 B형 간염 e항원(HBe 항원)이고 상기 세포 결합 요소는 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역, 인터루킨 5, 인터루킨 6 또는 면역글로불린 Fc 분절인 융합 단백질 생산 방법.

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 발현 벡터(expression vector)와 포유 동물에서 완전한 면역 반응을 유발하기 위한 상기 발현 벡터의 사용 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 MHC-II에 제공하기 위한 외인성 항원으로서 내인성 항원의 처리 과정과 관계되어 있다. 또한 본 발명은 백신과 포유 동물의 면역을 위한 상기 백신 사용 방법과 관련되어 있다.

배경기술

- <2> 인체내의 부적절한 항원제공은 많은 병원성 감염과 악성 세포 성장을 조절하고 제거하는 인체의 면역 시스템을 파괴한다. 만성 감염과 암을 위한 성공적인 치료 백신과 면역 치료는 공격적인 항원을 조절하고 제거할 수 있는 격렬한 면역 반응을 유도하기 위한 효과적인 항원제공에 대한 새로운 방법의 발전에 의존한다.
- <3> 항원을 인식하는 T 세포의 능력은 상기 항원과 MHC I 종(MHC-I) 또는 MHC II 종(MHC-II) 단백질과의 결합에 의해 결정된다. 예로, 세포독성 T 세포는 MHC-I 단백질과 결합된 상기 항원에 반응한다. 그러므로, 바이러스 감염 세포를 죽이는 상기 세포독성 T 세포는 상기 세포가 적절한 MHC-I 단백질을 제공하지 못하면 상기 바이러스에 감염된 세포를 죽이지 못한다. 보조 T 세포는 MHC-II 단백질을 인식한다. 그리고, 상기 보조 T 세포 활동은 일반적으로 상기 항원 제공 세포(antigen presenting cell)에서 상기 항원의 인식과 자기(self) MHC-II 단백질의 상기 세포에서의 존재 모두에 의존한다. 상기 자기 MHC-II 단백질과 결합된 항원을 인식하는 것을 MHC 인식이라 한다. 상기 MHC-I 단백질은 사실상 모든 핵을 가진 세포(nucleated cell) 표면에서 발견된다. 상기 MHC-II 단백질은 마크로파지, B 세포, 비장의 수지상 세포 및 피부의 랑거한스 세포를 포함하는 세포들의 표면에서 발견된다.

- <4> 포유 동물에서 면역 반응을 수행하는 결정적인 단계는 주조직 적합성 복합체(MHC)-II 제한 외인성 항원을 인식하는 CD4+ 보조 T 세포의 활성화이다. 상기 항원은 수지상 세포(DCs) 같은 항원 제공 세포 내의 세포성 이입소체 통로(cellular endosomal pathway)에서 포획되고 처리된다(Zajac et al., 1998; Bona et al., 1998; Kalams et al., 1998; Mellman et al., 1998; banchereau et al., 1998). 엔도솜과 리소솜에서, 상기 항원은 항원 MHC-II 복합체를 형성하기 위하여 골지체에 있는 상기 MHC-II에 제공되는 작은 항원 펩티드로 처리된다. 상기 복합체는 상기 세포 표면에 나타나고 CD4+ T 세포의 활성을 유도한다.
- <5> 동물의 효과적인 면역 반응을 유도하는 다른 결정적인 사건은 CD8+ T 세포와 B 세포 활성화를 필요로 한다. 상기 CD8+ 세포는 처리된 단백질 즉, MHC-I 항원과 착화된 단백질로서 상기 세포 표면에 존재할 수 있는 방법으로 원하는 단백질이 상기 세포를 통과할 때 활성화된다. 상기 B 세포는 MHC 단백질 없이 상기 세포 표면의 면역글로블린을 통하여 상기 항원과 반응할 수 있다. 그렇지만, 상기 CD4+ T 세포의 활성화는 상기 면역 시스템의 관리부를 자극한다. 활성화될 때, 상기 CD4+ T 세포(보조 T 세포)는 인터루킨을 생성한다. 상기 인터루킨은 상기 면역 시스템의 다른 관리부를 활성화시키는 것을 도와준다. 예로, 보조 T 세포는 인터루킨-4(IL-4)와 인터루킨-5(IL-5)를 생성하고, 보조 B 세포는 항체인 인터루킨-2(IL-2)과 감마 인터페론을 생성하고 상기 인터루킨-2는 상기 CD4+ 와 상기 CD8+ T 세포를 활성화시키고 상기 감마 인터페론은 마크로파아지를 활성화시킨다.
- <6> MHC-II 제한 항원을 인식하는 상기 보조 T 세포가 상기 세포독성 T 세포, 상기 마크로파아지, 자연 킬러 세포와 상기 B 세포의 활성화와 클론의 번식에 중요한 역할을 하므로, 항원에 대한 반응으로 상기 보조 T 세포를 활성화시키는 처음 단계가 상기 항원에 대항하는 효과적인 상기 면역 반응의 유도에 중요하다. 리소솜 막관통 단백질로부터 유도된 서열을 사용하여 상기 보조 T 세포 활성화를 자극하는 시도가 보고되었다(Wu, 1995). 그렇지만, 이들 시도는 테스트되는 포유류의 상기 CD8+ T 세포와 상기 B 세포에 대한 효과적인 면역 반응을 유도하지 못하였다.
- <7> 따라서, 당업계에서는 포유동물의 질병 치료를 위해 면역 반응을 유발하는 효율적이면서 규제된 수단에 대해 오랫동안 요구되어 왔다. 본 발명은 이러한 요구를 만족시킨다.

발명의 상세한 설명

- <8> 삭제
- <9> 삭제
- <10> 삭제
- <11> 삭제
- <12> 삭제
- <13> 삭제
- <14> 삭제
- <15> 삭제
- <16> 삭제

- <17> 삭제
- <18> 삭제
- <19> 삭제
- <20> 삭제
- <21> 삭제
- <22> 삭제
- <23> 삭제
- <24> 삭제
- <25> 삭제
- <26> 삭제
- <27> 삭제
- <28> 삭제
- <29> 삭제
- <30> 삭제
- <31> 삭제
- <32> 삭제
- <33> 삭제
- <34> 삭제

<35> 삭제

<36> 삭제

<37> 삭제

<38> 삭제

<39> 삭제

<40> 본 발명의 양태는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 특정 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열은 구성 프로모터, 유도 프로모터 및 조직 특이 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 다른 특정 양태에서, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B형 간염 바이러스 E 항원 신호 서열, 면역글로블린 중쇄 선도 서열 및 시토카인 선도 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 양태는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포유 동물에서 B 세포 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원결정부(epitope)에 대한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 다른 양태는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 포유 동물에서 CD4+ T-세포 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 또 다른 양태는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 포유 동물에서 CD8+ T-세포 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 특정 양태는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 상기 항원이 도입된 포유 동물에서 B 세포 반응, CD4+ T-세포 반응 및 CD8+ T-세포 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 다른 특정 양태는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 상기 항원이 도입된 포유 동물에서 B 세포 반응, CD4+ T-세포 반응, 및 CD8+ T-세포 반응을 유도하는 복수개의 항원결정부에 대한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 다른 양태는 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포 표면 수용체에 결합하는 리간드의 폴리뉴클레오티드 서열인 발현 벡터이다. 특정 양태에서, 세포 결합 요소 서열은 Fc 분절, 독소 세포 결합 영역, 시토카인, 작은 펩티드 및 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 양태에서, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동형 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이형 폴리뉴클레오티드 서열이다.

본 발명의 다른 양태는 발현 벡터를 포함하는 형질전환 세포로서, 상기 발현 벡터가 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 형질전환 세포이다.

본 발명의 또 다른 특정 양태는 신호 서열, 항원 및 세포 결합 요소를 포함하는 융합 단백질이다. 특정 양태에서, 항원 제공 세포는 융합 단백질로 인비트로 형질도입된 것이다. 다른 양태에서, 융합 단백질은 포유 동물에 직접 투여된다.

본 발명의 특정 양태는 발현 벡터를 포함하는 백신으로서, 상기 발현 벡터가 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴

클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 백신이다. 특정 양태에서, 백신은 상기 발현 벡터로 인비트로 형질도입된 항원 제공 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 백신은 융합 단백질로 인비트로 형질도입된 항원 제공 세포를 포함한다.

본 발명의 다른 특정 양태는 적어도 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다.

본 발명의 다른 양태는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 세포내로 도입시키는 단계; 및 T-세포 증개 면역 반응을 유발하기 위해서, 상기 항원이 상기 세포로부터 분비되고; 상기 분비된 항원이 상기 세포내로 섭취되고; 상기 섭취된 항원이 세포 안에서 처리되고; 상기 처리된 항원이 세포 표면 단백질에 제공되는 조건하에서, 항원을 생산하기 위해 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는, 항원에 대하여 면역 반응을 유발시키는 방법이다. 특정 양태에서, 상기 항원은 제 1 세포에 의해 분비되고 제 2 세포에 의해 내재화되고, 이 때 상기 제 1 및 제 2 세포는 항원 제공 세포이다. 다른 양태에서, 제 1 세포는 항원 비제공 세포이고 제 2 세포는 항원 제공 세포이다.

본 발명의 다른 특정 양태는 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 동정하는 방법으로, 상기 방법은 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포안으로 도입시키는 단계; 상기 형질도입된 항원 제공 세포를 순수(naive) 또는 초회피항원자극 T-세포들과 접촉시키는 단계; 및 순수 T-세포들 또는 초회피항원자극 T-세포들이 상기 형질도입된 항원 제공 세포들과 접촉시에 활성화되는지를 평가하는 단계를 포함하는바, 상기 T-세포의 활성화는 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타낸다.

본 발명의 다른 양태는 생체 내 면역 반응을 유발할 수 있는 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 동정하는 방법으로, 상기 방법은 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포안으로 도입시키는 단계; 상기 형질도입된 항원 제공 세포를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계; 비장세포(splenocytes)로부터의 T-세포들을 수집하여 수지상(dendritic) 세포들로 공배양시키는 단계; 및 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포들의 활성화를 평가하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 바이러스 계통, 박테리아 계통, 기생 계통, 및 인간 계통으로 이루어진 cDNA 라이브러리의 군으로부터 선택된다.

본 발명의 특정 양태는 생체 내 면역 반응을 유발할 수 있는 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 동정하는 방법으로, 상기 방법은 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 비경구 경로를 통해 포유 동물에 투여하는 단계; 비장세포로부터의 T-세포들을 수집하여 수지상 세포들로 공배양시키는 단계; 및 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포들의 활성화를 평가하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 바이러스 계통, 박테리아 계통, 기생 계통, 및 인간 계통으로 이루어진 cDNA 라이브러리의 군으로부터 선택된다.

본 발명의 특정 양태는 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 테스트 폴리펩티드를, 모두 작용가능하게 연결되고 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내에 넣어 항원 제공 세포를 형질도입시키고 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세

포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포의 활성화를 평가하는 조건하에서 동정하는 단계; 및 상기 테스트 폴리펩티드로 형질도입된 항원 제공 세포를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법이다.

본 발명의 다른 특정 양태는 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 테스트 폴리펩티드를, 모두 작용가능하게 연결되고 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내에 넣어 항원 제공 세포를 형질도입시키고 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포의 활성화를 평가하는 조건하에서 동정하는 단계; 및 적어도 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법이다.

본 발명의 또 다른 특정 양태는 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 테스트 폴리펩티드를, 모두 작용가능하게 연결되고 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내에 넣어 항원 제공 세포를 형질도입시키고 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포의 활성화를 평가하는 조건하에서 동정하는 단계; 및 상기 테스트 폴리펩티드로 형질도입된 항원 제공 세포를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염 치료 방법이다.

본 발명의 다른 양태는 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 테스트 폴리펩티드를, 모두 작용가능하게 연결되고 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내에 넣어 형질도입시키고 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포의 활성화를 평가하는 조건하에서 동정하는 단계; 및 적어도 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염 치료 방법이다.

본 발명의 다른 양태는 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 테스트 폴리펩티드를, 모두 작용가능하게 연결되고 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내에 넣어 항원 제공 세포를 형질도입시키고 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포의 활성화를 평가하는 조건하에서 동정하는 단계; 및 상기 테스트 폴리펩티드로 형질도입된 항원 제공 세포를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계를 포함하는 자가면역 질환 치료 방법이다.

본 발명의 특정 양태는 형질도입된 항원 제공 세포를 생산하기 위해서, 적어도 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 테스트 폴리펩티드를, 모두 작용가능하게 연결되고 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내에 넣어 항원 제공 세포를 형질도입시키고 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화시킬 수 있는 유전자 또는 그 분절임을 나타내는 T-세포의 활성화를 평가하는 조건하에서 동정하는 단계; 및 적어도 테스트 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포유 동물에게 비경구 경로를 통해 투여하는 단계를 포함하는 자가면역 질환 치료 방법이다.

본 발명의 다른 양태는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 세포 안으로 도입시킴으로써 항원 제공 세포를

형질도입시키는 단계; 및 상기 벡터를 발현시켜 상기 항원이 세포로부터 분비되는 조건하에서 항원을 생산하는 단계를 포함하는 포유 동물을 면역화시키기 위한 백신 생산 방법이다. 특정 양태에서, 항원 제공 세포는 포유 동물에게 항원 제공 세포를 투여하기 전에 상기 항원으로 인비트로 또는 엑스 비보(ex vivo) 형질도입된다.

본 발명의 다른 특정 양태는 포유동물에 시토카인 발현 벡터 및 레트로겐(retrogen) 발현 벡터를 동시 투여하는 단계를 포함하는 면역 반응 유도 방법으로, 상기 레트로겐 발현 벡터는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다.

본 발명의 또 다른 양태는 하나의 발현벡터를 포유 동물에게 투여하는 단계들을 포함하는 면역 반응 유도 방법으로, 상기 발현 벡터는 하나의 프로모터의 전사 조절하에서 시토카인 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 융합 단백질은 항원 및 세포 결합 요소를 포함한다. 특정 양태에서, 시토카인 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 별개의 전사 조절하에 있고, 시토카인 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 하나의 발현 벡터에서 앞뒤 일렬로 연결되어 있다.

본 발명의 다른 양태는 두 개의 다른 레트로겐 발현 벡터를 포유 동물에게 공동으로 투여하는 단계들을 포함하는 면역 반응 유도 방법으로, 제 1 레트로겐 발현 벡터는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 제 1 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하고; 제 2 레트로겐 발현 벡터는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 제 2 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다.

본 발명의 또 다른 특정 양태는 하나의 발현 벡터를 포유 동물에게 투여하는 단계들을 포함하는 면역 반응 유도 방법으로, 상기 발현 벡터는 하나의 프로모터의 전사 조절하에서 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 제 1 융합 단백질은 제 1 항원 및 제 1 세포 결합 요소를 포함하며 상기 제 2 융합 단백질은 제 2 항원 및 제 2 세포 결합 요소를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 Fc 분절이다. 또 다른 양태에서, 상기 제 1 및 제 2 항원은 상이한 항원이며, 상기 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 상이한 세포 결합 요소이다. 부가의 양태는 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 별개의 전사 조절하에 있다는 사실을 포함하고, 여기서 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 하나의 발현 벡터에서 앞뒤 일렬로 연결되어 있다.

본 발명의 특정 양태는 융합 단백질을 투여하는 단계들을 포함하는 CD4+ 및 CD8+ T-세포 모두를 동시에 유도하는 방법으로서, 단백질은 세포 결합 요소에 융합된 MHC-I 및 MHC-II 항원결정부를 모두 포함하는 방법이다.

본 발명의 또 다른 양태는 모두 작용가능하게 연결된, 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 항원 제공 세포내로 도입시키는 단계; 및 상기 벡터를 발현시켜 융합 단백질이 세포로부터 분비되는 조건하에서 융합 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 융합 단백질 생산 방법이다. 특정 양태에서, 항원 제공 세포는 융합 단백질로 인비트로 형질도입된다.

본 발명의 특정 양태는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포내 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 세포내로 도입시키는 단계; 및 융합 단백질이 상기 세포로부터 분비되는 조건하에서 융합 단백질을 생산하기 위해 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 세포내 단백질 분비 방법이다. 보다 상세하게는, 세포내 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 분비 효율을 증가시키기 위해 절단되거나(truncated) 돌연변이된다.

본 발명의 다른 특정 양태는 모두 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 막 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 세포내로 도입시키는 단계; 및 융합 단백질이 상기 세포로부터 분비되는 조건하에서 융합 단백질을 생산하기 위해 상기 벡터를 발현시키는 단계를

포함하는 막 단백질 분비 방법이다. 보다 상세하게는, 막 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 분비 효율을 증가시키기 위해 절단되거나 돌연변이된다.

당업자는 본 발명의 범위와 취지를 벗어나지 않는 범위에서 본 출원에 개시된 발명에 대한 실시예와 변형예의 첨가가 이루어질 수 있음이 명백하다.

<41> 이하에서 사용하는 항체라는 용어는 면역글로블린 분자를 의미하고 상기 분자는 특이적으로 한 항원의 특이 항원결정부에 결합할 수 있다. 상기 항체는 자연원 또는 재조합원으로부터 유도된 손상되지 않은 면역글로블린일 수 있고 상기 보존 면역글로블린의 면역 활성 부분일 수 있다. 상기 항체는 일반적으로 상기 면역글로블린 분자가 4개 결합된 분자이다. 본 발명의 상기 항체는 여러 형태로 존재할 수 있고, 그 예로 다클론 항체, 단클론 항체, Fv, Fab 와 F(ab)₂ 를 포함하고 또한 단쇄 항체와 인체화된 항체들도 포함한다(Harlow et al., 1988; Houston et al., Bird et al., 1988).

<42> 이하에서 사용하는 항원이라는 용어는 면역 반응을 일으킬 수 있는 분자로 정의된다. 상기 면역 반응은 항체 생성이나 특이적 면역성 세포의 활성화 또는 둘다를 포함한다. 상기 항원은 유기체, 단백질/항원의 하부 물질, 죽거나 비활성된 전체 세포 또는 세포여액으로부터 유도될 수 있다. 예시적 유기체는 헬리코박터, 캄필로박터, 클로스트리디아, 코리네박테리움 디프테리아, 보데텔라 퍼투시스, 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, RS 바이러스(respiratory syncytial virus), 보렐리아 버그돌페이, 플라스모디움, 단순 포진 바이러스, 인체 면역 결핍 바이러스, 유두종 바이러스, 비브리오 콜레라, 대장균, 홍역 바이러스, 로타바이러스, 시겔라, 살모넬라 티피, 네이세리아 고노리아를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그러므로, 당업자는 사실상 모든 단백질과 펩티드를 포함한 거대 분자가 상기 항원으로 작용할 수 있다는 것을 안다. 더욱이, 상기 항원은 재조합 DNA 또는 게놈 DNA로부터 유도될 수 있다. 당업자는 상기 면역 반응을 유도하는 단백질의 핵산 서열 또는 병원성 게놈, 유전자, 유전자 분절의 부분 핵산 서열을 포함하는 어느 DNA가 항원 합성을 일으킨다는 것을 안다. 더욱이, 당업자는 본 발명이 유전자 또는 게놈의 전체 핵산 서열을 사용하는 것에 한정하지 않음을 깨달았을 것이다. 본 발명은 하나 이상의 유전자 또는 게놈의 부분 핵산 서열의 사용을 포함하는 것에 한정하지 않고 상기 핵산 서열은 원하는 상기 면역 반응을 유도하기 위해 다양하게 조합되어 배열된다는 것을 쉽게 알 수 있다.

<43> 이하에서 사용한 자가 면역 질환이란 용어는 자가 면역 반응의 장애로 정의된다. 상기 자가면역이란 자기-항원에 대한 부적절하고 과장된 반응이다. 예를 들면, 애디슨 질병, 그레이브 질병, 유형 I-(진성) 당뇨병, 다발성 경화증, 미세데마, 악성 빈혈, 류마티스열, 류마티스성 관절염, 전신홍반성낭창 및 궤양성 대장염이나 이에 한정되지 않는다.

<44> 이하에서 사용된 종양(암)이란 용어는 성장, 분화 불능, 부분 조직 침입 및 대사를 일으키는 특이한 형질을 갖는 세포의 확산-정상적인 제어의 상실-으로 정의된다. 다음 예에 한정되지 않은 예를 들면, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 피부암, 췌장암, 결직장암, 신장암 및 폐암이다.

<45> 이하에서 사용된 세포, 세포주 그리고 세포 배양이라는 용어는 상호 교환되어 사용된다. 이들 용어 모두는 다음 세대의 일부 또는 전부인 후손들을 포함한다. 모든 후손들은 의도적 또는 의도하지 않은 돌연 변이 때문에 동일하지 않을 수 있다.

<46> 이하에서 사용된 세포 결합 요소란 용어는 세포막에 있는 수용체와 결합될 수 있는 단백질의 부분으로 정의된다.

<47> 이하에서 사용된 DNA란 용어는 데옥시리보핵산으로 정의된다.

<48> 이하에서 사용된 수지상 세포(DC)는 골수로부터 유도된 항원 제공 세포로 한 예로 정의된다.

<49> 이하에서 사용된 항원 결정부는 항체를 유도하고 항체와 반응할 수 있는 항원 분자에 있는 작은 분자군으로 정의된다. 대부분의 항원은 많은 상기 항원 결정부를 가지고 있다. 즉, 다가(multivalent)이다. 일반적으로, 상기 항원 결정부는 5개의 아미노산이거나 설탕 분자 크기이다. 당업자는 일반적으로 분자의 특정한 직선 서열보다 전체 3차원 구조가 상기 항원 특이성의 주 기준이라는 것을 이해할 것이다.

<50> 이하에서 사용된 발현이란 용어는 프로모터에 의해 유발된 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사와 번역으로 정의된다.

<51> 이하에서 사용된 발현 벡터란 용어는 전사될 수 있는 유전자 산물의 적어도 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포

합하는 벡터를 언급한다. 일부 경우에, RNA 분자는 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드로 번역된다. 다른 경우에는 이들 서열은 예를 들어, 안티센스 분자 또는 리보자임(ribozymes)의 생산에서 번역되지 않는다. 발현 벡터는 여러 종류의 조절 서열을 포함할 수 있고, 상기 조절 서열이란 특정 숙주 기관에서 작용가능하도록 연결된 암호화 서열의 전사와 가능한 해독을 위해 필요한 핵산 서열을 의미한다. 상기 전사와 상기 해독을 통제하는 상기 조절 서열 뿐만 아니라 벡터와 상기 발현 벡터는 또한 다른 작용을 제공하는 핵산 서열을 포함할 수 있고 이하에서 기술된다.

- <52> 이하에서 사용된 상기 보조 T 세포란 용어는 주된 작용이 마크로파아지와 B와 T 림프구의 활성화와 작용을 향상시키는 것인 작동인자 T 세포로 정의된다. 대부분은 CD4 T-세포이다.
- <53> 이하에서 사용된 이형이란 용어는 다른 종으로부터 유래된 DNA 서열, RNA 서열 또는 단백질로 정의된다.
- <54> 이하에서 사용된 동형이란 용어는 같은 종으로부터 유래된 DNA 서열, RNA 서열 또는 단백질로 정의된다.
- <55> 이하에서 사용된 숙주 세포는 이형 핵산 서열을 발현하는 세포로 정의된다.
- <56> 이하에서 사용된 면역글로블린 또는 Ig는 항체로서 작용하는 단백질 부류로 정의된다. 이들 단백질 부류에는 IgA, IgG, IgM, IgD 그리고 IgE의 5가지가 포함된다. 상기 IgA는 타액, 눈물, 젖, 위장관 분비 그리고 호흡과 비노생식기관의 점액 분비 같은 생체 분비액에 있는 일차 항체로서 작용한다. 상기 IgG는 대부분 가장 일반적인 순환 항체로서 작동한다. 상기 IgM은 일차 반응에서 생성되는 주 면역글로블린이다. 상기 IgM은 응집, 상호 고정, 그리고 다른 항체 반응에서 가장 효과적인 면역글로블린이고 박테리아, 바이러스에 대해 방어에 중요하다. 상기 IgD는 항체 형성은 알려져 있지 않고 항원 수용체로 작용하는 면역글로블린이다. 상기 IgE는 알레르기 항원에 노출되자마자 비만 세포와 호염기성으로부터 매개체를 배출하게 하여 즉각적인 과민성을 매개하는 면역글로블린이다.
- <57> 이하에서 사용된 구조적 적합성 복합체(MHC)는 항원제공에 관여하는 진화적으로 관련된 세포 표면 단백질을 암호화하는 유전자의 특이 다발로 정의되고, 이들은 조직 적합성의 가장 중요한 결정 인자에 속한다. 종 I MHC 또는 MHC-I는 주로 CD8 T 림프구에 항원 제공하는 것으로 작용한다. 종 II MHC 또는 MHC-II는 주로 CD4 T 림프구에 항원 제공하는 것으로 작용한다.
- <58> 이하에서 사용된 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 사슬로 정의된다. 더욱이, 핵산은 상기 뉴클레오티드의 고분자이다. 그러므로, 상기 핵산과 상기 폴리뉴클레오티드는 상호 교환하여 사용된다. 이 분야의 능숙한 기술자는 상기 핵산이 폴리뉴클레오티드이고, 상기 폴리뉴클레오티드가 단분자인 상기 뉴클레오티드로 가수분해하는 일반적인 사실을 알 수 있을 것이다. 상기 단분자 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 이후 상기 폴리뉴클레오티드는 한정되지 않은 범위에서 본 분야에서 가능한 모든 방법으로 얻어지는 모든 핵산 서열을 포함하고, 상기 모든 가능한 방법이란 제한 없이 재조합 방법 즉, 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터 핵산 서열을 보통의 복제 기술, PCR, 합성 등으로 복제하는 것이다. 더욱이, 당업자는 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 폴리뉴클레오티드의 제한된 돌연 변이를 포함하고 당업계에서 주지된 상기 뉴클레오사이드 또는 상기 뉴클레오티드의 돌연 변이를 포함하는 것에 한정하지 않은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함함을 인식하고 있을 것이다.
- <59> 이하에서 사용된 폴리펩티드란 용어는 보통 정의된 서열을 가진 아미노산 잔기를 연결한 것으로 정의되어 있다. 상기 폴리펩티드란 용어는 펩티드와 단백질이란 용어를 상호 포함한다.
- <60> 이하에서 사용된 프로모터란 용어는 세포의 합성 기계에 의해 인지되고 또는 상기 합성 기계를 도입하고 상기 폴리펩티드의 특이한 전사를 시작하게 하도록 요구되는 DNA 서열로 정의된다.
- <61> 이하에서 사용된 레트로젠 또는 레트로젠 융합 단백질이란 용어는 이하 묘사될 것처럼 발현되고 처리될 때 포유류에서 면역 반응을 유도할 수 있는 상기 항원 결정부를 가진 상기 폴리펩티드를 의미하고 상기 폴리펩티드는 융합되어 세포 결합 요소가 된다.
- <62> 이하에서 사용된 레트로젠 발현 벡터란 용어는 신호 서열, 항원 그리고 세포 결합 요소를 암호화하는 최소한 하나의 상기 폴리펩티드로 구성된 상기 발현 벡터를 언급한다.
- <63> 이하에서 사용된 RNA란 용어는 리보핵산으로 정의한다.
- <64> 이하에서 사용된 재조합 DNA이란 용어는 다른 공급원으로부터 DNA 조각을 연결하여 생성된 DNA로 정의한다.

- <65> 이하에서 사용된 재조합 폴리펩티드란 용어는 재조합 DNA 방법을 사용하여 생성한 이중 단백질로 정의된다.
- <66> 이하에서 사용된 T 세포란 용어는 여러 세포 매개 면역 반응에 참여하는 흉선 유도 세포로 정의된다.
- <67> 이하에서 사용된 트랜스펙션된(transfected), 형질 전환된 또는 형질 도입된이란 용어는 외부 핵산이 숙주 세포로 전이되거나 도입되는 과정을 언급한 것이다. 형질 전환된 세포는 일차 대상 세포와 그 후손을 포함한다.
- <68> 이하에서 사용된 전사 조절자 또는 작용가능하도록 연결된이란 구절은 폴리뉴클레오티드의 RNA 중합 효소 개시와 발현을 조절하기 위해 프로모터가 상기 폴리펩티드에 대해 정확한 위치와 방향에 있는 것을 의미한다.
- <69> 이하에서 사용된 백신이란 용어는 포유류에서 면역 반응을 일으키는 물질을 투약하여 면역성을 주는 상기 물질로 정의된다.
- <70> 이하에서 사용되는 바이러스라는 용어는 하나의 온전한 세포내에서 복제될 수 있고 세포에서 세포로 확산될 수 있고 외부 지질막을 갖거나 갖지 않은 단백질막으로 둘러싸여있는 핵산(DNA, RNA)으로 구성된 입자로 정의된다.
- <71> 본 발명의 한 양태는 모두가 작용가능하도록 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화한 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화한 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화한 폴리뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드 폴리아데닐레이션을 포함하는 발현 벡터이다.
- <72> 특정 양태에서 융합 단백질(항원-세포 결합 요소)을 암호화한 핵산 서열은 프로모터의 전사 조절자에 있다. 어떻게 프로모터가 구성되는가에 대한 많은 생각들은 HSV 티미딘 키나제(tk)와 SV40 이전 전사 단위에 대한 바이러스 프로모터를 포함하는 여러 바이러스성 프로모터의 분석으로부터 유추된다. 최근의 연구에서 증대된 이런 연구들로 프로모터가 분리된 작용성 분자들로 구성되고 각각은 대략 DNA 의 7-20bp이며 전사 활성화제 또는 억압 단백질을 위해 하나 이상의 인식 부위를 포함함을 알 수 있게 되었다.
- <73> 각 프로모터에 있는 적어도 하나의 모듈은 RNA합성을 위해 시작 부위의 위치를 결정하는 작용을 한다. 이것의 알려진 예로는 TATA 박스가 있으나, 포유류의 말단 디옥시뉴클레오티딜(deoxynucleotidyl) 전달효소 유전자의 프로모터와 상기 SV40 유전자의 프로모터와 같은 TATA 박스를 결핍한 프로모터에서, 개시 부위를 덮는 개별 요소 자체는 개시 장소를 수리하는 데 도움을 준다.
- <74> 부가적인 프로모터 요소, 즉 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 통상적으로, 인핸서들은 개시 부위의 30-100bp 상부 영역에 위치하지만, 여러 프로모터는 개시 부위의 하류에 작용성 요소를 포함하는 것으로 최근 나타났다. 프로모터 요소들 사이의 공간은 주로 유연해서, 상기 프로모터 요소들이 뒤집어지거나 서로 서로 움직일 때 프로모터 작용은 보존된다. tk 프로모터에서, 상기 프로모터 요소들 사이의 공간은 활성화도가 감소되기 전 50bp까지 증가될 수 있다. 상기 프로모터에 따라, 개별 상기 프로모터 요소들은 전사를 활성화하기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 작용할 수 있다.
- <75> 상기 프로모터는 유전자 또는 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 자연적으로 관련된 것일 수 있고, 암호화 부분 및/또는 엑손의 상부에 위치한 5' 암호화 되지 않은 서열을 분리하여 얻어질 수 있다. 그러한 상기 프로모터는 내인성이라고 부를 수 있다. 비슷하게, 상기 인핸서는 자연적으로 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 관련있고, 상기 서열의 상부 또는 하부에 위치한다. 또한, 확실한 장점은 재조합 또는 이형 프로모터의 조절자에 암호화된 상기 폴리뉴클레오티드 분절을 위치시킴으로써 얻어질 것이고, 이는 프로모터는 미가공 상태에서는 폴리뉴클레오티드 서열과는 통상적으로 관련되지 않는다는 것을 의미한다. 상기 재조합 또는 이형 인핸서는 미가공 상태로는 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 관련되지 않는 인핸서를 의미한다. 그러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 다른 원핵, 바이러스 또는 진핵 세포로부터 분리된 프로모터 또는 인핸서, 다른 전사 조절 영역의 다른 요소들과 발현을 변경하는 돌연변이의 다른 요소들을 포함한 자연적으로 발생하지 않은 상기 프로모터와 상기 인핸서를 포함할 수 있다. 합성적으로, 상기 프로모터와 상기 증폭자의 핵산 서열을 생성하는 것에 이외에 서열은 재조합 복제 및/또는 공개된 조성물과 관련하여 PCRTM을 포함한 핵산 증폭 기술에 의해 생성될 수 있다(미국 특허 제 4,683,202호, 미국 특허 제 5,928,906호). 또한, 미토콘드리아, 클로로플라스트 등 과 같은 비핵 세포 소기관내의 서열의 전사 및/또는 발현을 유도하는 조절 서열이 사용될 수 있다는 것이 예상된다.
- <76> 자연적으로, 발현을 위해 선택된 세포 유형, 세포 소기관 및 기관에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요할 것이다. 일반적으로 분자 생물학의 당업자는 단백질 발현을 위해 어떻게 프로모터, 인핸서, 세포 유형 조합을 사용하는지 알고 있으며, 예를 들어 샘브룩 등(1989)을 참조하라. 사용된 상기 프로모터는 도입한 DNA 분절의 고차원 발현을 유도하기 위한 적절한 조건하에서 구조적이고, 조직 특이적이고, 유도할 수 있고/있거나 유용할 수 있고, 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 대량 생산에 바람직

하다. 상기 프로모터는 이형 또는 내인성일 수 있다.

- <77> 이하에서 보여진 실험예에 제시한 상기 프로모터 서열은 급성 초기 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 상기 프로모터 서열은 작용가능하도록 연결된 그곳에 어느 폴리펩티드 서열의 고차원 발현을 유도할 수 있는 강력한 구조성 프로모터 서열이다. 그렇지만, 다른 구조성 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있고, 다음 예에 한정되지 않고 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 그리고 근육 크레아틴 프로모터같은 인체 유전 프로모터 뿐만 아니라 다음 예에 한정되지 않고 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 새앙쥐 유방 종양 바이러스(MMTV), 인체 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복 서열(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 급성 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터를 포함한다. 더욱이, 본 발명은 상기 구조성 프로모터의 사용에 한정되지 않는다. 유도성 프로모터가 본 발명의 부분으로서 고찰된다. 본 발명에서 상기 유도성 프로모터의 사용은 요구되는 발현은 이런 발현이 바람직할 때 작용가능하도록 연결된 폴리펩티드 서열의 발현은 시작하게하고, 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 제거하는 분자 스위치를 제공한다. 상기 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 본 발명은 조직 특이성 프로모터의 사용을 포함하고 상기 프로모터는 원하는 조직에서만 활성화된다. 상기 조직 특이성 프로모터는 인간표피성장인자수용체 2(Human Epidermal growth factor Receptor 2:HER-2) 프로모터와 전립선 특이항원(Prostate Specific Antigen:PSA) 연관 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <78> 본 발명의 특정 양태에서 발현 벡터는 신호 서열을 암호화하는 폴리펩티드로 구성되고 상기 폴리펩티드는 단백질이 세포로부터 분비되도록 적절한 세포 기관에 암호된 단백질 처리를 유도한다. 예시적 신호 서열로 B형 간염 바이러스 E 항원 신호 서열, 면역글로블린 중쇄 선도 서열, 시토카인 선도 서열 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 것이 사용될 수 있다. 본질적으로, 세포에서 단백질의 분비를 유도하는 어떤 신호 서열은 본 발명의 발현 벡터로 사용하는 것이 적당하다. 신호 서열이외에, 단백질 분비 저지 서열의 절단 또는 소실, 단백질 분비 저지 서열의 점돌연변이, 바이러스 입자로 접합된 바이러스 유전자에 대한 단백질의 연결 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 분비의 다른 작용기작이 사용될 수 있다.
- <79> 본 발명의 한 양태는 발현 벡터이고, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 항원 결정부를 위한 폴리펩티드 서열을 구성하고, 상기 적어도 하나의 항원 결정부는 포유류에서 B 세포 반응을 유도한다.
- <80> 본 발명의 다른 양태는 발현 벡터이고, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 항원 결정부를 위한 폴리펩티드 서열을 구성하고, 상기 적어도 하나의 항원 결정부는 포유류에서 CD4+ T 세포 반응을 유도한다.
- <81> 본 발명의 또 다른 양태는 발현 벡터이고, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 항원 결정부를 위한 폴리펩티드 서열을 구성하고, 상기 적어도 하나의 항원 결정부는 포유류에서 CD8+ T 세포 반응을 유도한다.
- <82> 본 발명의 특정 양태는 발현 벡터이고, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 항원 결정부를 위한 폴리펩티드 서열을 구성하고, 상기 적어도 하나의 항원 결정부는 상기 항원이 도입된 포유류에서 상기 B 세포 반응, 상기 CD4+ T 세포 반응과 상기 CD8+ T 세포 반응을 유도한다.
- <83> 본 발명의 더 특정 양태는 발현 벡터이고, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 다수의 항원 결정부를 위한 폴리펩티드 서열을 구성하고, 상기 다수의 항원 결정부는 상기 항원이 도입된 포유류에서 상기 B 세포 반응, 상기 CD4+ T 세포 반응과 상기 CD8+ T 세포 반응을 유도한다.
- <84> 본 발명의 특정 양태에서 발현 벡터는 항원을 암호화하는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 항원을 암호화하는 상기 폴리펩티드 서열은 한 질병과 연관된 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택되고, 상기 질병은 전염병, 암 및 자가 면역 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 구체적으로, 상기 항원을 암호화하는 상기 폴리펩티드 서열은 바이러스, 박테리아, 균류 및 원생동물로 이루어진 전염병을 일으키는 병원성 미세유기체의 그룹으로부터 선택된다. 공지된 단백질 또는 그 분절들을 암호화하는 DNA 서열은 B형 간염과 C형 간염 바이러스 항원, gp160, gp120과 gag 단백질을 포함하나 이에 한정되지 않는 인체 면역 결핍 바이러스 항원, E7와 E6 단백질을 포함하나 이에 한정되지 않는 유두종 바이러스 항원을 포함하나 한정되지 않는 바이러스 항원을 포함한다. 예를 들면, 엡스타인-바르 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 단순 포진 바이러스 유형 1과 2, 그리고 인체 포진 바이러스 6, 7 및 8에 의해 암호화된 단백질과 같은 포진 바이러스 단백질은 또한 본 발명에서 유용한 레트로젠 융합 단백질로 생각된다. 다른 양태에서, 항원을 암호화한 폴리뉴클레오티드는 유방암, 치경부암, 흑

색종, 신장암 및 전립선암으로 이루어진 군으로 부터 선택된다. 또한, 단백질은 종양 세포의 성장과 복제를 저지하는 목적으로 종양 세포에 대항하는 면역 반응의 활성을 유도할 수 있는 것, 즉, 흑색종에 있는 멜라닌 세포에 대항하여 면역 반응을 활성화하는 티로시나아제이다. 다른 종양-연관 단백질은 T-세포에 의해 인지되는 흑색종 항원(Melanoma Antigen Recognized by T-cell:MART), 티로신 관련 단백질(tyrosine related protein:trp), 흑색종 항원-1(Melanoma Antigen-1:MAGE-1), 흑색종 항원-2(Melanoma Antigen-2:MAGE-2), 흑색종 항원-3(Melanoma Antigen-3:MAGE-3), 100-kDa 글리시리진-결합 단백질(100-kDa Glycyrrhizin-binding protein:gp100), HER-2, PSA, 라스(Ras) 폐암 연관 항원, 다른 종양 특이적 항원, 조직 특이적 항원 또는 종양 연관 항원들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 당업자는 종양 연관 항원을 암호화하고 과학 문헌에 잘 작성되어 있는 공지된 폴리뉴클레오티드 서열을 알고 있고 지금까지 공지되지 않은 폴리뉴클레오티드 서열은 매우 빠르게 발견되고 있다. 또 다른 양태에서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 류마티스성 관절염, 전신 홍반성낭창, 다발성 경화증, 건선(psoriasis) 및 크론병을 포함하나 이에 한정되지 않는 자가 면역 질환으로부터 선택된다. 더욱이, 본 발명은 내성이 포유류에게 유리한 상황에서 면역 내성을 유도하기 위하여 자동 항원을 암호화하는 DNA를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명은 일반화된 면역 반응이 포유류에 유리한 경우 포유류에서 일반화된 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 암호화한 DNA를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일반화된 면역 반응은 HIV 감염, 화학요법, 또는 다른 면역억압 과정의 결과로서 포유류가 면역억압된 경우에 유리하게 된다. 이런 항원은 항원 제공 세포 상의 Fc 수용체와 결합될 때 이 세포들에 의해 항원 제공을 상향조절하는 Fc 항체 분절을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 인터루킨 5에 한정되지 않는 인터루킨은 일반화된 면역 반응의 유도가 요구되는 포유류에서 비슷한 보조효과를 발생시키는 데 사용될 수 있다. 그러므로 본 발명은 본 발명의 발현 벡터를 포함할 때 상기 벡터 또는 그것에 의하여 암호화된 융합 단백질이 포유류에 주입될 때 면역 반응을 활성화할 수 있는 공지되거나 공지되지 않은 폴리펩티드 서열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

<85> 당업자는 핵산 서열이 전장 단백질을 암호화할 필요가 없다는 것을 인식할 수 있다. 단순히 발현 단백질은 항원 제공 세포에서 처리될 때 원하는 면역 반응을 유도하는 항원 결정부를 포함하는 것이 필요하다. 그러므로, 이 정보로부터 핵산 서열은 발현 벡터가 주입된 동물에서 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 항원을 암호화할 것이라는 것이 자명하다. 그러므로, 본 발명은 결코 발현 벡터 내에 포함된 핵산 서열의 유형에 한정되지 않고, 제조합 수단, 보통의 복제 기술 및 PCRTM 등을 사용하는 세포 계놈 또는 제조합 라이브러리로부터 핵산 서열을 복제하는 것 및 합성 수단을 포함하나 한정되지 않는 당업계에서 사용되는 임의의 수단에 의해 얻어진 임의의 및 모든 핵산 서열을 포함하여야 한다. 본 발명은 또한 상기 핵산 서열은 여러 유용한 공급원으로부터 얻을 수 있기 때문에, 핵산 서열의 공급원에 대한 임의의 방식에 한정되는 것으로 이해해서는 안 된다. 당업자는 핵산 서열을 얻는 프로토콜은 당업계에 공지되어 있고 예를 들어 샘브룩 등(1989)과 아우스벨 등(1997)에 기술되어 있음을 알고 있다.

<86> 본 발명의 특정 양태로, 상기 발현 벡터는 세포 결합 요소를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 더 포함한다. 상기 세포 결합 요소는 폴리펩티드의 부분이고, 단백질이 세포 수용체에 결합하는 것을 돕는다. 상기 세포 수용체 단백질에 결합되는 임의의 리간드(ligand)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 발현 벡터로 사용될 수 있다. 예시적 세포 결합 요소들은 면역글로블린 Fc 분절, 슈도모나스 외독소 세포 결합 영역과 같은 독소 수용체 단백질 세포 결합 영역, 인터루킨 5와 인터루킨 6과 같은 사이토킨, 임의 타입의 항체 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 당업자는 임의의 항체/항체 복합체의 내입을 개시하는 항원 제공 세포의 표면 상의 세포 표면 마커에 결합할 수 있음을 인식할 수 있다. 그러므로, 항체와 그 분절은 내재화를 개시하는 세포 결합 요소로 사용할 수 있다. 예시적 항체는 항CD11, 항CD54, 항CD80 그리고 항CD86을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 당업자는 상기 세포 결합 요소가 동형 또는 이형인 것을 인식할 수 있다. 예를 들어, Fc 분절은 동형 또는 이형일 수 있다. 세포 결합 요소에 대한 서열은 제조합 수단, 보통의 복제 기술 및 PCRTM 등을 사용하는 세포 계놈 또는 제조합 라이브러리로부터 핵산 서열을 복제하는 것 및 합성 수단을 포함하나 한정되지 않는 임의의 사용가능한 공급원으로부터 얻을 수 있기 때문에, 본 발명은 핵산 서열의 공급원에 대한 임의의 방식에 한정되는 것으로 이해해서는 안 된다.

<87> 공지된 결합 요소의 부분을 사용하는 것에 이외에, 당업자는 작은 펩티드가 당업계에서 공지된 전형적인 선별 절차에 의해 확인될 수 있음을 인지할 것이다. DNA 라이브러리(cDNA 또는 계놈)는 항원 제공 세포에 효과적으로 결합하는 작은 펩티드를 확인하기 위해 선별된다. 일단, 이들 펩티드가 동정되면, 이 펩티드는 서열화되고 본 발명의 상기 세포 결합 요소로 사용된다.

- <88> 발현할 때, 전사의 적절한 폴리아데닐레이션을 일으키기 위해 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다. 상기 폴리아데닐레이션 서열의 성질은 본 발명의 성공적인 수행에 대해 결정적이라고 생각되지는 않고 임의의 이런 서열이 사용될 수 있다. 바람직한 실시예는 여러 표적 세포에서 잘 작동되기 위해 편리하고/하거나 공지된 SV40 폴리아데닐레이션 서열, LTR 폴리아데닐레이션 서열, 및/또는 소 성장 호르몬 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다. 상기 발현 벡터의 요소로서 또한 눈여겨 볼 것은 전사 종결 부위이다. 이 요소들은 항원을 암호화하는 삽입 폴리뉴클레오타이드 서열과 세포 결합 요소로부터 벡터의 다른 서열을 통해 유전정보 단위를 증가시키거나 관독결과를 최소화하는 역할을 할 수 있다.
- <89> 특이적 개시 신호는 암호화 서열의 효과적인 번역을 위해 요구된다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 조절 신호가 제공될 필요가 있다. 당업자들 중 한 사람은 즉시 이 신호를 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있다. 전체 삽입(entire insert)의 번역을 확실하게 하기 위해 개시 코돈은 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임(reading frame)과 인-프레임 되어야 한다. 상기 외인성 번역 조절 신호와 개시 코돈은 자연산 또는 합성 모두 가능하다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소를 포함하면 증대될 수 있다.
- <90> 숙주 세포에 벡터를 전달하기 위해 복제 부위의 하나 이상의 기점(ori)을 포함하고 상기 기점은 복제가 시작되는 특이 핵산 서열이다. 다른 방법으로 자율 복제 서열(ARS)은 만약 숙주 세포가 이스트라면 사용될 수 있다. 발현 벡터가 세포내에서 복제되는 것이 바람직한 경우, 상기 벡터는 통합 서열 즉, 벡터에 존재하는 레트로바이러스 긴 말단 반복 서열(LTRs)과 아데노-연관 바이러스 반전 말단 반복(Inverted Terminal Repeat: ITR) 서열에 의해 세포의 게놈 속에 통합될 수 있고, 선택적으로, 벡터 자신은 벡터가 유전자 부채 형태를 유지하는 동안 세포에서 벡터의 복제를 돕는 DNA 복제의 기점과 다른 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 발현 벡터는 상기 벡터의 유전자 부채 복제가 벡터가 도입된 세포에서 수행되도록 하기 위해 DNA 복제의 엡스타인-바르 바이러스(EBV) 기원과 EBV EBNA-1 단백질을 암호화한 서열을 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 EBV 기점과 핵항원 EBNA-1 암호를 가진 DNA 구조체는 포유류에서 많은 수의 복제를 할 수 있고 상업적으로 인비트로젠(San Diego, CA)으로 부터 구할 수 있다.
- <91> 본 발명에서 상기 발현 벡터가 적절한 단백질 발현을 위해 숙주 세포의 게놈으로 합체될 필요가 없다. 대신, 상기 발현 벡터는 유전자 부채 분자 형태로 원하는 세포에 존재할 수 있다. 예를 들면, 원하는 단백질을 발현하기 위하여 발현 벡터를 복제할 필요가 없는 세포 유형이 있다. 상기 세포는 근육 세포와 같이 보통 복제되지 않지만 여전히 전적으로 유전 발현 능력이 있는 것이다. 상기 발현 벡터는 나누어지지 않는 세포로 도입될 수 있고 상기 발현 벡터의 복제가 없는 상태에서 암호화된 단백질을 발현한다.
- <92> 본 발명의 핵산 구조체를 포함한 세포를 동정하기 위하여 세포는 상기 발현 벡터에 마커를 포함시킴으로써 인비트로 및 인비보에서 확인하였다. 상기 마커는 상기 발현 벡터를 포함하는 세포를 쉽게 동정하게 하는 확인가능한 변화를 세포에 준다. 일반적으로, 선택성있는 마커는 선택을 허용하는 성질을 주는 것이다. 포지티브 선택성 마커는 마커의 존재가 선택을 허용하는 것이고, 네거티브 선택성 마커는 마커가 존재하면 선택이 어려운 것을 말한다. 상기 포지티브 마커의 예는 약물저항 마커이다.
- <93> 보통 약물 선택 마커의 포함은 형질전환체의 복제와 동정을 도와주고, 그 예로, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티딘올에 대한 내성을 부여하는 유전자가 유용한 선택 마커이다. 조건 수행에 기초한 형질전환자의 식별을 허용하는 발현형을 주는 상기 표시자이외에, 다른 유형의 마커는 원리(basis)가 비색 분석법인 GFP와 같은 선별성 마커를 포함한다. 달리 말하면, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제(tk) 또는 클로로암페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)와 같은 선별 가능한 효소가 사용될 수 있다. 또한 당업자는 FACS 분석법과 함께 면역적 마커를 어떻게 사용하는지 알 것이다. 예로, NGFR(신경 성장 인자 수용체)는 세포 표면에서 NGFR 발현을 검출하는 유동세포계수법을 사용하여 벡터를 포함하는 세포의 선택을 돕기 위해 발현 벡터에 포함된다. 사용된 상기 마커는 유전자 생성물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현되는 한 중요하다고 생각되지 않는다. 선택 가능하고 선별할 수 있는 마커의 다른 예들은 당업자에게 주지되어 있다.
- <94> 또한, 상기 발현 벡터는 DNA 복제의 원핵 유기체 기점과 앰피실린 내성 유전자와 같은 항생제 내성 유전자인 발현 벡터를 구성하는 원핵성 세포를 선택하기 위한 검출 가능한 마커를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다.
- <95> 더욱이, 상기 발현 벡터는 DNA 대신 RNA의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 상기 벡터의 주된 성분은 DNA 벡터에 기술한 것과 동일하고 체액, 조직과 세포에서 상기 RNA를 안정화하는 다른 성분들이 첨가될 수 있다.
- <96> 본 발명의 상기 발현 벡터를 발생하기 위해 기술된 여러 성분들을 함께 연결하는 실제 방법은 당업계에 주지되

어 있고 샘브룩 등(1989), 아우스벨 등(1994), 및 게르하르트 등(1994)에 기술된다.

- <97> 특정 양태에서, 상기 발현 벡터는 바이러스 벡터, 박테리아 벡터 그리고 포유류 벡터를 구성하는 군으로 부터 선택된다. 최소 상기 논의한 조성물의 일부 또는 전부를 포함하는 다수의 발현 벡터계가 존재한다. 원핵- 및/또는 진핵 벡터를 기초로한 계는 핵산 서열, 그들의 같은 혈족인 폴리펩티드, 단백질 및 펩티드를 생성하기 위해 본 발명의 용도로 사용될 수 있다. 많은 이런 계들은 상업적으로 널리 구입할 수 있다.
- <98> 곤충 세포/바큐로바이러스 계는 미국 특허 제5,871,986호, 제4,879,236호에서 기술되고 인비트로젠 (INVITROGEN[®])의 MAXBAC[®] 2.0의 상표명과 클론테크 (CLONTECH[®])의 BACPACK[™] BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM의 상표명으로 구할 수 있는 이형 핵산 분질의 고차원 단백질 발현을 생성할 수 있다.
- <99> 상기 발현 벡터 계의 다른 예는 포유류의 발현 계를 유도할 수 있는 스트라타진[®]의 컴플리트 컨트롤[™] (STRATAGENE[®]'s COMPLETE CONTROL[™])이고 합성 융화호르몬-유도 수용체, 또는 pET 발현 계인 대장균 발현계를 포함한다. 유도 가능한 발현계의 또 다른 예는 인비트로젠[®] (INVITROGEN[®])에서 구할 수 있고 상기 발현 계는 전질이 CMV 프로모터를 사용하는 유도 가능한 포유류 발현계인 T-REX[™] (테트라사이클린-조절 발현)계를 제공한다. 인비트로젠[®]은 또한 피치아 메타놀리카(Pichia methanolica) 발현 벡터라 불리는 이스트 발현 벡터를 제공하고, 상기 발현계는 호메틸유기체의 이스트 피치아 메타놀리카에서 재조합 단백질의 고차원 생산에 적합하다. 당업자는 핵산 서열과 상기 핵산 서열과 조상이 같은 폴리펩티드, 단백질, 펩티드를 생성하기 위하여 발현 구조체와 같은 벡터를 어떻게 발현할 것인가를 알 것이다.
- <100> 발현 벡터를 포함하는 형질 전환된 세포는 상기 발현 벡터를 세포로 도입하는 것에 의해 형성된다. 세포 또는 숙주 세포로 DNA를 도입하는 것은 분자 생물학의 분야에서 잘 알려진 기술이고, 샘브룩 등(1989), 아우스벨 등(1994), 및 그레하르트 등(1994)에 잘 나타나 있다. 세포를 감염시키는 방법은 인산 칼슘 침전, 리포솜 매개 감염, DEAE 텍스트란 매개 감염, 전기영동 등을 포함한다. 다른 방법으로, 세포는 참고문헌과 이후 언급되는 실시예에 잘 나타나 있는 보통의 방법을 사용하여 본 발명의 레트로젠 발현 벡터를 가지고 간단히 형질변환될 수 있다. 상기 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 포함하고, 상기 숙주 세포는 벡터를 복제할 능력과 벡터에 의해 암호화된 이형 유전자를 발현할 능력이 있는 어떤 형질 전환 가능 유기체를 포함한다. 숙주 세포는 벡터의 수용체로 사용될 수 있고 사용되어 왔다. 상기 숙주 세포는 원하는 결과가 상기 벡터의 복제인가 또는 핵산 서열의 암호화된 벡터의 부분 또는 전체의 발현인가에 따라 원핵 유기체 또는 진핵 유기체로부터 유도될 수 있다. 다수의 세포주와 배지는 상기 숙주 세포로써 사용되고, 상기 세포주와 상기 세포 배양은 살아있는 배양과 유전 물질들의 공적 기록 보관소로써 기능하는 단체인 ATCC(American Type Culture Collection)에서 얻을 수 있다 (www.atcc.org). 당업자는 적당한 상기 숙주를 결정하는 지식과 기술을 가지고 있다. 일반적으로, 상기 숙주 결정의 지식과 기술은 벡터 골격과 원하는 결과에 따른다. 예로, 플라스미드 또는 코스미드는 많은 벡터를 복제하기 위해 원핵 숙주 세포로 도입될 수 있다. 벡터 복제 및/또는 발현의 숙주 세포로 사용되는 박테리아 세포는 DH5 α , JM109, 그리고 KC8이 있고, 상업적으로 사용되는 많은 수의 박테리아 숙주는 SURE[®] 수용성 세포 그리고 SOLOPACK[™] Gold 세포(STRATAGENE[®], La Jolla, CA)등이 있다. 선택적으로, E. coli LE392 같은 박테리아 세포는 파아지 바이러스의 숙주 세포로 사용될 수 있다. 숙주 세포로 사용될 수 있는 진핵 세포는 이스트, 곤충 그리고 포유류가 있으나 이에 한정되지 않는다. 벡터의 복제 및/또는 발현을 위한 포유류 진핵 숙주 세포는 HeLa, NIH3T3, Jurkat 293, Cos, CHO, Saos, 그리고 PC12등이 있으나 이에 한정되지는 않는다. 이스트 균주의 예로는 YPH499, YPH500 그리고 YPH501 등이 있으나 이에 한정되지는 않는다. 여러 세포 유형과 유기체로부터의 많은 숙주 세포가 유용하고 당업자에게 공지될 것이다. 비슷하게, 바이러스 벡터는 특히 벡터의 복제와 발현을 허용하는 상기 원핵 또는 상기 진핵 숙주 세포와 함께 사용될 수 있다.
- <101> 더욱이, 상기 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해기술분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 샘브룩 등(1989), 아우스벨 등(1994) 및 다른 바이러스학과 분자 생물학 지침서에 잘 나타나 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스, 및 렌티바이러스 등이 있으나 이에 한정되지 않는다.

- <102> 어떤 벡터는 상기 원핵 및 상기 진핵 세포 모두에서 복제되고 발현되는 것을 허용하는 조절 서열을 수행할 수 있다. 당업자는 숙주 세포를 유지하고 벡터의 복제를 허용하기 위해 상기 숙주 세포 모두를 배양할 수 있는 조건을 더 이해할 것이다. 또한 벡터 및 상기 벡터와 같은 조상을 가진 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드에 의해 암호화된 핵산을 생산하는 것 뿐만 아니라 상기 벡터의 대량 생산을 허용하는 기술과 조건도 이해되고 공지된다.
- <103> 본 발명의 특정 양태는 신호 서열, 항원 및 세포 결합 요소를 포함하는 융합 단백질이다. 본 발명은 또한 백신으로서 레트로겐 단백질 또는 융합 단백질의 용도를 포함한다. 상기 레트로겐 단백질은 발현 벡터를 포함하는 임의의 세포에서 상기 레트로겐 단백질을 발현시키고 세포, 세포 잔해 및 세포 매질로부터 상기 레트로겐 단백질을 분리하여 얻을 수 있다. 친화성 컬럼 정제 방법은 특별히 본 발명의 상기 레트로겐 단백질의 정제화에 유용하고 그 이유는 정의에 의해 레트로겐이 상기 세포 결합 요소를 구성하기 때문이다. 결합 세포 수용체 또는 단백질 A 또는 단백질 G 같은 일반적인 단백질을 구성하는 친화성 컬럼은 세포 성분으로부터 레트로겐을 분리하기 위해 사용될 수 있다. 다른 양태는 융합 단백질을 가지고 인비트로 형질도입되는 항원 제공 세포를 포함하는 백신이다.
- <104> 다른 양태에서, 백신은 발현 벡터를 포함하고, 상기 발현 벡터는 모두 작용가능하도록 연결된 프로모터 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 분비 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 그리고 폴리아데닐레이션 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 발현 벡터를 포함하는 백신을 상기 벡터내에 포함된 상기 서열이 세포로 도입되고, 발현되고, 원하는 단백질에 대응하여 면역 반응이 유도되는 포유류의 부위에 직접적으로 투여한다. 이 경우에, 상기 발현 벡터는 약물학적 담체와 제제로 투여되어 DNA가 세포로 들어갈 수 있고, 세포내에서 발현될 수 있다. 발현 단백질은 상기한대로 처리와 이주조직적합성 복합체(Major histocompatibility Complex:MHC) 제공을 위해 항원 제공 세포로 들어갈 수 있다. 당업자는 상기 DNA가 여러 방법으로 주어진 수 있고, 주입 경로에 따라, 상기 DNA의 조성은 조작될 수 있음을 인식한다. 비경구적 주입 경로의 예는 근육내, 복광내, 정맥내, 피하 그리고 피내 등이 있으나 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 상기 발현 벡터의 DNA는 포유류 조직에 발현 벡터의 DNA를 포유류의 조직에 직접 주입하여 포유류의 세포에 도입하는 것이 필요하지 않다. 오히려, 상기 발현 벡터를 상기 포유류로 도입하는 다른 방법들이 사용될 수 있고, 비침입 주입, 코, 구강 등과 같은 주입 방법을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- <105> 상기 포유류로 도입되는 DNA의 양은 세포에서 DNA를 효과적으로 발현하기 위한 충분한 양이고, 단백질의 충분한 양이 발현되고 세포로부터 배출되고 상기 단백질은 항원 제공 세포에 의해 포획되어 MHC복합체로 발현된다. DNA의 이런 양을 DNA의 "치료양"이라고 부른다. 치료양을 구성하는 DNA의 정밀한 농도는 당업자가 이런 원소를 포유류에 상기 양을 투여함으로써 쉽게 결정될 수 있으며 물론 포유류에 포함되는 조성과 DNA가 도입되는 조직, 포유류의 나이 및 건강을 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 인자에 따라 변할 수 있다.
- <106> 본 발명의 또 다른 양태는 상기 발현 벡터로 형질 도입되는 세포를 포함하는 백신이다. 상기 형질 도입된 세포들은 포유류에서 면역 반응을 유도하기 위한 목적으로 포유류에 투여되기 위한 약학적 조성물의 형태를 가진다. 세포에서 레트로겐 단백질의 발현은 상기 세포로부터 상기 레트로겐 단백질의 분비를 초래한다. 분비된 레트로겐 단백질은 MHC-I 또는 MHC-II 복합체로서 항원 제공 세포에서 처리되고 그 곳으로부터 발현되기 위해 포유류에 있는 항원 제공 세포에 의해 포획된다. 진핵 세포가 항원 제공 세포일때, 상기 레트로겐 단백질은 항원 제공 세포에서 발현되고, 그 곳으로부터 분비되어 처리와 항원 MHC 제공을 위해 세포로 다시 들어간다. 진핵 세포가 항원 제공 세포가 아닐 때, 세포는 상기 레트로겐 단백질을 발현하고 분비하고 뒤이어 항원 MHC 제공을 위해 항원 제공 세포에 의해 포획된다. 본 발명에 유용한 항원 비제공 세포는 근육 세포와 같이 MHC 제공을 위해 항원을 처리하지 않는 세포를 포함한다. 상기 항원 제공 세포는 수지상 세포(DC), 마크로파지, 단핵세포 등을 포함한다. 또한 항원 제공 세포에 포함될 수 있는 종양 세포는 MHC 제공을 위해 항원을 처리할 수 있거나 처리할 수 없는 세포일 수 있다.
- <107> 상기 발현 벡터는 직접 인비트로 포유류에, 또는 보다 바람직하게는 인비트로 포유류에서 제거된 후 벡터를 상기 세포로 도입하여 포유류에 재도입되는 세포에 포유류의 줄기 세포에 도입될 수 있다. 발현 벡터는 또한 인비트로 방법으로 포유류에 있는 다른 세포로 도입될 수 있다. 상기 벡터가 포유류의 세포로 도입될 때, 상기 벡터는 암호화된 단백질을 즉시 발현될 필요가 없는데, 이는 단백질이 약간의 시간이 지난 후에 세포에서 발현되는 것이 보다 바람직하기 때문이다. 이 경우에, 상기 발현 벡터는 포유류 또는 포유류의 세포로 적절한 유도체를 투여함에 의해 활성화될 수 있는 유도성 프로모터를 포함하는 것이 바람직하다. 엑스 비보 기술은 이 분야에서

잘 알려져 있고, 예로 미국 특허 제 5,399,346호에 나타나 있다.

- <108> 또 다른 양태는 최소한 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 그리고 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다.
- <109> 본 발명의 다른 양태는 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법이다. 보다 구체적으로, 이 방법은 세포들을 조작하여 자신들이 외인성 항원인 것처럼 내인성 항원을 생산하기 위하여 본 발명의 발현 벡터를 이용한다. 이 새로운 항원 제공 전략은 항원과 세포 결합 요소로 구성되는 융합 단백질을 생산하고 분비하는 새로운 재조합 발현 벡터를 가지고 세포를 형질 도입하는 것을 포함한다. 분비된 융합 단백질은 세포내 섭취 또는 수용체-매개 세포내 섭취를 통해 항원 제공 세포로 역행적으로 운반된다(Daeron, 1997; Serre et al., 1998; Ravetch et al., 1993). 그 결과로, 상기 융합 단백질 또는 분비 후 역행적인 운반 때문에 본 발명에서 불리는 "레트로겐"은 내인적으로 생산된다 하더라도 이입소체 통로에서 처리되고 MHC-II 제한 외인성 항원 분절로서 항원 제공 세포의 세포 표면에 존재한다. 상기 항원 제공 세포의 표면에서 상기 항원의 상기 MHC-II 결합된 항원 분절은 차례로 세포성 면역과 체액성 면역을 모두를 유도하기 위해 CD8 + T 세포 및 마크로파이지뿐만 아니라 B-세포를 자극하는 CD4+ T 세포를 활성화한다.
- <110> 본 발명에서 밝혀진 것은 레트로겐 단백질이 상기 융합 단백질 합성, 분비 그리고 세포내 섭취동안 상기 세포질 경로에서 처리될 수 있고 직접적으로 CD8+ T 세포를 활성화하기 위해 항원 제공 세포의 표면에서 MHC-I과 연관될 수 있다는 것이다. 내재화된 항원에 의한 CD8+ T 세포 활성화는 당업계에 기술되어 있고 예로, 코박소빅스-반코우스키 등, 1995에 기술되어 있다. 또한, 상기하고 여기서 보다 상세하게 기술한대로, B 세포는 분비된 레트로겐에 의해 활성화 될 수 있다. 따라서, B 세포 활성화는 CD4+ 세포가 B 세포를 활성화시키기 때문에 본 시스템에서 현저하게 향상된다. 그러므로, 이 전략은 상기 면역계의 모든 경계를 활성화하는 통합된 작용기작을 사용한다.
- <111> 특정 양태에서, 발현 벡터는 형질도입된 세포를 생산하기 위해 세포로 도입된다. 세포에서 상기 레트로겐 단백질을 발현하는 것은 세포로부터 상기 레트로겐 단백질의 분비를 초래한다. 분비된 레트로겐 단백질은 항원 제공 세포에서 처리와 MHC-I 또는 MHC-II 복합체로서 그곳에서부터의 발현을 위해 포유류의 항원 제공 세포에 의해 포획될 수 있다. 그러므로, 당업자는 상기 형질도입된 세포 또는 제 1 세포가 항원을 분비하고 분비된 항원은 세포 또는 동일한 세포 또는 다른 세포인 제 2 세포로 내재화되는 것을 인식한다. 진행 세포가 항원 제공 세포 이면, 상기 레트로겐 단백질은 항원 제공 세포에서 발현되고, 그 곳에서부터 분비되고 처리와 항원 MHC 제공을 위해 상기 세포로 다시 들어간다. 진행 세포가 항원 결정 세포가 아니라면, 상기 세포는 상기 레트로겐 단백질을 발현시키고 분비하고, 뒤이어 항원 MHC 제공을 위해 항원 제공 세포에 의해 포획된다. 본 발명에서 유용한 비항원 제공 세포는 근육세포와 같이 MHC 제공을 위해 항원을 처리하지 않는 어느 세포를 포함한다. 상기 항원 제공 세포는 수지상 세포(DC), 대식 세포, 단핵 세포 등을 포함한다. 또한 항원 제공 세포에 포함될 수 있는 중앙 세포는 MHC 제공을 위해 항원 처리를 하거나 하지 않을 수 있는 세포일 수도 있다.
- <112> 본 발명의 다른 양태는 상기 발현 벡터를 직접적으로 포유류에 투여하기 위한 단계를 포함하는 항원에 대한 면역 반응을 유발시키는 방법이다.
- <113> 본 발명은 또한 포유류에서 면역 반응을 유발할 수 있는 최소 하나의 MHC-II 제한 항원결정부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 선별하거나 동정하는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 동정된 폴리펩티드는 포유류에 유익한 면역 반응을 유발하는 것이다. 상기 방법은 분리된 DNA 분자의 개체군을 얻는 단계와 CD4+ 보조 T 세포를 활성화할 수 있는 최소 하나의 MHC-II 제한 항원 결정부를 암호화하는 상기 분리된 DNA 분자를 식별하는 단계를 포함한다. 본 명세서에서 언급되는 DNA 분자는 "테스트 DNA" 또는 "테스트 폴리뉴클레오티드 서열"이다. 테스트 폴리뉴클레오티드 서열은 본 발명의 발현 벡터로 복제되고 상기 발현 벡터는 신호 서열과 예로 도 25에서 도시된 세포 결합 요소 사이에 위치한다. 이 방법에서, 항원 제공 세포는 상기 테스트 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 항원 제공 세포로 도입하여 형질도입하고 상기 형질도입된 항원 제공 세포는 순수 T 세포나 초회피항원자극 T 세포와 접촉하고, 상기 형질 전환된 세포가 순수 CD4+ T 세포를 인브트로 활성화시킬 수 있는 능력은 어느 순수 T 세포 또는 초회피항원자극 T 세포가 상기 형질 도입된 항원 제공 세포와 접촉시 활성화되는지 여부를 평가함에 의해 평가된다. 형질도입된 항원 제공 세포로 T 세포를 활성화하는 것은 T 세포에 포함된 테스트 폴리뉴클레오티드 서열이 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 포유류에서 면역 반응을 유도하기 위한 CD4+ 보조 T 세포를 활성화할 수 있는 최소 하나의 항원 결정부를 암호화하는 유전자 또는 이의 분절이라는 것을 나타낸다. 분석에서 사용될 수 있는 적당한 대조군은 포유류에서 면역 반응을 활성화할 수 없다고 알려진 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질도입한 세포(네거티브 대조군)와 포유류에서 면역 반응을 활

성화한다고 알려진 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질도입된 세포(포지티브 대조군)를 포함한다. 당업자는 상기 식별 방법이 단백질과 항원 결정부를 암호화하는 유전자를 확인하기 위해 인체 게놈을 식별하는 데 사용될 수 있음을 인식하고, 상기 단백질과 상기 항원결정부는 암, 자가 면역 질병의 면역 치료 또는 유전자 치료에 사용될 수 있는 CD4+ T 세포에 의해 인식된다. 더욱이, 박테리아, 바이러스, 또는 기생충 등을 포함한 다른 게놈들이 식별될 수 있다.

<114> 상기 인비트로 T-세포 활성화 분석은 한번에 많은 다른 테스트 폴리뉴클레오티드 서열의 테스트를 돕기 위하여 고수율 자동 분석법이 되도록 변형될 수 있다. 당업자는 본 발명이 다양한 가능한 항원결정부 서열을 포함한 발현 벡터를 가지고 세포를 형질도입하기 위해 조작될 수 있다는 것을 인식한다. 형질도입된 세포는 순수 T 세포를 포함하는 96-웰 플레이트에 놓여지고, T 세포의 활성화는 임상 면역방법에서 쉽게 사용할 수 있는 기술을 사용하여 T 세포의 DNA에 방사능의 혼합의 자동평가에 의해 평가될 수 있다.

<115> 다른 양태에서, 상기 테스트 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 단백질 생성물은 인비트로 포유류에서 면역 반응의 활성을 판단하기 위해서 평가된다. 이 분석은 상기 테스트 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 도입하여 형질 도입되는 상기 형질도입된 항원 제공 세포가 비경구 경로를 통해 포유류로 투여되는 것을 제외하고 인비트로 평가법과 동일하다. 특정 양태에서, 테스트 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 상기 발현 벡터는 직접적으로 포유류에 투여된다. T 세포는 비장세포로부터 수집되어 수지상 세포로 공배양된다. T 세포의 활성화는 상기 테스트 폴리펩티드를 암호화한 상기 폴리뉴클레오티드가 CD4+ 보조 T 세포를 활성화할 수 있는지를 결정하기 위해 평가된다. 더욱이, 당업자는 이 식별 방법이 암, 바이러스 감염 그리고 자가 면역 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 MHC-II 제한 항원결정부를 동정하기 위해 사용될 수 있음을 인식한다.

<116> 본 명세서에서 지적된 것처럼, 상기 테스트 폴리뉴클레오티드 서열은 분자 생물학 분야에서 통상적인 보통의 방법으로 얻을 수 있다. 예를 들어, 테스트 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 라이브러리로부터 얻을 수 있고, 상기 라이브러리는 작용이 알려지지 않은 단백질을 발현할 수 있다. 테스트 폴리뉴클레오티드 서열은 공지된 작용의 단백질을 발현하는 발현 라이브러리로부터 얻어질 수 있으나, 상기 발현 라이브러리는 이제까지 포유류에서 면역계의 활성 성질을 소유하는 것으로 알려지지 않았다. 예시적 cDNA 발현 라이브러리는 종양 세포, 바이러스 게놈, 박테리아 게놈, 기생성 게놈 그리고 인간 게놈을 포함하나 이에 한정하지는 않는다. 테스트 폴리뉴클레오티드 서열은 조합 방법을 사용하여 얻어질 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 단백질을 암호화하는 지 여부를 초기에서 알 수 없고, 더욱이 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 면역 반응을 활성화할 수 있는 단백질을 암호화하는 지 여부도 알 수 없다. 테스트 폴리뉴클레오티드 서열은 합성 방법에 의해 얻어질 수 있으며, 즉, 폴리뉴클레오티드 서열은 자동 합성기에서 합성되고, 분리된 길이의 분절은 상기 발현 벡터로 복제되고 본 명세서에 기술된대로 시험된다.

<117> 상기 면역 반응이 보호적인 것이 항상 필요한 것은 아니고, 단지 상기 숙주 세포에만 이로울 수 있다. 예를 들면, 예를 들어, 류마티스 관절염, 전신홍반성낭창, 건선, 다발성 경화증, 크론병 등 같은 자가 면역 질환과 같은 항원에 대한 면역 반응이 포유류에게 해로운 상황에서 면역 내성을 유인하는 것이 이로울 수 있고, 공격적인 항원에 대해 면역 내성을 유도하는 것에 의해 성취될 수 있는 면역 반응의 감소가 요구된다. 이 경우에, 상기 DNA는 포유류의 세포에서 발현되어 뒤이어 상기 항원에 대해 포유류의 면역 내성을 유도하기 위해서 MHC-I 및/또는 MHC-II 복합체로서 세포의 표면에서 발현되도록 상기 항원 제공 세포에서 처리되는 상기 공격적인 항원을 암호화하는 DNA를 포함한다.

<118> 다른 양태에서, 동정된 폴리뉴클레오티드 서열은 암, 바이러스 감염 또는 자가 면역 질환을 치료하는 방법으로 사용된다. 보다 구체적으로, 테스트 폴리펩티드를 암호화한 동정된 폴리뉴클레오티드는 항원 제공 세포로 형질 도입되고 형질 도입된 항원 제공 세포는 암, 바이러스 감염, 자가 면역 질환을 치료하기 위한 비경구 경로를 통해 포유류로 직접 투여된다. 더욱이, 테스트 폴리펩티드와 세포 결합 요소를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드를 적어도 포함하는 발현 벡터는 암, 바이러스 감염 또는 자가 면역 질환을 치료하기 위한 비경구 경로를 통해 포유류로 직접 투여된다.

<119> 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 발현 벡터를 세포에 도입하여 항원 제공 세포를 형질도입하는 단계와 상기 항원이 세포로부터 분리되는 조건하에서 항원을 생산하기 위해 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 포유류를 면역시키는 백신을 생산하기 위한 방법이다. 특정 양태에서, 항원 제공 세포는 상기 항원 제공 세포를 포유류로 투여하기 전에 인비트로 또는 엑스 비보에서 상기 항원으로 형질 도입된다. 본 발명의 모든 백신은 비경구적으로 투여된다.

<120> 특정 양태에서, 면역 반응을 유도하는 방법은 유기체에 상기 발현 벡터와 시토카인 발현 벡터를 공동으로 투여

하는 단계를 포함한다. 많은 연구는 개별적인 플라스미드에 대한 상기 반응은 시토카인 발현 플라스미드의 공통 투여로 향상될 수 있다는 것은 보여준다. 상기 발현 벡터로부터 국부적으로 합성된 시토카인의 피코그램(10조분의 1 그램)에서 나노그램(10억분의 1 그램)의 양은 한 포유류 전체에 전신 효과를 나타내기에는 너무나 적은 양이나, 아직까지 국부적 시토카인 환경에 강하게 영향줄 수 있어서 상기 투여된 항원에 대한 면역 반응에 영향줄 수 있다. 상기 시토카인의 예로는 과립구-대식세포 집락-자극 인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor:GM-CSF)와 인터루킨-2(Interleukin-2:IL-2)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 당업자는 상기 시토카인의 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 상기 항원의 폴리뉴클레오티드 서열이 한 발현 벡터로 들어갈 수 있어서 두 개별 벡터의 사용이 필요없음을 즉시 인식한다. 상기 시토카인뿐만 아니라 메틸화 되지 않은 CpG 서열을 포함하는 플라스미드도 세포 매개(Th1) 반응을 증진시킨다(카슨 등., 1997). 상기 CpG 서열 반복 단위는 RRCpGGY를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그러므로, 당업자는 상기 발현 벡터로 상기 시토카인을 보충하거나 본 발명의 상기 CpG 서열 반복 단위의 추가가 상기 면역 반응을 증진시킨다는 것을 알 것이다.

<121> 본 발명의 어떤 양태에서, 내부 리보솜 진입 사이트(IRES) 요소의 용도는 다중 유전자, 폴리시스트론 메시지를 생성하기 위해 사용된다. 상기 IRES 요소는 5' 메틸화 Cap 의존 번역의 리보솜 스캐닝(scanning) 모델을 피할 수 있고 내부 부위에서 번역을 시작할 수 있다(펠레티어와 소넨버그, 1988). 포유류 메시징로부터의 상기 IRES(펠레티어와 소넨버그, 1988)뿐만 아니라 피코르나바이러스군(소아마비와 뇌심근염)의 두 구성원으로부터의 상기 IRES 요소(마세작과 소넨버그, 1991)도 기술된다. 상기 IRES 요소는 이형 개방 판독 프레임(frame)으로 연결된다. 다중 개방 판독 프레임은 함께 전사될 수 있고, IRES에 의해 각각 분리되어 폴리시스트론 메시지를 생성한다. IRES 요소에 의해, 각 개방 판독 프레임은 효과적인 번역을 위해 리보솜에 접근할 수 있다. 다중 핵산 서열은 단일 메시지를 전사하기 위해 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효과적으로 발현될 수 있다(미국 특허 제 5,925,565호와 제 5,935,819호). 더욱이, 당업자는 한 유전자의 모든 핵산 서열이 사용될 필요가 없다는 것을 인식하고 있다. 대신, MHC 중 I과 MHC 중 II의 제한 항원결정부의 부분 핵산 서열들이 함께 융합되어 하나의 프로모터에 의해 전사된 키메라 융합 유전자를 형성한다. 예를 들어, 본 발명의 특정 양태는 단백질이 세포 결합 요소와 결합된 MHC-I와 MHC-II 항원결정부 모두를 포함하는 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하여 상기 CD4+와 상기 CD8+ T 세포를 동시에 유도하는 방법이다. 그러므로, 당업자는 상기 다중 항원 서열의 사용은 한 백신의 투여로 다양한 질병을 치료할 수 있다는 것을 인식하고 있다.

<122> 본 발명의 다른 특정 양태는 포유류에게 발현 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 발현 벡터는 한 프로모터의 전사 조절하에서 제 1 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열과 제 2 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제 1 융합 단백질은 제 1 신호 서열, 제 1 항원 그리고 제 1 세포 결합 요소를 포함하고 상기 제 2 융합 단백질은 제 2 신호 서열, 제 2 항원 그리고 제 1 세포 결합 요소를 포함한다. 특정 양태에서, 제 1 및 제 2 신호 서열은 같은 신호 서열이고, 제 1 및 제 2 항원은 다른 항원이고 상기 세포 결합 요소는 Fc 분절이다. 다른 양태에서, 제 1 및 제 2 신호 서열은 동일하고, 제 1 및 제 2 항원은 다른 항원이고 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 같은 결합 물질이다. 또 다른 양태에서, 제 1 및 제 2 신호 서열은 다르고, 제 1 및 제 2 항원도 다른 항원이고, 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 다른 세포 결합 요소이거나 제 1 및 제 2 신호 서열은 동일하고, 제 1 및 제 2 항원은 다른 항원이고 제 1 및 제 2 세포 결합 요소는 다른 세포 결합 요소이다. 또 다른 양태에는 상기 제 1 융합 단백질을 암호화한 폴리뉴클레오티드 서열과 상기 제 2 융합 단백질을 암호화한 폴리뉴클레오티드 서열은 분리된 전사 조절하에 있는 것을 포함하고, 상기 제 1 융합 단백질을 암호화한 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 상기 제 2 융합 단백질을 암호화한 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 한 발현 벡터에 앞뒤 일렬로 서 있다.

<123> 당업자는 상기 다중 핵산 서열을 각 핵산 서열이 개별체가 되도록 앞뒤 일렬로 나열하여 벡터로 복제할 수 있음을 인식할 것이다. 각 핵산 본질은 한 벡터로부터 분리된 항원을 발현시키는 개별 핵산 서열의 발현을 일으키는 프로모터를 포함한다. 이 기술은 상기 개별 메시지를 전사하기 위해 다중 프로모터를 사용하여 핵산 서열을 효과적으로 발현한다.

<124> 본 발명의 또 다른 양태는 융합 단백질이 세포로부터 분리되는 조건하에서 융합 단백질을 생산하기 위해 본 발명의 발현 벡터를 세포로 도입하는 단계와 상기 벡터를 발현하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 생산 방법이다. 특정 양태에서, 상기 항원 제공 세포는 인비트로 상기 융합 단백질로 형질도입된다. 더욱 구체적으로, 상기 융합 단백질은 포유류에게 비경구적으로 투여된다.

<125> 본 발명의 특정 양태는 융합 단백질이 세포로부터 분리되는 조건하에서 상기 융합 단백질을 생산하기 위해 모두 작용가능하도록 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포내 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드 폴

리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 세포내로 도입하는 단계와 상기 벡터를 발현하는 단계를 포함하는 세포내 단백질의 분비 방법이다. 더욱 구체적으로, 상기 세포내 단백질을 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 절단되고 돌연변이되어 분비 효율을 증진시킨다. 특정 양태에서, 상기 세포내 단백질은 인간유두종바이러스 16의 E7단백질(Human Papillomavirus 16 E7:HPV 16 E7)이다.

<126> 본 발명의 또 다른 특정 양태는 융합 단백질이 세포로부터 분비되는 조건하에서 상기 융합 단백질을 생산하기 위해 모두 작용가능하도록 연결된 폴리뉴클레오티드 프로모터 서열, 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포내 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 세포 결합 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드 리아데닐레이션 서열을 포함하는 발현 벡터를 세포내로 도입하는 단계와 상기 벡터를 발현하는 단계를 포함하는 막 단백질의 분비 방법이다. 더욱 구체적으로, 상기 막 단백질을 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 절단되고 돌연변이되어 분비의 효율을 증가시킨다. 특정 양태에서, 상기 막 단백질은 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus:EBV) 핵 항원 1이다.

본 발명은 또한 본 발명의 조성물과 포유류의 세포나 조직에 의도적으로 상기 조성물을 투여하는 지시 물질을 포함하는 키트(kit)를 포함한다. 다른 양태에서, 이 키트(kit)는 포유류에 화합물을 투여하기 전에 본 발명의 상기 조성물을 녹이거나 현탁시키기에 적합한 용매(바람직하게 살균된)를 포함한다.

<127> 투약과 제제

<128> 본 발명의 발현 벡터, 형질 도입된 세포 및 융합 단백질(활성 성분)은 활성 성분과 유기체의 몸안의 작용의 물질 부위와 접촉을 일으키는 임의의 수단에 의해 다양한 질병을 치료하기 위해 제제화되고 투여될 수 있다. 상기 활성 성분은 개별적 치료 활성 성분 또는 치료 활성 성분의 조합으로 약물과 함께 사용할 수 있는 임의의 통상적인 수단에 의해 투여될 수 있다. 상기 활성 성분은 단독으로 투여될 수 있으나 일반적으로 선택된 투여 경로와 표준 조제 관행을 기초로하여 선택된 약학적 담체와 함께 투여된다.

<129> 상기 활성 성분은 캡슐, 정제 및 분말과 같은 고상 약물 형태, 또는 알콜성 강장제(elixirs), 시럽, 에멀전 및 현탁액과 같은 액상 약물 형태로서 경구로 투여된다. 상기 활성 성분은 또한 주사, 빠른 주입, 비강인두 흡수 또는 피부 흡수에 의해 비경구로 투여되기 위해 제제화된다. 상기 약물은 근육내, 정맥내 또는 좌약으로 투여될 수 있다.

<130> 젤라틴 캡슐은 상기 활성 성분과 락토오즈, 설탕, 만니톨, 전분, 셀룰로오스 유도체, 마그네슘 스테레이트, 스테아르산 등과 같은 분말 담체를 함유한다. 비슷한 희석제가 압축된 정제를 만들기 위해 사용될 수 있다. 정제 또는 캡슐은 여러 시간동안 약물이 계속 배출되도록 제공하기 위한 서방형 제제(sustained release products)로 제조될 수 있다. 압축된 정제는 설탕으로 코팅되거나 필름으로 코팅되어 상해하지 않은 냄새를 막고 대기로부터 정제를 보호하거나, 위장관에서 선택적으로 분리되기 위해 장내 코팅된다.

<131> 경구 투여를 위한 액상 약물 형태는 환자의 수용을 증가시키기 위해 색과 향을 포함한다.

<132> 일반적으로, 물, 적당한 오일, 식염수, 수용성 텍스트로스(글루코오스) 그리고 연관된 설탕 용액 그리고 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 경구 용액에 적당한 담체이다. 경구 투여를 위한 용액은 상기 활성 성분, 적당한 안정제 그리고, 만약 필요하다면 완충제를 포함한다. 소듐 바이설페이트, 소듐 설페이트 또는 아스코르브산 단독 또는 결합된 항산화제가 적당한 안정제이다. 또한 시트르산과 그의 염 그리고 소듐 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이 사용된다. 그 외에, 경구 용액은 벤잘코니움 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤과 클로로부탄올과 같은 방부제를 포함할 수 있다. 적당한 약물 담체는 이 분야의 표준적인 참고서인 *Remington's Pharmaceutical Science*에 기술되어 있다.

<133> 본 발명의 활성 성분은 포유류 특히 인간에게 사용되기 적당한 약학적으로 허용가능한 조성물에서 현탁되도록 제제화될 수 있다. 이런 제제는 미국 특허 제4,082,735호; 제4,082,736호; 제4,101,536호; 제4,185,089호; 제4,235,771호; 및 제4,406,890호에 기술되어 있는 뮤라일 디펩티드 유도체(MDP) 또는 그 유사체 같은 보조제의 사용을 포함한다. 유용한 다른 보조제는 알루미늄(alum(Pierce chemical Co.)), 지질 A, 트레할로오스 디미콜레이트 그리고 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDA), 프로이드의 보조제, 그리고 IL-12가 포함된다. 다른 성분은 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 블럭 폴리머(Pluronic®), 비이온성 계면활성제, 그리고 스쿠알렌과 같은 대사성 오일을 포함한다(미국 특허 제 4,606,918호).

<134> 그외, 표준적인 약학적 방법이 활동의 지속을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 상기 약학적 방법은 당해기술분야에서 공지되어 있고 조절 배출 제제를 포함하고 폴리머, 폴리에스터, 폴리아미노산, 폴리비닐, 피롤리돈, 에틸렌비닐아세테이트, 메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스 또는 프로타민 설페이트와 같은 적절한 거대 분

자를 포함할 수 있다. 투입 방법 뿐만 아니라 거대 분자의 농도는 배출을 조절하기 위해 조정될 수 있다. 더욱이, 상기 제제는 폴리에스터, 폴리아미노산, 하이드로겔, 폴리(락트산) 또는 에틸렌바이닐아세테이트 코폴리머와 같은 폴리머 입자 속에 포함된다. 포함되는 것 이외에, 상기 제제는 또한 마이크로캡슐에 화합물을 가두는 데 사용될 수 있다.

- <135> 본 발명의 상기 화합물의 투여를 위한 유용한 약물 형태는 다음에 기술된다.
- <136> 캡슐: 캡슐은 각각 100mg의 분말 활성 성분과 175mg의 락토오즈, 24mg의 활석 및 6mg의 마그네슘 스테아레이트를 갖는 표준적인 두 조각의 경질 젤라틴 캡슐을 채워서 제조된다.
- <137> 연질 젤라틴 캡슐: 콩기름에 있는 활성 성분의 혼합물이 준비되고 100mg의 활성 성분을 포함하는 연질 젤라틴 캡슐을 형성하기 위하여 용적형펌프(Postive displacement Pump)를 사용하여 젤라틴으로 주입한다. 상기 캡슐은 그 다음 세척되고 건조된다.
- <138> 정제: 정제는 약물 단위가 100mg의 활성 성분, 0.2mg의 콜로이드 실리콘 디옥사이드, 5mg의 마그네슘 스테레이트, 275mg의 마이크로크리스탈린 셀룰로오즈, 11mg의 옥수수전분 및 98.8mg의 락토오즈가 되도록 통상적인 방법에 의해 제조된다.
- <139> 주입: 주사(injection)에 의해 투여되기 적합한 비경구 조성물은 10부피%의 프로필렌 글리콜과 물에 1.5중량%의 활성 성분을 교반시킴으로써 제조된다. 상기 용액은 염화나트륨으로 등장액이 되게 만들고 살균한다.
- <140> 현탁액: 수용성 현탁액은 각 5ml가 100mg의 잘 쪼개진 활성 성분, 200mg의 소듐 카르보메틸 셀룰로오즈, 5mg의 소듐 벤조에이트, 1.0g의 소비톨 용액 U.S.P. 및 0.025ml의 바닐린을 포함하게 하도록 경구 투여를 위해 제조된다.
- <141> 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 여러 경로를 통해 포유류 신체의 여러 부위로 운반되어 특별한 효과를 달성한다(로센펠드 등., 1991; 로센펠드 등., 1991; 상기 자폐 등; 상기 베르크너). 당업자는 비록 한 종류 이상의 경로가 투여에 사용되더라도 한 특정한 경로가 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다는 것을 알 수 있다. 국부 또는 전신 운반은 제제가 체강 속으로 도포 또는 투입, 에어로졸의 흡입 또는 배출 또는 투여와 또는 근육내, 정맥내, 복막내, 피하, 피부내 등을 포함하는 비경구 투여뿐만 아니라 국소 투여를 포함하는 투여에 의해 성취될 수 있다.
- <142> 본 발명의 활성 성분은 티스폰 양, 정제, 용액 또는 좌약인 각 투여량 단위가 단독 또는 다른 활성제와 적절한 조합으로 상기 조성물의 소정의 양을 포함하는 단위 투여량 형태로 제공될 수 있다. 이곳에서 사용되는 상기 단위 투여량 형태란 용어는 인간과 포유류를 대상으로 단위 투여량으로써 적당한 물리적으로 분리된 단위를 언급하는 것이고, 상기 단위는 절적인 경우 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체, 부형제와 결합되어 원하는 효과를 발생하기에 충분한 양으로 계산된 단독 또는 다른 활성제와 조합되는 본 발명의 조성물의 소정의 양을 포함한다. 본 발명의 상기 단위 투여 형태에 대한 세부사항은 달성되는 특별한 효과와 특정 숙주에서 약학적 조성물과 관련된 특정한 약물 동력학에 의존한다.
- <143> 본 명세서에 기술된 방법은 결코 모두 포괄하지 않고 상기 특이한 적용에 적당한 다른 방법은 당업자에게 분명할 것이다. 더욱이, 상기 조성물의 유효량은 원하는 효과를 발휘하기 위해 공지된 화합물에 대한 유추를 통해 더 근접될 수 있다.
- <144> **지질 제제 및/또는 나노캡슐**
- <145> 어떤 양태에서, 지질 제제 및/또는 나노캡슐의 사용은 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하기 위해 고려된다.
- <146> 나노캡슐은 일반적으로 안정되고/되거나 재생산되는 방법으로 화합물을 가둘 수 있다. 세포내 고분자의 과부하에 의한 부작용을 피하기 위해, 초미세 입자(0.1 μ m 크기 정도)는 인비보 분리될 수 있는 고분자를 사용하여 설계되어야 한다. 이 필요조건을 만족하는 생분해성 폴리알킬시아노아크릴레이트 나노입자는 본 발명에서 사용되기 위해 고려되고/되거나 그러한 입자가 쉽게 만들어진다.
- <147> 본 발명의 특정 양태에서, 상기 발현 벡터는 상기 지질과 결합될 수 있다. 상기 지질과 결합된 상기 발현 벡터는 리포솜의 수용성 내부에서 캡슐화되고, 한 리포솜의 지질 이중층내에 산재되고, 리포솜과 올리고뉴클레오타이드 모두와 결합된 연결 분자에 의해 리포솜에 붙고, 리포솜에 갇히고, 리포솜과 복합체를 이루고, 지질을 포함한 용액으로 확산되고, 지질과 혼합되고, 지질과 결합되고, 지질에 현탁액으로 포함되고, 미셀을 포함하거나 미셀과 착물을 형성하고 그렇지 않으면 지질과 결합된다. 상기 지질 또는 본 발명의 조성물과 연관된 지질/발현 벡

터는 용액속에서 어느 특별한 구조로 한정되지 않는다. 예를 들어, 상기 지질/발현 벡터는 미셀로써 이중 구조로 존재할 수 있거나 붕괴된 구조를 가질 수 있다. 상기 지질/발현 벡터는 용액에 단순히 스며들 수도 있고, 크기 또는 모양이 일정치 않은 응집체를 형성하는 것이 가능하다.

- <148> 지질은 자연적으로 얻을 수 있거나 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 당업자에게 잘 알려진 화합물 부류 즉, 장쇄 지방족 탄화수소 그리고 지방산, 알콜, 아민, 아미노알콜 그리고 알데히드 같은 그 유도체 뿐만아니라 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 덩어리도 포함한다.
- <149> 인지질은 본 발명에 따른 상기 리포솜을 형성하기 위해 사용되고 알짜 양전하, 음전하, 중성 전하를 가지고 있을 수 있다. 다이아세틸 포스페이트는 상기 리포솜에 음전하를 주기 위해 첨가되고 스테아릴아민은 상기 리포솜에 양전하를 주기 위해 사용될 수 있다. 상기 리포솜은 하나 또는 그 이상의 인지질로 구성된다.
- <150> 중성 하전된 지질은 전하없는 지질, 실질적으로 전하 없는 지질 또는 양전하와 음전하가 동수인 지질 혼합물을 포함할 수 있다. 적당한 인지질은 포스파티딜 콜린을 포함하고 당업자에게 주지된 것들도 포함한다.
- <151> 본 발명에 따르면 사용하기 적당한 지질은 상업적으로 구할 수 있다. 예로, 디미리스틸 포스파티딜콜린(DMPC)은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.)에서 구할 수 있고, 디세틸 포스페이트(DCP)는 케이 앤 케이 레보라토리(K&K Laboratories(Plainview, NY))에서 구할 수 있고, 콜레스테롤(Chol)은 캘바이오텀-베링(Calbiochem-Behring)에서 구할 수 있고, 디미리스틸 포스파티딜글리세롤(DMPG)과 다른 지질은 아반티 폴라 리피드사(Avant i Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL))에서 구할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올에 있는 지질의 저장 용액은 약 -20℃에서 보관해야 한다. 바람직하게, 클로로포름이 메탄올보다 즉시 증발하므로 주된 용매로 사용된다.
- <152> 달걀 또는 콩 포스파티딜콜린, 뇌 포스파티딘산, 뇌 또는 식물 포스파티딜리노시톨, 심장 카디오리핀 그리고 식물 또는 박테리아 포스파티딜에탄올아민 같은 자연적으로 얻은 상기 인지질은 얻어진 리포솜의 불안정과 누출 때문에 바람직하게는 전체 50% 이상의 포스파티드 조성물을 구성하는 제 1 포스파티드로서 사용되지 않는 것이 바람직하다.
- <153> 리포솜은 포함된 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성되는 다양한 단일 또는 다중 라멜라 지질 담체를 포함하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중 막과 내부 수용성 매질을 가진 소포상 구조를 가진 것으로 특징될 수 있다. 다층 라멜라 리포솜은 수용성 매질에 의해 분리된 다층 지질층을 가지고 있다. 상기 다층 라멜라 리포솜은 인지질이 과량의 수용성 용액에 현탁되면 자연적으로 형성된다. 상기 지질 성분은 밀폐된 구조를 형성하기 전에 재배열을 하고 지질층 사이에 물과 용해된 용질을 가둔다(Ghosh와 Bachhawat, 1991). 그렇지만, 본 발명은 또한 보통의 소포상 구조 보다 용액속에서 다른 구조를 가진 조성물을 포함한다. 예를 들면, 상기 지질은 미셀 구조를 갖거나 단지 지방 분자의 비균일 응집체로서 존재한다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.
- <154> 인지질은 지방대 물의 물비에 의해 물에 분산될 때 리포솜이외의 다양한 구조를 형성할 수 있다. 낮은 물비에서 리포솜은 바람직한 구조를 가진다. 리포솜의 물리적 특성은 pH, 이온세기 및/또는 2가 양이온의 존재에 의존한다. 상기 리포솜은 이온성 물질 및/또는 하전 물질에 낮은 투과성을 나타낼 수 있으나 온도를 상승시키면 상기 투과성을 현저하게 바꿀 수 있는 상전이를 한다. 상전이는 조밀히 싸여진 정렬된 구조인 겔 상태에서 느슨히 싸여진 덜 정렬된 구조인 유체 상태로의 변화를 포함한다. 이 변화는 특징적인 상-전이 온도에서 일어나고/나거나 이온, 당 및/또는 약물에 대한 투과성의 증가를 가져온다.
- <155> 상기 리포솜은 4개의 다른 기작에 의해 세포와 반응한다. 매크로파아지 및/또는 중성 백혈구 같은 세망내피계의 식세포에 의한 세포내 섭취; 비특이 약한 소수력 및/또는 정전기력, 및/또는 세포 표면 성분과의 특이적 상호작용에 의한 세포 표면으로의 흡수; 리포솜 성분을 세포질로 동시에 배출하면서 리포솜의 지방 이중층을 플라스마 막으로 삽입하여 플라스마 세포막과의 융합; 및/또는 리포솜 내용물과의 연관없이 리포솜의 지방을 세포의 및/또는 세포 하부막으로의 전이 또는 그 반대. 상기 리포솜 제제를 변화시키면 하나 이상이 동시에 작동되더라도 어느 작용기작이 작동되는 가를 바꿀 수 있다.
- <156> 인비트로 리포솜-매개 올리고뉴클레오타이드의 운반과 외부 DNA의 발현은 매우 성공적이었다. 왕 (1980)등은 배양된 닭 배아에서, HeLa 및 간암 세포에서 리포솜-매개 운반과 외부 DNA의 발현의 가능성을 증명하였다. 니콜라우 (1987)등은 정맥내 주입후 쥐에 리포솜-매개 유전자 전이를 성공적으로 수행하였다.
- <157> 본 발명의 어떤 양태에서, 상기 지질은 혈액응고 바이러스(HVJ)와 결합된다. 상기 바이러스는 상기 세포막과 융합을 용이하게하고 리포솜-포획된 DNA(Kaneda e al., 1989)의 세포 침입을 증진시키는 것을 보여준다. 다른 양

태에서, 상기 지질은 복합화되고 핵 비-히스톤 염색체 단백질(HMG-1)과 접합하도록 수행된다(Kato et al., 1991). 다른 양태에서, 상기 지질은 복합화되고 HIV와 HMG-1 모두와 접합하도록 수행된다. 그러한 발현 벡터는 전이와 인비트로와 인비보에서 발현을 성공적으로 수행하여서 본 발명에 응용 가능하다. 박테리아 프로모터가 상기 DNA 구조체에서 작동하는 곳에서, 또한 상기 리포솜내에서 적절한 박테리아 중합 효소를 포함하는 것이 바람직할 것이다.

<158> 본 발명에 의해 사용된 상기 리포솜은 다른 방법으로도 만들 수 있다. 리포솜의 크기는 합성 방법에 따라 변한다. 수용액에 현탁된 상기 리포솜은 일반적으로 지방 이중층의 하나 또는 그 이상의 동심층을 갖는 구형 소포의 형태를 갖는다. 각 층은 X는 친수성 부분이고 Y는 소수성 부분인 XY 식으로 나타나는 분자의 평행 배열로 구성된다. 수용성 현탁액에서, 상기 동심층은 상기 친수성 영역이 수용층과 접촉되고 상기 소수성 영역은 자기-응집되도록 배열된다. 예를 들면, 수용층이 상기 리포솜 내외부에 존재할 때, 지질 분자는 XY-YX 배열인 라멜라로 알려진 이중층을 형성할 수 있다. 지질의 응집체는 하나 이상의 지질 분자의 상기 친수성 부분과 상기 소수성 부분이 서로 결합될 때 형성될 수 있다. 이들 결합체의 크기와 모양은 용매의 성질과 용액에 있는 다른 화합물의 존재와 같은 많은 다른 변수들에 의존 할 것이다.

<159> 본 발명의 범위내에 있는 리포솜은 공지된 실험 방법에 따라 준비될 수 있다. 한 바람직한 태양에서, 리포솜은 유리나 배모양 플라스크의 용기에서 용매에 리포솜 지질을 혼합함으로써 제조된다. 상기 용기는 예상되는 상기 리포솜 현탁액의 부피보다 10배 많은 부피여야 한다. 회전 증발기를 사용하여, 용매는 감압하에서 약 40℃에서 제거된다. 상기 용매는 리포솜의 원하는 용적에 따라 보통 5분에서 2시간이면 제거된다. 조성물은 진공하에서 건조기에서 더 건조될 수 있다. 상기 건조된 지질은 일반적으로 시간이 지남에 따라 열화되는 경향이 있기 때문에 1주후에는 버려야 한다.

<160> 건조된 지질은 모든 지질 필름이 재현탁될 때까지 멸균된, 파이로젠 제거수에서 흔들면서 약 25-50mM 인지질로 수화될 수 있다. 상기 수용성 리포솜은 분취량으로 분리되어 각각을 병에 담고 동결건조하고 진공하에서 봉입된다.

<161> 선택적으로, 상기 리포솜은 다른 공지된 실험 절차를 따라 제조될 수 있다. 즉, 이후에 참고문헌으로 포함된 내용인 반감 등의 방법(1965), 이의 내용은 참조로 본 명세서에 포함된다; *DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE*, G. Gregoriadis ed. (1979) pp. 287-341에 기술된 그레고리아디스 방법, 이의 내용은 참조로 본 명세서에 포함된다; 1983년 디아머와 어스터의 방법, 이의 내용은 참조로 본 명세서에 포함된다; 및 스조까와 파파하조푸로스에 의해 1978년 기술된 역상 증발 방법이 있다. 상기한 방법들은 수용성 물질을 포획하는 각각의 능력과 각각의 공간-대-지질비(space-to-lipid ratio)가 다르다.

상기한 방법으로 준비한 상기 건조된 지질과 동결건조한 리포솜은 탈수하고 저해 펩티드의 용액으로 재구성하고 DPBS 같은 적당한 용매를 가지고 적절한 농도로 희석할 수 있다. 그런 후에 상기 혼합물은 와류믹서에서 격렬히 교반한다. 캡슐화되지 않은 핵산은 29,000 ×g 의 원심 분리로 제거되고 상기 리포솜 덩어리는 세척된다. 상기 세척된 리포솜은 약 50-200mM 같은 적절한 전체 인지질 농도에서 재현탁된다. 캡슐화된 핵산의 양은 표준적인 방법으로 결정된다. 상기 리포솜 제제에서 캡슐화된 핵산의 양을 결정한 후, 상기 리포솜은 적절한 농도로 희석되고 사용할 때까지 4℃에서 보관한다.

<162> 삭제

<163> 상기 리포솜을 포함하는 약학적 조성물은 보통 살균되고, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 물이나 식염수 같은 희석제를 포함할 것이다.

<164> 유전자 치료 방법

<165> 당업자는 본 발명의 상기 발현 벡터가 유전자 치료에 사용될 수 있다는 것을 인식한다. 상기 유전자 치료를 위하여 당업자는 사용되는 상기 벡터가 프로모터에 작용가능하도록 연결된 관심있는 유전자를 포함해야 한다는 것을 인식하였을 것이다. 안티센스 유전자 치료를 위하여, 관심있는 상기 유전자의 상기 안티센스 서열은 한 프로모터에게 작용가능하도록 연결되어야 한다. 당업자는 어떤 경우에 3' UTR 조절 서열과 같은 다른 서열이 관심있는 유전자의 발현에 유리하다는 것을 알아차렸을 것이다. 적절한 유전자 치료 벡터는 투여의 적절한 경로로 이 분야에 알려진 방법인 고상, 반고상, 액상 또는 기상으로 준비되도록 처방된다. 이 분야에서 알려진 방법은 조성물이 표적 기관에 도달할 때까지 조성물의 배출과 흡수를 막기 위해 또는 조성물의 시간 조절된 배출을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 상기 조성물을 효과없게 하지 않는 약학적으로 허용가능한 형태가 사용되

어야 한다. 약학적 투여 형태로, 상기 조성물이 단독 또는 적절하게 결합되는 것 뿐만 아니라 다른 약학적으로 활성인 화합물과 조합되어 사용될 수 있다. 상기 치료용 핵산 서열을 포함하는 충분한 양의 벡터는 유전자 생산물의 약리학적 유효량을 제공하기 위해 투여되어야 한다.

<166> 당업자는 운반의 다른 방법들이 벡터를 세포에 투여하기 위해 이용될 수 있음을 알고 있다. 예를 들면, (1) 전기영동(전기), 유전자 총(물리적) 또는 많은 양의 액체를 투입(압력)하는 것과 같은 물리적 수단을 이용하는 방법 (2) 상기 벡터가 리포좀, 응집 단백질 또는 수송 분자 같은 다른 물질에 착화되는 방법을 포함한다.

<167> 따라서, 본 발명은 치료용 유전자를 숙주에 이전하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 상기한 투여 경로들의 하나 또는 당업자에게 공지되고 특정한 활용에 적절한 다른 경로를 사용하여, 바람직하게는 조성물의 일부로서 본 발명의 상기 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 따라 벡터에서 숙주 세포로의 효과적인 유전자 전이는 치료 효과(즉, 치료되는 특별한 병과 관련된 일부 증상의 완화) 또는 상기 숙주내에 전이된 유전자의 존재 또는 상기 유전자의 발현에 의해 모니터링된다(즉, 숙주 세포내에서 핵산을 검출하기 위해 서열화, 노던 또는 서던 혼성화, 또는 전사 분석과 접합하여 중합 효소 체인 반응(PCR)을 사용하거나 면역블롯 분석, 항체-매개 검출, mRNA 또는 단백질 반감기 연구, 또는 상기 전이된 핵산에 의해 암호화된 단백질과 폴리펩티드를 검출하는 특수 분석법, 또는 상기 전이에 의한 수치와 작용의 영향을 이용).

<168> 본 명세서에 기술되는 상기 방법들은 결코 모두 포괄적이지 않고, 상기 특정한 활용에 적절한 다른 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 더욱이, 상기 조성물의 유효량은 원하는 효과를 발휘하는 것으로 공지된 화합물을 유추하여 더 근접시킬 수 있다.

<169> 더욱이, 실제 투약과 계획은 상기 조성이 다른 약학적 조성물과 조합되어 투여되는 지 여부 또한 약동학, 약물 내성, 및 대사에서의 개인별 차이에 따라 변할 수 있다. 비슷하게, 투여량은 인비트로 활용에서 사용되는 특정 세포주에 따라 변할 수 있다(즉, 세포 표면에 있는 벡터 수용체의 수에 기초하거나 상기 세포주에서 복제하는 유전자 전이를 위해 사용된 특정 벡터의 능력에 기초함). 더욱이, 세포당 첨가되는 벡터의 양은 상기 서열의 성질 뿐만 아니라 상기 벡터에 삽입되는 상기 치료용 유전자의 길이와 안정성에 따라 변할 것이고, 특히 경험적으로 결정될 필요가 있는 파라미터이고, 본 발명의 상기 방법에 고유하지 않은 요소에 의해 달라질 수 있다(예를 들면, 합성에 관련된 비용). 당업자는 특별한 상황의 요구에 따라 필요한 조정을 쉽게 할 수 있을 것이다.

<170> 상기 치료용 유전자를 포함하는 세포가 또한 자살 유전자(즉, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제를 파괴하기 위해 사용될 수 있는 생성물을 암호화한 유전자)를 포함할 수 있다. 많은 유전자 치료 상황에서, 숙주 세포에 치료 목적으로 유전자를 발현할 수 있고 또한 일단 치료가 끝나고 통제되지 않거나 예상할 수 있거나 바람직한 결과를 나타내지 않을 때 상기 숙주 세포를 파괴하는 능력을 가져야 하는 것이 바람직하다. 그러므로, 숙주 세포에서 치료용 유전자를 발현하는 것은 비록 프로드러그(prodrug)의 부재시에는 상기 자살 유전자의 생성물이 해롭지 않더라도 프로모터에 의해 유발될 수 있다. 일단 치료가 끝나거나 더 이상 요구되거나 필요되지 않으면 프로드러그의 투여는 상기 자살 유전자 생성물이 상기 세포에 치명적으로 만든다. 사용될 수 있는 자살 유전자/프로드러그 조합의 예는 단순 포진 바이러스-티미딘 키나아제(HSV-tk)와 갠시클로비어(ganciclovir), 아크틸클로비어(acyclovir) 또는 FIAU 조합; 산화환원효소(oxidoreductase)와 사이클로헥시미딘(cycloheximidine); 사이토신 디아미나아제(cytosine deaminase)와 5-플로로사이토신(5-fluorocytosine); 티미딘 키나아제 티미딜레이트 키나아제(thymidine kinase thymidilate kinase(Tdk::Tmk))와 AZT; 그리고 디옥시시티딘 키나아제(deoxycytidine kinase)와 사이토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside)가 있다.

<171> 다음 실시예는 예로 제공된 것이고 본 발명의 범위는 실시예에 기재된 내용으로 한정되지 않는다.

실시예

<198> 실시예 1

<199> 레트로바이러스 벡터에서 HBe 항원의 구축 및 발현

<200> 비록 HBcAg 및 HBeAg 단백질 둘 다 HBV pre-CC 유전자에 의해 암호화되었지만, 상기 분비 HBeAg 단백질은 HBcAg를 위한 개시코돈의 개시 코돈 29 잔기 상류에서 시작된다. ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 얻은 상기 HBeAg 유전자는 2개의 돌연변이를 치유하도록 손질하였다. 상기 두 돌연변이는 단일 염기쌍 소실로부터 발생되는 것으로 발견되었고, 74 코돈에서 프레임쉬프트(frameshift)를 일으켜 84 및 85에서 두 연속적인 정지코돈을 만들었다. 이 돌연변이는 PCR mutagenesis를 사용하여 결실된 염기를 삽입함으

로써 치유하였다. 바이러스 감염 동안 쪼개어진 HBeAg의 아르기닌-리치 C-말단 염기서열(aa 150-185)은 결실되었다. 그런 후에 상기 끝단이 잘린 HBeAg 유전자는 IgG Fc 분절과 함께 프레임내(in-frame) 융합되었다. 상기 HBe-레트로젠 융합 유전자(HBe-레트로젠)는 레트로바이러스 벡터, 또는 발현 벡터 pRc/CMV로 복제하였다. 상기 HBcAg(세포기질성) 및 HBeAg(분비성)을 포함하는 상기 벡터는 당해기술분야에서 이용가능한 기술을 이용하여 구축하였으며, 예를 들면, 샘브룩(1989) 등 과 아우스벨(1997) 등에 기술되어 있다. 상기 IgG Fc 분절 유전자는 단일 선도 염기서열 IgG와 함께 융합하였고 도 2A에서 도시된 바와 같이 발현 벡터 속에 복제하였다. 이 방식에서, 상기 HBeAg 유전자(분비성), 단일 선도 염기서열을 갖는 Fc 분절 유전자(분비성), 또는 HBcAg 유전자(세포기질성)를 포함하는 일련의 대조군 레트로바이러스 벡터를 도 2A에서 도시된 바와 같이 구축하였다.

<201> 상기 HBe-Fc의 발현 및 분비를 판단하기 위해, COS 세포가 다양한 벡터와 함께 트랜스펙션되었고(transfected), 48시간 지나후 COS 세포는 방사능 동위원소로 표시되었다. 도 3에서 도시된 바와 같이, HBeAg-Fc 융합 단백질에 상응하는 단백질 밴드는 상기 두 단백질 (HBeAg-Fc) 중 하나가 안티휴먼 IgG 또는 안티-HBeAg 항체 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)와 함께 침전되는 경우 세포 여액(lysate) 및 배지 둘 다에서 검출되었다.

<202> 트랜스펙션된 세포의 면역형광 염색(Immunofluorescent staining)은 또한 전형적인 분비 단백질 패턴을 나타내었다. 상기 HBcAg 단백질은 트랜스펙션된 세포로부터 얻은 세포 여액에서만 관찰되었으며, 상기 HBeAg 및 Fc 분절 단백질은 상기 배지 및 상기 세포여액 둘 다에 관찰되었다. 이 결과는 상기 HBeAg-Fc 단백질 (HBe-레트로젠)은 세포로부터 효과적으로 생산되고 분비됨을 나타낸다.

<203> 실시예 2

<204> 수지상 세포(DCs)에서 HBe-레트로젠의 형질도입 및 발현

<205> DCs에서 상기 "레트로젠(retrogen)" 전략을 평가하기 위해서, 상기 HBe-레트로젠을 포함하는 레트로 바이러스 벡터 또는 NGFR 마커(도 2A)를 포함하는 다양한 조절 유전자는 상기 일시적인 트랜스펙션을 이용한 PA317 패키징 셀로부터 생산하였다. 쥐의 골수세포는 C57BL/6 쥐로부터 얻었다. 상기 세포는 쥐의 간세포 인자(stem cell factor)(SCF)와 IL-6로 보충된 배지에서 자극하였고 이하에서 기술된 바와 같이 상기 레트로바이러스 벡터와 함께 형질도입하였다.

<206> DCs의 형질도입

<207> 대략 40% 컨플루언시(confluency)에서 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 얻은 PA317 패키징 셀은 10% 태아소혈청(fetal bovine serum)(FBS)을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)와 함께 100mm 배양접시에서 배양하였다. 상기 세포들은 10-15 μ m 필터로 형질도입하였다.

<208> 쥐 골수는 쥐 다리의 뼈로부터 분출시켜서 나일론 메쉬(mesh)를 통과시키고 염화 암모늄으로 적혈구를 고갈시켰다. RPMI-1640으로 많이 세척한 후에, 상기 세포는 37℃에서 40-60분 동안 토끼 보체(complement)와 RPMI-1640 내의 단클론 항체의 혼합물 세트(cocktail set), 안티-CD4+, 안티-CD8+, 안티-B 세포 및 안티-MHC 중 포지티브 세포와 함께 배양하였다. RPMI-1640으로 많이 세척한 후, 5 $\times$ 10⁵ 세포/ml를 6% FBS, 80ng mSCF/ml, 20UrmIL-6/ml가 보충된 RPMI-1640에 현탁하였다. 상기 셀을 12웰 배양판(3ml/웰)에 놓았고, 37℃ 및 5% 이산화탄소로 하룻밤 동안 배양시키고 상기 동일한 성분을 포함하는 신선한 배지로 대체하였다. 48시간 배양 후, 상기 세포를 원심분리기로 모았고, 1.5ml의 레트로바이러스 상층액(supernatant)에 재현탁하였고, 10mg/ml 농도로 레트로넥틴(Retronection)으로 코팅된 24-웰 배양판에 두었다. 상기 세포를 37℃에서 90-120분 동안 2,500rpm으로 원심분리하고, 레트로바이러스 형질도입을 위해 추가적으로 3-4시간 동안 37℃ 및 5% 이산화탄소로 배양하였다. 그런 후에 상기 레트로바이러스 상층액을 5% FBS, 10ng mSCF/ml, 60ng mGM-CSF/ml, 100UrmIL-4/ml(R&D System, Minneapolis, MN)로 보충된 2.5ml의 RPMI-1640로 하룻밤동안 교체하였다. 그런 후에 상기 형질도입 절차를 2-3번 반복하였다. 형질도입후, 상기 세포를 채취하기 전에 상기 DCs를 더 숙성하기 위해 수 일 동안 mGM-CSF 및 mIL-4를 포함한 옵티-멤(Opti-MEM(GIBCO, Grand Island, NY))에 배양하였다(Banchereau et al., 1998; Inaba et al., 1992).

<209> 형질도입의 평가(발현의 측정)

<210> 배양기에서 수 일이 지난 후, 세포는 전형적인 DC 형태를 나타내었고 높은 수치의 MHC, 흡착, 공동-자극(co-stimulation) 분자(CD11, CD54, CD80 및 CD86)는 골수-유도 DCs(도 4A-4C 및 도 5A-5E)에서 발현되었다. 안티-NGFR 염색에 의해 측정된 바와 같이, 상기 배양액에서 상기 세포의 약 20 내지 30%가 형질도입되었다. 상기 DCs에서 HBe-레트로젠 유전자의 전사는 RT-PCR 분석에서 검증되었다.

- <211> 상기 RT-PCR 분석은 하기와 같이 수행하였다: 세포성 RNA를 트리조알 (Trizol)(Gibco-BRL Grand Island, NY)을 이용한 DCs로부터 추출하였고 37℃에서 30분 동안 RNASE-free DNASE로 처리하였다. 역전사 후에, 상기 cDNA는 상기 HBeAg 유전자에 상응하는 한 쌍의 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 위한 주형(template)으로 사용하였다. 상기 PCR 생산물은 아가로즈를 통해 전기영동으로 분석하였다.
- <212> 취합하면, 이 결과들은 상기 HBe-레트로젠 융합유전자는 쥐의 골수세포 속에 효과적으로 형질도입되고 골수유도 DCs에서 발현됨을 나타낸다. 흥미롭게도, 형질도입된 HBe-레트로젠을 포함하는 DCs상에 MHC-II 및 공동자극 분자의 표면발현은 HBeAg 또는 HBcAg와 함께 형질도입된 DCs 상 분자들의 발현보다 상당히 높았다. 이 결과는 수용체(receptor)에 대한 상기 Fc의 결합이 상기 DCs를 활성화시켰음을 나타낸다.
- <213> **실시예 3**
- <214> **순수한(naive) CD4+-T-세포의 인비트로(in vitro) 활성화**
- <215> 상기 형질도입된 DCs가 세포배양액에서 순수 CD4+-T-세포를 초회피항원자극(priming)할 수 있는지를 평가하기 위해서, 쥐 비장세포 C57BL/B6로부터 분리된 순수 CD4+-T-세포는 1:20의 비(DCs:T-세포)로 실시예 1의 레트로바이러스 벡터와 함께 형질도입된 쥐의 DCs와 함께 공동-배양하였다. CD4+ 세포는 컬럼이 많은 CD4+-T-세포(R&D System, Minneapolis, MN)를 이용한 쥐 비장의 현탁액으로부터 분리되었다. CD8+ 세포는 CD8+-T-세포 농축 컬럼(R&D System, Minneapolis, MN)을 사용하여 쥐 비장의 현탁액으로부터 분리하였다. 정제된 CD4+ 또는 CD8+는 37℃ 및 5% 이산화탄소로 10% FBS가 보충된 RPMI-1640에 배양하였다.
- <216> 순수 CD4+-T-세포는 HBcAg와, HBeAg, 또는 Fc 분절 유전자와 함께 형질도입된 상기 DCs와 함께 공동-배양될 때, 단지 낮은 또는 바닥 수치의 과립구마크로파지 콜로니자극인자(GM-CSF) 및 감마 인터페론(IFN- γ)은 ELISA에 의해 배지에서 검출되었다. 더욱이, 세포수 또는 ³H-티미딘(thymidine)의 결합율을 관찰할 때 명백한 T-세포 증식이 관찰되지 않았다. 반대로, 순수 CD4+-T-세포가 5일 동안 상기 HBe-레트로젠과 함께 형질도입된 상기 DCs와 함께 배양되었을 때, T세포는 활동적으로 증식되었고 높은 수치의 GM-CSF 및 감마 인터페론이 상기 배지에서 검출되었다(도 6A 및 도 6B). 이 결과는 분비 HBeAg 또는 세포기질 HBcAg은 DCs에 의해 효과적으로 처리하여 MHC-II에 제공할 수 없음을 나타낸다. 반대로, 분비성 HBe-레트로젠은 효과적으로 처리될 수 있고 DCs에서 MHC-II로의 Fc-수용체-매개(mediated) 내재화 및 제공이 이어져 순수 CD4+-T-세포의 인비트로 활성화를 유도한다.
- <217> 명백한 순수 CD8+-T-세포의 활성화가 상기 형질도입된 DCs와 공동-배양에서 검출되지 않았다. 상기 세포-배양에서 순수 CD8+-T-세포의 활성화를 검출하는데 실패한 것은 상기 HBeAg 내 단지 하나의 공지된 MHC-I 제한 항원결정부(epitope)가 있고 CD4+-T-세포는 CD8+-T-세포의 효과적인 활성화를 위해 필요하기 때문일 것 이다(Ridge et al., 1998).
- <218> 상기 레트로젠 전략을 이용한 MHC-II-제한 항원 표현을 더욱 검증하기 위해서, DCs에 의한 MHC-II 항원 제공이 없어진 MHC-II 녹아웃(knockout)(KO) C57BL/6 쥐를 사용하였다(Charles River, NY). 와일드-타입(WT) 또는 MHC-II KO 쥐로부터 유도된 DCs를 상기 HBe-레트로젠으로 형질도입하고 그런 후에 1:20의 비로 WT 쥐로부터 얻은 CD4+-T-세포와 함께 공동-배양하였다. 도 7A 및 7B에서 도시된 바와 같이, 단지 낮은 수치의 GM-CSF 및 감마 인터페론이 상기 형질도입된 KO-DCs를 포함한 공동-배양의 배지에서 검출되었고 명백한 T-세포 증식도 관찰되지 않았다. 반대로, CD4+-T-세포가 5일 동안 형질도입된 WT DCs로 공배양되었을 때, 상기 T-세포는 활성적으로 증식되었고 배지에서 높은 수치의 GM-CSF 및 감마 인터페론이 검출되었다(도 7A 및 7B).
- <219> **실시예 4**
- <220> **보조(helper) 및 세포독성(cytotoxic) T-세포의 인비보 유도 및 B-세포 면역 반응**
- <221> 상기 레트로젠 항원 제공 전략의 가능성은 인비보로 평가하였다. 쥐 (C57BL/B6)를 네 그룹(4 내지 6 마리 쥐/그룹)으로 나누고 각 쥐는 복강내의 (intraperitoneal) 주사로 50,000 U IL-2(Chiron Corp. Emmerlyville, CA)를 포함하는 0.2ml PBS에 HBcAg, HBeAg, Fc, 또는 HBe-레트로젠으로 형질도입된 약 50만 개의 DCs가 투여되었다. 다른 횟수의 최종 투여에서, 상기 쥐는 희생되고, 말초혈액과 비장과 다른 기관들을 수집하였다. T-세포는 CD4 또는 CD8+ T-세포 농축 컬럼(R&D System, Minneapolis, MN)을 사용하여 분석하기 위해 분리되었다.
- <222> 처음 주사 후 3달 동안, 쥐는 희생되고, 말초혈액과 비장과 다른 조직 샘플들을 수집하였다. 전체 조사로부터, 복막강(peritoneal cavity)내 림프노드(lymph node)는 상기 HBe-레트로젠-형질도입된 DCs를 투입한 쥐에서 상당히 커졌지만, 정상 쥐 및 다른 구성물을 투입한 쥐에서는 상기 림프노드는 너무 작아서 보이지 않았다. 조직학적 조사는 또한 HBe-레트로젠-DCs를 투입한 쥐의 복막 림프노드에서 T-세포 및 B-세포의 활성적인 증식을 보

였다.

<223> 실시예 5

<224> T_H1 및 T_H2 보조(helper) T-세포의 유도

<225> 실시예 4에서와 같이 면역된 쥐는 T_H1 및 T_H2 보조 T-세포의 유도를 판단하는데 사용되었다. 당업자는 T_H1 및 T_H2 보조 T-세포의 유도를 판단하는데 대한 중요성에 대해 인식하고 있다. $CD4^+$ -T-세포는 하기의 기능을 수행하는 것으로 공지되어있다: 1) $CD4^+$ -T-세포는 B-세포가 플라즈마 세포를 생산하는 항체로 발전하도록 돕고; 2) $CD4^+$ -T-세포는 $CD8^+$ -T-세포가 활성화된 세포독성 T-세포가 되도록 돕고; 3) $CD4^+$ -T-세포는 지발 과민성(delayed hypersensitivity)을 초래한다. 이 기능들은 $CD4$ 세포의 두 가지 부차개체군(subpopulation)에 의해 수행된다: T_H1 세포는 지발 과민성을 매개하고 IL-2 및 감마 인터페론을 주로 생산하는 반면에, T_H2 세포는 B-세포 보조 기능을 수행하고 IL-4 및 IL-5 를 주로 생산한다.

<226> $CD4^+$ -T-세포는 안티- $CD4$ 컬럼(R&D System, Minnieapolis, MN)를 사용하여 면역된 쥐의 비장으로부터 분리되었고 그런 후에 이 세포는 재조합 HBeAg 단백질로 펄스된 쥐의 DCs와 공동-배양되었다. 1000:1의 T-세포:DCs의 비를 갖는 세포의 공동-배양액에서 단지 2일 후, 상기 HBe-레트로젠-DCs를 투입한 쥐로부터의 $CD4^+$ -T-세포는 활성적으로 증식되었다. 높은 수치의 GM-SCF 및 IFN- γ (마크로파지 및 $CD8^+$ -T-세포를 자극하다) 뿐만 아니라 IL-4 및 IL-5(B-세포 자극하다)는 상기 공동-배지에서 검출되었다. 안티-C8 항체가 아니라 안티- $CD4$ 항체는 이 공동-배양 T-세포에서 시토카인(cytokine) 생산을 현저하게 방해하였다. 반대로, HBeAg-, HBcAg-, 또는 Fc-DCs로 면역된 쥐로부터 얻은 $CD4^+$ -T-세포가 HBeAg-DCs와 공동-배양되었을 때, 단지 낮은 수치의 GM-SCF, IFN- γ , IL-4 및 IL-5가 상기 공동-배양 배지에서 검출되었으며, 활성화 T-세포 증식이 관찰되지 않았다. IL-4 및 IL-5는 T_H2 세포에 의해서, GM-SCF 및 감마 인터페론은 T_H1 세포에 의해서 주로 생산되기 때문에, 이 결과는 HBe-레트로젠-형질도입된 DCs가 T_H1 세포 및 T_H2 세포 둘 다를 효과적으로 활성화시킴을 나타낸다.

<227> 실시예 6

<228> 안티-HBeAg 항체의 높은 역가 유도

<229> 쥐는 실시예 4에서와 같이 항체 수치를 판단하기 위해서 면역되었다. HBe-레트로젠-형질도입된 DCs에 의한 쥐의 면역은 쥐에서 높은 역가(titer)이고, 장시간의 안티-HBe/cAg 항체 반응을 유도하였다.

<230> 도 8에서 도시된 바와 같이, 안티-HBeAg 항체의 상당히 높은 역가는 HBeAg-형질도입된 DCs를 투여한 쥐에서 보다 상기 HBe-레트로젠-형질도입된 DCs를 투여한 쥐의 혈청에서 검출되었다. 상기 면역된 쥐의 혈청에서 안티-HBcAg 항체의 수치는 ELISA를 이용하여 평가되었다. 간략히, HBcAg 재조합 단백질(50ng/웰)로 코팅된 마이크로 티터 판(microtitre plate)은 4°C에서 2시간 동안 차단 완충액(blocking buffer)에서 순차적으로 희석된 혈청으로 배양되었다. 결합 항체는 차단 완충액에서 희석된 쥐 IgG에 대한 과산화효소-접합(peroxidase-conjugated) 항체와 배양된 후 검출되었다. 카이론사(Chiron Corp., Emmergyville, CA)로부터 얻은 다중클론의(polyclonal) 안티-HBcAg 항체는 양성 대조군으로 사용하였고, 정상 쥐의 혈청은 음성 대조군으로 사용하였다. 상기 항체 역가는 상기 음성 수치의 2배 이상인 OD_{50} 값을 갖는 가장 높은 희석으로 정의되었다.

<231> 상기 관찰된 항체 생산의 폴드(fold) 증가는 $CD4^+$ 보조 T-세포의 더 강한 활성화에 기인할 수도 있다. HBcAg-형질도입된 DCs로 면역된 쥐의 혈청에서 상당히 낮은 수치의 안티-HBe/cAg 항체는 HBcAg의 세포기질 위치 및 $CD4^+$ T-세포 활성화의 결여에 기인 할 수도 있다. 그러므로, 상기 HBe-레트로젠은 상기 동일하게 면역된 포유류에서 항체반응의 유도에 대한 다른 HBeAg 및 HBcAg보다 훨씬 우수하다. 취합하여, 쥐모델 연구의 결과는 HBe-레트로젠으로 형질도입된 DCs는 활력적인 $CD4^+$ -T-세포 및 $CD8^+$ -T-세포, 뿐만 아니라 B-세포 활성화를 유도하였음을 나타낸다.

<232> 실시예 7

<233> 세포내 중앙 항원의 벡터 구성

<234> MAGE-3는 MHC-II에 대한 제공이 일어나지 않거나 어렵게 만드는 내인성 MHC-II 제공 경로(pathway)를 위한 표적 염기서열을 결여한 세포기질 및 핵 단백질이다. 쥐 동족체(homolog)도 없기 때문에, 인간 MAGE-3 유전자는 MAGE-3의 분비가 가능하도록 인간 Chemokine RANTES로부터 유도된 단일 선도 염기서열과 연결되어 있다. 전장 MAGE-3 유전자를 암호화하는 플라스미드는 한 쌍의 프라이머로 상기 MAGE-3 DNA를 증폭시키기 위한 주형으로 사

용되었다: 5'-프라이머(A):(SEQ. ID. No. 1) 추가적인 Sal I 제한 부위를 가진 상기 MAGE-3의 폴리뉴클레오티드 서열 1 에서 24까지 상응하는 **5'-ACGCGTCGACATGCCTCTTGAGCAGAGGAGTCAG-3'** 및 3'프라이머

(B):(SEQ. ID. No. 2) Xho I 부위를 가진 상기 MAGE-3의 폴리뉴클레오티드 서열 921 에서 945까지 상응하는 **5'-CCGCTCGAGTCACTCTTCCCCCTCTCTCAAAAC-3'**. 인간 RANTES 유전자로부터 유도된 단일 선도 서열의 첨가는 한 쌍의 프라이머에 의한 PCR 증폭에 의해 생성되었다: 5'-프라이머(C):(SEQ. ID. No. 3) Sal I 부위를 가진 상기 RANTES 단일 선도 서열 및 상기 MAGE-3의 폴리뉴클레오티드 서열 1 에서 24까지와 상응하는

**5'-ACGCGTCGACATGAAGGTCTCCGCGGCAGCCCTCGCTGT
CATCCTCATTGCTACTGCCCTCTGCGCTCCTGCATCTGCCATGCCTCTT
GAGCAGAGGAGTCAG-3'**

및 3'프라이머-B. 정지코돈 없이 상기 단일-MAGE-3 분절(s-MAGE-3)은 5'-프라이머-C와 3'-프라이머(D)로 PCR에 의해 발생되었다: (SEQ. ID. No. 4) Not I 부위를 가진 MAGE-3의 폴리뉴클레오티드 서열 921에서 942까지에 상응하는

5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCTTCCCCCTCTC TCAAAAC-3'

. 가장 강력한 APCs인 DCs는 효율적인 MHC-II 뿐만 아니라 MHC-I 제한된 항원에 대한 전용 항원 내재화(internalization)를 경로를 매개하는 IgG Fc 수용체(FcγRs)를 발현한다. 따라서, 쥐의 DCs상에 Fc 수용체에 효과적으로 결합될 수 있는 인간 IgG1a로부터 유도된 Fc 분절 cDNA는 DCs(도 9A)에 의해 MAGE-3 내재화를 매개하기 위해 변형된 MAGE-3 유전자와 프레임내에서 융합되었다. 그런 후에 상기 분비성 MAGE-3 융합 유전자(s-MAGE-3-Fc)는 쥐의 레트로바이러스 벡터 pFB-Neo (Statagen)(도 9A)로 복제되었다. 상기 인간 IgG cDNA Fc 분절은 주형으로서 인간 IgG1a 중쇄(heavy chain) cDNA를 포함하는 플라스미드 pEE6/CLL-1로 PCR 증폭에 의해 발생되었다. 상기 PCR 반응에 대한 프라이머 쌍은: 5'-프라이머(E), (SEQ. ID. No. 5) 추가적인 Not I 부위를 가진 중쇄의 폴리뉴클레오티드 서열 785에서 802까지

와 상응하는 **5'-ATAAGCGGCCGCTAAACTCACA CATGCCCA-3'**, 3'-프라이머(F), (SEQ. ID. No. 6) Xho I 부위를 가진 중쇄의 폴리뉴클레오티드 서열 1447에서 1468까지와 상응하는

5'-CCGCTCGAGTCAT TTACCCGAGACAGGGAGAG-3'

. pFB-Neo(Statagen)인 쥐의 레트로바이러스 벡터가 이 연구를 위해 사용되었다. 상기 레트로바이러스 벡터 s-MAGE-3-Fc는 상기 정지코돈과, Fc와, Sal I /Xho I-잘린 pFB-Neo 없이 s-MAGE-3 분절의 세 조각 연결(ligation)로써 구성되었다. 상기 레트로바이러스 벡터 s-MAGE-3 또는 MAGE-3는 상기 s-MAGE-3 또는 MAGE-3 유전자를 각각 Sal I /Xho I-잘린 pFB-Neo에 삽입함으로써 구성되었다. 상기 IgG Fc 발현 벡터를 구성하기 위해서, 상기 인간 IgG Fc cDNA 분절은 두 번의 PCR 반응에 의해 면역글로블린 중쇄(VH) 단일 선도 서열과 연결되었다. 제 1 PCR 반응에서, 상기 IgG Fc cDNA는 한 쌍의 프라이머와 함께 증폭을 위한 주형으로 사용되었다: 5'프라이머, (SEQ. ID. No. 7)중쇄 및 부분 VH-선도 서열의 폴리뉴클레오티드 서열 785에서 815까지와 상응하는

**5'GCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCAAAACTCACACATGCCACCGTG
CCCAGCAC-3'**

, 및 3'-프라이머 F는 (SEQ. ID. No.6). 주형으로서 상기 제 1 PCR 의 생산물을 사용하는 제 2 PCR은 한 쌍의 프라이머와 함께 수행되었다: 5'-프라이머, (SEQ. ID. No.8) 추가적인 Sal I 부위를 가진 N-말단 폴리뉴클레오티드 서열의 VH-분비 신호 선도 서열

**5'-ACGCGTCGACATG
GGAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTC
CTGTCC-3'**

과 상응하는 , 및 3'-프라이머 F는 (SEQ. ID. No.6). 그런 후에, 단일 선도 서열을 가진 상기 Fc cDNA는 상기 레트로바이러스 벡터로 복제되었다. 상기 발현벡터 pcDNA3.1-MAGE-3는 상기 MAGE-3를 Xho I /Xba I-절단 pcDNA3.1 (Invitrogen)에 삽입함으로써 구성되었다. 고유 MAGE-3, 세포내 MAGE-3 및 분비성 s-MAGE-3 또는 분비성 Fc 분절을 발현하는 여러 대조 레트로바이러스 벡터가 또한 구성되었다(도 9A). 각 얻어진 벡터는 제한 효소 분석으로 동정하였고 DNA 서열로 확인하였다.

<235>

실시예 8

<236>

레트로바이러스의 생산 및 골수-유도된 DC의 형질도입

<237>

레트로바이러스 벡터는 일시적인 트랜스펙션으로써 생산되었다. 패키징 세포 (PA317)는 10% 열-비활성화된 FBS(Gibco-BRL)를 포함한 DMEM으로 100mm 배양접시에서 배양되고 리포펙틴(Lipofectin)(Gibco-BRL)에 의해 내

독소가 없는(endotoxin-free) QIAGEN 키트를 사용하여 제조한 10-15 μ g의 레트로바이러스 벡터 플라스미드(실시에 7로부터, 즉, 세포내 MAGE-3, 분비성 s-MAGE-3, 또는 분비성 Fc 분질)로 트랜스펙션되었다. 하룻밤 동안 배양 후, 상기 배지는 5% FBS를 포함한 DEME으로 대체하였다. 48시간 후, 재조합 레트로바이러스를 포함하는 상기 배지는 앞서 설명한 바와 같이(Chen et al., 1997) 채취되고 여과되었다(0.22 μ m). DCs를 발생시키기 위해서, 골수세포는 쥐의 다리뼈로부터 흘러나와, 나일론 메쉬를 통해, 염화 암모늄으로 적혈구를 고갈시켰다. RPMI-1640으로 많이 세척한 후에, 상기 세포는 37 $^{\circ}$ C에서 40-60분 동안 토끼 보체(complement) 및 RPMI-1640에 안티-CD4, 안티-CD8, 안티-CD45R/B220 및 안티-MHC-II(PharMingen and BioSource)로 이루어진 단클론 항체의 혼합물로 배양하였다. RPMI-1640으로 많이 세척한 후에, 6% FBS, 80ng mSCF/ml(R&D System), 20 유닛(U)mIL-6/ml(BioSource Intenational)이 보충된 RPMI-1640 내의 세포(5×10^5 cell/ml)는 12-웰 배양판 (2.5ml/웰)에 놓았고, 37 $^{\circ}$ C 및 5% 이산화탄소로 하룻밤 동안 배양하였고 다시 신선한 배지로 채웠다. 48시간 배양 후, 상기 세포를 원심분리하고, 1.5ml의 레트로바이러스 상층액에 재현탁하고, 10-20ng/ml 농도로 레트로벡틴(Retronection)(PanVera)으로 코팅된 24-웰 배양판에 놓았고, 37 $^{\circ}$ C 및 5% 이산화탄소로 3-4시간 동안 배양하였다. 그런 후에 상기 상층액은 5% FBS, 10ng 쥐의 줄기세포 인자 mSCF/ml, 60ng mGM-CSF/ml(BioSource Intenational) 및, 100 U mIL-4/ml(R&D System)로 보충된 1.5ml의 RPMI-1640으로 하룻밤 동안 교체하였다. 상기 형질도입 방법을 2-3번 반복하였고 이 방법에 의해 대개 BM 세포의 약 30%가 형질도입되었다. 최종 형질도입 후, 상기 세포는 추가 DC 분화(differentiation)를 허용하도록 수 일 동안 mGM-CSF 및 mIL-4를 포함한 Opti-MEM(Gibco-BRL)에 세척하고 배양하였다. DCs는 상기한 대로(Inaba et al., 1992), 50% FCS-RPMI-1640 침전법으로 더 농축되었다.

<238> 수 일 동안 배양한 후, 상기 세포의 상당한 부분이 뚜렷한 DC 형상을 보였다. 상기 형질도입된 DCs에서 상기 s-MAGE-3-Fc, s-MAGE-3, MAGE-3, 또는 Fc 유전자는 역전사 (RT)-PCR 분석에 의해 검증된 바와 같이, 전사되었다. 정량적인 웨스턴 블롯 분석(Western blotting analysis)이 형질도입된 DCs 내의 구성물에 의해 단백질 발현 및 분비를 검증하기 위해 사용되었다. 간략하게, 상기 형질도입된 DCs는 10분 동안 얼음 위에서 완충액(Boehringer Mannheim)(10mM Tris 150mM 염화나트륨(pH 7.4), 1% TX-100(sigma), 0.5mM PMSF 및 프로테아제 저해제 혼합물 정제)로 용해되었다. 그런 후에 세포 여액과 배지는 MAGE-3에 대한 토끼 다클론(polyclonal)항체로 침전된 후에, 단백질 A-Sepharose(Sigma)로 배양되었다. 그런 후에 상기 침전물을 20 μ l 로딩 완충액에 재현탁하였다. 상기 단백질 샘플(20 μ l)은 10% SDS-PAGE 젤 상에 놓았고, 4 $^{\circ}$ C에서 5% 무-지방 건조 우유(Carnation)와 0.1%(v/v) Tween-20(Fisher Science)를 포함하는 PBS(pH 7.5)에서 하룻밤 동안 배양함으로써 차단된 Hybond PVDF 막(Amersham Pharmacia Biotech)에 옮겼다. 완충액(0.1%(v/v)Tween-20를 포함한 PBS)으로 세척한 후, 상기 막은 1 시간 동안 실온에서 2.5% 탈지분유(Carnation)와 0.1%(v/v)Tween-20(1:400)를 포함한 PBS 완충액에 희석된 MAGE-3에 대한 쥐 단클론 항체로 배양하였다. 세척 후, 상기 막은 1 시간 동안 실온에서 상기 완충액 (1:10,000) 내의 서양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)로 식별화된 안티-마우스 IgG(Amersham Pharmacia Biotech)로 배양하였다. 최종 세척 후, 상기 막은 ECL-플러스 케미루미네센트(ECL-Plus chemiluminescent) 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)로 가시화되고 코닥필름 상에 노출하였다. 상기 필름 상에서 웨스턴 블롯의 단백질 밴드세기는 이미지 쿼نت(Image-Quant) 소프트웨어 1.2 버전으로 포스포이미저(PhosphorImager)(분자 동역학)로 결정하고 분석하였다. 상기 s-MAGE-3-Fc 및 s-MAGE-3 단백질은 DCs로부터 효과적으로 생산되고 분비되는 반면에, MAGE-3는 세포내에서 유지되었다(도 9B, 도 9C). s-MAGE-3-Fc와, s-MAGE-3와, MAGE-3 단백질의 비교할 만한 수치가 상기 형질도입된 DCs에서 발현되었다.

<239> 실시예 9

<240> DC 상의 Fc 상호작용

<241> DCs 상에서 Fc γ Rs와 Fc의 상호작용은 세포 활성화를 촉발하여, 항원 제공에 관여된 세포표면 분자의 상부-조절(up-regulation)을 일으킨다. 표면 마커가 형질도입된 DCs내 상기 s-MAGE-3-Fc의 발현이 DC활성화를 유도하는지를 평가하기 위해 조사되었다. s-MAGE-3-Fc와, s-MAGE-3와, 또는 벡터로 형질도입된 DCs의 표면 마커는 유동세포계수법(flow cytometric assay)에 의해 측정되었다. 간략히, 상기 DCs는 4 $^{\circ}$ C에서 30분동안 Fc γ Rs 차단을 위한 안티-CD16/CD32 항체(2.4G2, PharMingen)와 함께 사전 배양되었다. 그런 후에 상기 DCs는 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 최초 항체와 함께 배양된 다음, 안티-마우스 또는 -토끼 IgG-FITC 접합체와 함께 배양되었다. 그런 후에, 상기 DCs는 셀레스트(CellQuest) 소프트웨어로 FACScan(Becton Dickinson)에 의해 분석되었다. 도 9D, 도 9E, 및 도 9F에서 도시된 바와 같이, s-MAGE-3 또는 벡터 제어로 형질도입된 DCs상에서보다 높은 수치의 MHC 종-II, CD40, CD86가 s-MAGE-3-Fc로 형질도입된 BM세포로부터 유도된 DCs 및 LPS의 존재하에서 DCs 상에 발현되었다. 이 결과는 상기 융합 단백질 Fc의 분비 및 Fc γ Rs와의 연속적인 상호작용이 DCs를 활성화시킨다는 것을 나타낸

다.

<242> 실시예 10

<243> 인비보 강력한 Th1의 유도

<244> MAGE-3의 분비 및 연속적인 내재화가 인비보로 이 항원의 면역원성 (immunogenicity)을 강화시킬수 있는 지를 평가하기 위해, DCs는 레트로바이러스 벡터에 의해 s-MAGE-3-Fc, s-MAGE-3, MAGE-3, 또는 Fc로 형질도입되고, 그런 후에 C57BL/6 쥐(쥐 당 50,000 U IL2(chiron)를 포함하는 30 μ l PBS내 0.5-1 $\times 10^5$ DC)에 정맥주사를 1회 투여하였다. 면역요법 4 내지 6주 후에, 상기 쥐는 희생되었고, 말초혈액과, 비장과 다른 조직 샘플은 응축되었다. 림프노드는 병원균 감염을 연상시키는 s-MAGE-3-Fc-DCs로 면역된 쥐에서 주로 확대되었으며, s-MAGE-3, MAGE-3, 또는 Fc로 형질도입된 DCs로 투여된 쥐에서는 확대되지 않았다.

<245> 형질도입된 DCs에 의한 면역요법이 CD4+ 보조 T세포 반응을 유도할 수 있는지를 평가하기 위해서, 면역된 쥐의 비장세포(splenocyte)로부터 CD4+ 보조 T세포를 분리하였고 상기 CD4+ 보조 T세포를 s-MAGE-3-Fc로 형질도입된 골수(BM)-유도 DCs와 공동-배양하였다. 간략히, CD4+ 또는 CD8+ T세포는 CD4+ 또는 CD8+ T세포 농축 컬럼으로 비장 현탁액으로부터 분리하였고, 또한 추가 분석 전 24시간에서 48시간동안 10% FBS로 보충한 RPMI-1640에서 배양하였다. 면역된 쥐로부터 건조 림프노드는 37 $^{\circ}$ C에서 40-60분 동안 0.1% DNase I (fracion IX, Sigma) 및 1 mg/ml 교원질효소(collagenase)의 혼합물로 분해하였다.

<246> DCs는 추가 연구를 위해 안티-CD11c(N418) 마이크로-비즈(Micro-Beads(Miltenyi Biotec, Inc.))와 함께 림프노드 또는 비장의 세포 현탁액으로부터 확실히 분리하였다. CD4+ T세포 대 DCs의 비를 달리하여 2주의 공동-배양하는 동안, s-MAGE-3-DCs, MAGE-3-DCs, 또는 Fc-DCs로 면역된 쥐의 CD4+ T세포는 활발히 증식되지 않았으며, 단지 낮은 수치의 IL-2와, IFN- γ 와, TNF- α 와, IL-4가 동-배지에서 검출되었다(도 10A, 도 10B, 도 10C, 및 도 10D). 면역된 쥐의 CD4+ T세포는 오랜 시간 동안 1000:1(T세포:DC, 2 $\times 10^5$:2 $\times 10^2$)의 비로 DCs와 공동-배양되었다.

<247> 상기 공동-배양액의 상층액을 제조회사(PharMingen)의 지침에 따라 ELISA (PharMingen)에 의해 채취하고 바로 시토카인(cytokine) 농도를 분석하였다. 반대로, s-MAGE-3-Fc-DCs와 함께 면역된 쥐로부터 CD4+ T세포의 공동-배양에서, 높은 수치의 IL-2와, IFN- γ 는 1:1000(DC:T세포)으로 48시간만 공동-배양후 공동-배지에서 검출되었다. 안티-CD8+이 아닌 안티-CD4+가 상기 공동-배양된 세포(도 11A)에 의해 상기 시토카인 생산을 차단하였다. 반복된 실험은 유사한 결과를 보였다. 상기 T-세포 반응의 특이성을 더 판단하기 위해서, 무관제한 B형 간염 코어 항원(HBcAb)을 발현하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입된 BM-유도 DCs를 s-MAGE-3-Fc-DCs-면역 쥐의 CD4+ T세포와 공동-배양하였다. 단지 낮은 수치의 IFN- γ 및 다른 시토카인이 공동-배지에서 검출되었다(도 11B). 더욱이, 예방접종 6주 후에 쥐의 상기 림프노드로부터의 DCs는 안티-CD11c 마이크로비즈(Miltenyi Biotec, Inc.)로 분리하였고 동일한 면역 쥐로부터 CD4+ T세포와 공동-배양하였다. 도 12A, 도 12B, 도 12C, 및 도 12D에서 도시된 바와 같이, 높은 수치의 IL-2, IFN- γ 및 TNF- α 가 s-MAGE-3-Fc-DCs-면역 쥐로부터 상기 세포의 공동-배양액에서만 검출되었다. 이 결과는 s-MAGE-3-Fc로 형질도입된 상기 DCs는 림프 기관 또는 조직에 접근할 수 있고, 고유의 MAGE-3 또는 s-MAGE-3로 형질도입된 DCs가 활성화시키는 것보다 더 효율적으로 Th1 반응을 활성화시킴을 나타낸다.

<248> 실시예 11

<249> 인비보 CTL의 유도

<250> JAM 또는 "단지 또 다른 방법" 테스트는 s-MAGE-3-Fc-DCs에 의한 면역요법이 강한 CTL 반응을 유도할 수 있는 지를 판단하기 위해서 수행되었다. 상기 JAM 테스트는 세포독성 활성을 측정하기 위해 사용되었다. 간략히, 쥐는 면역화한후 다른 시간에서 희생되었으며 비장세포의 단세포 현탁액이 10% FBS RPMI1640에서 배양되었다. 총 4 $\times 10^6$ 비장세포는 37 $^{\circ}$ C 5% 이산화탄소에서 4-6일 동안 24웰 플레이트(Costar)에 γ -방사선(10,000 rad)으로 조사된 공동유전자(syngeneic)의 EL4-MAGE-3 세포 또는 EL4-HBcAg cell/2ml과 함께 재자극받았고 풀되고 (pooled) 1 $\times 10^7$ 셀/ml에 재현탁되었다. 상기 표적 세포를 식별화하기 위해, ^{3} H-티미딘(thymidine)은 최종농도 2 μ Ci/ml로 5 $\times 10^5$ /ml EL4-MAGE-3 또는 EL4-HBcAg 세포에 첨가되었다. 6시간 배양후, 상기 세포를 PBS로 1회 부드럽게 세척하고 배양기(1 $\times 10^5$ cell/ml)에서 다시 재현탁되었다. 그런 후에 다른 수의 작용세포를 37 $^{\circ}$ C에서 4

시간 동안 바닥이 둥근 96웰 플레이트($200\mu\text{l}/\text{well}$)에 일정 수의 표적세포($1 \times 10^4 \text{ cell}$)로 공배양하였고 그 후 상기 세포와 상기 세포의 배지는 물로 넓게 세척된 섬유유리필터(Filter Mate Harvester, Packard)에 흡입하였다. 상기 필터를 건조하고 96웰 플레이트상에 놓은 후, $25\mu\text{l}$ 마이크로신티트(MicroScint 20(Packard))를 각 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트는 TopCount NXT Microplate Scintillation and Luminescence Counter(Packard)에서 계산되었다. 일부 실험에서, 상기 재자극받은 작용 세포 집단은 세포과괴(cytotoxicity) 분석전에 CD4+ 또는 CD8+ T-세포를 고갈시키기 위해 30-60분 동안 안티-CD4 또는 안티-CD8 항체($30\mu\text{l}/\text{well}$, Pharmingen)와 배양되었다. 특이적인 살균율은 다음과 같이 정의된다: (T-세포 없이 보유된 표적세포 DNA(자발적인)-T-세포가 보유된 표적세포 DNA)/보유된 자발적인 DNA $\times 100$. 총 ^3H -티미딘 인코퍼레이션(thymidine incorporation)의 값은 종종 상기 자발적인 보유와 유사하다. 특이적 살균을 측정하기 위해 면역 쥐로부터의 비장세포는 시험관 속의 공통유전자 세포 EL4-MEGE-3를 갖는 RPMI1640, 10% FBS에서 재자극되고, 다양한 작용인자/표적 비로 EL4-MEGE-3 세포 식별화된 ^3H -티미딘과 공동-배양되었다. EL4-MEGE-3 세포는 상기 MEGE-3 발현 벡터(pcDNA3.1-MAGE-3)에 의한 트랜스펙션과 Zecoin(Invirogen) 선택으로 만들어지고 PCR과 면역침강 분석에 의해 MAGE-3를 발현하였다.

<251> s-MAGE-3-Fc-DCs로 면역된 쥐로부터 비장세포는 s-MAGE-3, MAGE-3, 또는 Fc(도 13)로 면역된 쥐로부터의 표적 세포보다 훨씬 더 효과적으로 표적세포를 제거하였다. 상기 살균의 특징성은 무관계한 HBcAg(도 13)을 발현하는 EL4-HBcAg 세포를 제거하는 s-MAGE-3-Fc-DCs-면역 쥐의 비장세포의 무능력과 상기 안티-CD4 항체가 아닌 상기 안티-CD8 항체에 의한 살균의 억제에 의해 더 검증되었다. 그러므로, 이 결과는 강화된 상기 T_H1 과 수용체-매개 항원 내재화의 크로스-프라이밍(cross-priming)때문에 CTL 반응을 유도하는 s-MAGE-3-Fc-DCs의 뛰어난 능력을 검증한 것이다.

<252> 실시예 12

<253> 항체의 유도

<254> 항체는 또한 항암 면역(antitumor immunity)에 중요한 역할을 하기 때문에, 면역 쥐(실시예 10과 유사한)의 혈청에서 안티-MAGE-3 항체 역가는 ELISA에 의해 검출되었다. 간략히, 재조합 MAGE-3 단백질(50ng 각/웰)로 코팅된 마이크로티터 판(Dynatech)은 실온에서 2시간 동안 차단 완충액(KPL, Gaithersburg, MD)내 순차적으로 희석된 혈청과 배양되었다. 결합 항체는 상기 차단 완충액에서 희석된 쥐 IgG(Sigma)에 대한 과산화효소-결합 항체로 배양된 후 검출되었다. MAGE-3에 대한 단클론 항체는 양성 대조군으로 사용되고 정상 쥐의 혈청은 음성 대조군으로 사용되었다. 상기 항체 역가는 0.2보다 더 큰 OD_{450} 과 함께 가장 높은 희석으로 정의되었다. 상기 정상 쥐 혈청의 배경 OD_{450} 는 0.1보다 낮았다. 안티-MAGE-3 항체는 DC 면역요법 2주 후에 유도되고 4-6주 후에 최고에 도달했다.

<255> 도 14에 도시된 바와 같이, 안티-MAGE-3 항체의 상당히 높은 역가는 s-MAGE-3-DCs 또는 MAGE-3-DCs 면역 쥐에서 보다 s-MAGE-3-Fc-DC 면역 쥐의 혈청에서 검출되었다. 상기 항체반응의 특이성은 면역 쥐에서 무관계한 HBcAg에 대한 항체의 소실 때문인 것으로 검증되었다. 취합하면, 상기 발견은 s-MAGE-3-Fc-DCs는 CD4+ T_H , CD8+CTL 뿐만 아니라 B-세포반응 유도에서 MAGE-3-DCs, 또는 s-MAGE-3-DCs보다 우수함을 나타낸다.

<256> 실시예 13

<257> 보조 T-세포의 증가된 상호작용

<258> DCs상의 MHC-II와 관련하여 CD4+ T_H 세포의 특정 펩티드를 인식하는 초회피항원자극 CD4+ T_H 세포는 제한된 DCs와의 상호작용을 크게 증가시킨다. CD40-CD40L을 경유한 이 상호작용은 IL-12의 DC 생산을 촉진시킬 수 있고 CTL 반응에 대한 보조 T-세포를 발생시키기 위해 중요하다. 이 방법이 s-MAGE-3-DCs와의 CD4+ T_H 상호작용을 강화시킬 수 있는지를 테스트하기 위해서, 초회피항원자극 CD4+T 세포와 공동-배양으로 형질도입된 DCs에 의한 IL-12의 생산이 측정되었다. 초회피항원자극 CD4+T 세포는 s-MAGE-3-Fc-DCs로 면역된 쥐로부터 분리되고 s-MAGE-3-Fc, s-MAGE-3, MAGE-3, 또는 Fc로 형질도입된 BM-유도 DCs로 공동-배양되었다. 도 15에서 도시된 바와 같이, IL-12의 생산에서의 상당한 증가는 s-MAGE-3-DCs 또는 MAGE-3-DCs를 가진 CD4+T-세포 공동-배양에서가 아니라, s-MAGE-3-Fc-DCs를 가진 상기 CD4+T-세포 공동-배양에서 관찰되었다. s-MAGE-3-Fc-DCs에 의한 상기 IL-12의 생산은 상기 초회피항원자극 CD4+T-세포 상에서 CD40L로 차단함으로써 억제되었다. DCs에서 Fc의 발현은 또한 덜한 정도로 IL-12 생산을 비특이적으로 증가시켰다. 실시예 10, 11, 12 데이터의 인비보 결과와 함께 이 결과는 MAGE-3의 분비와 연이은 Fc γ Rs-매개 내부재화가 T_H1 및 CTL 반응의 유도에 대한 DCs상 MAGE-3의 교차-제공을

유도하는 것을 나타낸다.

<259> 실시예 14

<260> s-MAGE-3-Fc-DCs에 의해 유도된 방어면역

<261> 상기 증가된 안티-MAGE-3 면역반응이 유효한 항종양 면역을 유도할 수 있는지를 평가하기 위해서, 면역성 검사(challenge) 실험이 행해졌다. 상기 EL4-MAGE-3 세포 라인은 공통유전자의 쥐에서 급격히 증가하는 부모의 종양 EL-4로부터 유도되었고 면역성 검사 실험을 위해 사용되었다. 공통유전자 C57BL/6 쥐 내피에 이식될 때, EL4-MAGE-3 세포($0.5-1 \times 10^5$ cell)는 접종후 대개 한달 내 쥐가 사망하게 되는 부모의 종양 EL-4세포의 공격적인 종양과 유사한 공격적인 종양 성장을 보였고, 접종 후 3-5일만에 쥐에서 눈에 보이는 종양이 생산되었다. s-MAGE-3-Fc-DCs가 EL4-MAGE-3 종양성장을 억제할 수 있는 지를 검증하기 위해서, 쥐는 s-MAGE-3-Fc, s-MAGE-3, MAGE-3, 또는 Fc로 1×10^5 형질도입된 DCs로 2회(7일 간격) 정맥주사로 면역하고, EL4-MAGE-3 세포(1×10^5)로 면역성 검사 실험을 하였다. CB57BL/6 쥐는 0일과 7일에 1×10^5 형질도입된 DCs로 정맥주사에 의해 면역하고, 제 2 면역화 1주 후에 지수함수적으로 성장한 1×10^6 EL4-MAGE-3 또는 EL4-HBcAg 세포로 내피에 면역성 검사 실험을 하였다. 종양의 크기는 다음과 같이 계산된 종양의 부피로 매 2-3일마다 측정하였다:(가장 긴 직경) × (가장 짧은 직경)².

<262> 도 16A에서 도시된 바와 같이, 비록 s-MAGE-3-Dcs, MAGE-3-Dcs, 또는 Fc-Dcs(비-특정적인 면역 자극제)에 의한 면역요법이 어느 정도 방어를 하고 있지만, 종양의 성장은 s-MAGE-3-Fc-DCs로 면역된 쥐에서 훨씬 더 큰 정도로 억제되었다. 이 구성물에 의해 보여진 상기 항암 활동의 가능성은 면역반응을 유도하기 위한 이들의 능력과 관계있다. 일관되게, 상기 s-MAGE-3-Fc-DCs로 면역된 쥐는 다른 벡터-형질도입된 DCs(도 16B)로 면역된 쥐보다 상당히 오래 생존하였다. s-MAGE-3-Fc-DCs로 면역되고 와일드 타입 EL4 또는 EL4-HBcAg 세포로 면역성 검사를 받은 쥐는 또한 치명적인 종양을 성장시켜 한달 내 죽게 되므로, 상기 s-MAGE-3-Fc-DCs에 의해 유도된 상기 항암 활동은 특이적이다. 비록 상기 면역 시스템이 이 모델에서 효과적으로 급속한 치명적인 종양의 성장을 제어하기에 충분한 반응시간을 가질 수 없었지만, s-MAGE-3-Fc-DCs는 쥐에서 발생된 EL4-MAGE-3 종양의 성장을 부분적으로 억제하였다.

<263> 실시예 15

<264> 포유류 발현 벡터내 HBe 항원의 구성

<265> 전장 HBV(*adw* 서브타입) 게놈을 암호화하는 플라스미드는 미국표준균주(American Type Culture Collection(ATCC))로부터 얻었다. 상기 HBV 프리코어(precore)/코어 유전자는 79 코돈에서 프레임쉬프트를 일으켜서 84 및 85에서 두 개의 연속적인 정지코돈을 초래하는 한 쌍의 염기쌍 소실을 포함하는 것을 발견하였다. 이 유전자는 PCR 돌연변이유발을 이용하여 상기 소실된 염기를 삽입하여 복구되었고 DNA 서열화에 의해 확인되었다. 상기 전장 HBV 유전자는 한 쌍의 프라이머를 갖는 복구된 HBV 게놈의 PCR증폭에 의해 생성되었다(5'-프라이머(P-A):(SEQ. ID. No. 9) 추가적인 HindIII 제한 부위를 가진 상기 HBV 게놈의 폴리뉴클레오티드 서열 1904에서 2020까지와 상응하는 5'-TTAAGCTTATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATC-3', 및 3'-프라이머(P-B):(SEQ. ID. No. 10) 추가적인 Xba I 및 Cla I 부위를 가진 상기 HBV 게놈의 폴리뉴클레오티드 서열 2437에서 2457까지와 상응하는 5'-TTTCTAGAATCGATTAAACATTGAGATTCCCGAGA-3'. 바이러스 감염동안 쪼개어진 아르기닌이 많은 C'-말단 염기서열의 HBeAg(aa 150-185) 소실로 상기 잘린 HBeAg 유전자는 한 쌍의 프라이머와 함께 PCR 증폭에 의해 생성되었다(5'-프라이머(P-A):(SEQ. ID. No. 9)와 3'-프라이머(P-B):(SEQ. ID. No. 11) 추가적인 Not I 제한 부위를 가진 상기 HBV 게놈의 폴리뉴클레오티드 서열 2324에서 2350까지와 상응하는 5'-GTGCGGCCGC TCTAACAACAGTAGTTCCGGAAGTGT-3'. 상기 전장 HBeAg 유전자는 한 쌍의 프라이머와 함께 PCR 증폭에 의해 생성되었다(5'-프라이머(P-A):(SEQ. ID. No. 12) 추가적인 HindIII 제한 부위를 가진 상기 HBV 게놈의 폴리뉴클레오티드 서열 1901에서 1932까지와 상응하는 5'-TTAAGCTTATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGC-3', 및 상기 3'-프라이머(P-B):(SEQ. ID. No. 10). 인간 IgG cDNA Fc 분절은 주형으로서 인간 IgG 중쇄 cDNA를 포함하는 플라스미드 pEE6/CLL-1로 PCR 증폭에 의해 생성되었다. 상기 PCR 반응을 위한 상기 한 쌍의 프라이머는: 5'-프라이머(SEQ. ID.No.13) 추가적인 Not I 부위를 가진 상기 중쇄의 폴리뉴클레오티드 서열 785에서 802까지와 상응하는

5'-ATAAGCGGCCGCTAAAACTCACACATGCCCA-3' 및 3'-프라이머 (SEQ. ID. No. 14) 추가적인 Cla I 부위를 가진 상기 중쇄의 폴리뉴클레오타이드 서열 1447에서 1468까지와 상응하는

5'-TATTCTAGATCGATCACTCATTACCCGGAGACAGG-3' . pRc/CMV 벡터(Invitrogen)가 이 연구를 위해 사용되었다. 상기 IgG Fc에 대해 프레임 내 융합된 잘린 HBeAg로 구성된 상기 분비 HBe-Fc 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터 HBe-Fc는 잘린 HBeAg, IgG Fc, 및 HindIII/Cla I-잘린 pRc/CMV 벡터의 세 조각을 연결하여 구성되었다. 분비성 HBeAg 단백질을 발현하는 상기 발현벡터 HBeAg는 상기 HBeAg 유전자를 HindIII/Cla I 잘린-pRc/CMV 벡터에 삽입함으로써 구성되었다. 세포기질 HBcAg 단백질을 발현하는 상기 발현벡터 HBcAg는 상기 HBcAg 유전자를 HindIII/Cla I 잘린- pRc/CMV 벡터에 삽입함으로써 구성되었다. 상기 IgG Fc 발현 벡터를 구성하기 위해서, 상기 인간 IgG Fc cDNA 분절은 2번의 PCR 반응에 의해 쥐 VH 신호 선도 서열과 연결되었다. 제 1 PCR 반응에서, 상기 IgG Fc cDNA는 한 쌍의 프라이머와 함께 증폭을 위한 주형으로서 사용되었다(5'프라이머 (SEQ. ID. No. 15) 785 내지 815의 중쇄의 폴리뉴클레오타이드 서열과 부분 VH-선도 서열과 상응하는

5'-GCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCAAACTCACACA TGCCACCGTGCCAGCAC-3' , 및 3'-프라이머 P-C (SEQ.ID.No.14)). 제 1 PCR의 생산물을 주형으로 사용하는 제 2 PCR은 한쌍의 프라이머로 실행되었다(5'프라이머, (SEQ. ID. No. 16) 추가적인 HindIII 및 Nde I 부위를 가진 상기 VH 선도 서열의 N-말단 폴리뉴클레오타이드 서열과 상응하는

5'-TTAAGCTTCATATGGGAACATCTGTGGTTCTTCTCTCTCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCC-3' , 및 상기 3'-프라이머(P-C)는 (SEQ.ID.No.14). 상기 선도 서열을 가진 상기 Fc cDNA는 상기 HindIII/Cla I 잘린-pRc/CMV 벡터에 복제되었다. 이렇게 얻은 벡터를 제한효소 분석에 의해 동정하고 DNA 서열화에 의해 확인하였다. 플라스미드는 대장균 균주(XL-1 blue)로 형질전환되고 50µg/ml 암피실린(ampicillin)의 존재하에서 37°C에서 16-20시간 동안 단일 콜로니로부터 배양되었다. DNA는 표준 프로토콜을 따라 내독소가 없는 정화키트(Qiagen)를 이용하여 분리하였다. DNA는 최종농도 1mg/ml로 내독소가 없는 PBS(Sigma)에 재현탁되었다. OD260/280의 비는 1.8에서 2.0까지 범위였다. DNA를 -200°C에서 저장하였고 면역요법 전달에 제한 분해에 의해 분석되었다.

<266> DCs는 효율적인 MHC-II에 대한 특권항원 내부이행 경로 뿐만 아니라 I-제한 항원 제공을 매개하는 IgG Fc 수용체(Fc γ Rs)를 발현하기 때문에, 인간 IgG1a로부터 유도된 상기 Fc 분절은 HBV 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 모델의 내재화를 강화시키기 위한 세포결합 요소로서 사용되었다. 비록 HBcAg 및 HBeAg 둘 다는 상기 HBV pre-C/C 유전자에 의해 암호화되었지만, 상기 분비성 HBeAg 단백질은 HBcAg에 대한 개시코돈의 개시코돈 29 잔기 상부에서 개시된다. 상기 HBeAg는 인간 IgG1a Fc 분절 cDNA 유전자와 프레임에서 융합되고, pRc/CMV에 복제되었다. 상기 인간 IgG1a Fc 분절은 쥐 APCs 상의 Fc 수용체에 효과적으로 결합시킬 수 있다. 상기 HBeAg 유전자(분비성), 분비신호 선도 서열을 가진 Fc 분절 유전자(분비성), HBcAg 유전자(세포기질)를 포함하는 대조군 벡터가 구성되었다(도 18). 쥐의 골수-유도 DCs가 생성되었다. 간략히, 골수 줄기세포는 4일 동안 6%의 FBS, 60ng mGM-CSF/ml, 100 U mL-4/ml로 보충된 RPMI-1640에서 배양되었다. 그런 후에 DCs는 재조합 HBeAg(100 µg/ml) 및 HBcAg(100 µg/ml) 단백질(American Research Products, Boston, MA)의 혼합을 포함하는 배지에서 추가로 4일 동안 배양되었다. 펄스-DCs(PDCs)는 5분간 1000rpm으로 1 × PBS로 2회 세척하고 또한 분석을 위해 RPMI1640에 재현탁되었다. 방사능 라벨링 및 면역침전/SDS-폴리아크릴아미드 겔 분석(PAGE)을 이용함으로써, 상기 HBeAg-Fc 단백질(HBe-Fc)은 트렉스펙션된 세포로부터 효과적으로 생산되고 분리되는 것을 알았다(도 19). 세포내 및 분비 HBe-Fc 둘 다는 융합단백질이 단백질 A에 대한 결합 능력을 보유하고 있음을 나타내는 단백질 A 비드에 의해 직접적으로 침전되었다.

<267> 실시예 16

<268> 인비보 HBe-Fc DNA 백신에 의한 T1, 보조 T-세포의 유도

<269> 쥐는 이 전략을 평가하기 위해서 인비보에서 면역되었다. C57BL/6 또는 BALB/c 쥐는 4그룹으로 나누고 각 쥐는 100µg(사두근(quadricep)당 25-50µg(µl))의 HBcAg, HBeAg, Fc 또는 HBeAg-Fc DNA의 1회 근육 주사로 면역되었다. 면역요법 2-4주 후, 상기 쥐는 희생되고, 말초혈액과, 비장과, 다른 조직샘플은 응축되었다.

<270> 첫째, DNA 백신 면역요법 2-4주 후 상기 쥐로부터의 비장세포는 5일간 상기 재조합 HBe/cAg 단백질로 재자극하였다. T-세포를 재자극된 비장세포로부터 분리하고 나서, ³H-티미딘 인코퍼레이션 분석을 이용하여 평가하였다. 도 20에서 도시된 바와 같이, HBe-Fc DNA 구성물로 면역된 쥐의 T-세포 또는 HBe-Fc DNA 백신으로 초회피항원자극 T-세포는 활발히 증식되었다. 반대로, HBcAg, HBeAg, 또는 Fc DNA 백신으로 면역된 쥐의 T-세포 또는 HBcAg,

HBeAg 및 Fc DNA 백신으로 초회피항원자극 T-세포는 활발히 증식되지 않았다.

<271> 상기 면역된 쥐의 CD4⁺ T-세포는 실시예 5에서와 유사하게, 재조합 HBcAg, HBeAg로 펄스된 DCs로 공배양되었다. T-세포 대 DCs의 비를 달리하여 6일간의 공동-배양 동안, HBcAg와, HBeAg 또는 Fc 구성물로 면역된 쥐의 CD4⁺ T-세포는 활발히 증식되지 않았고, 단지 낮은 수치의 IL-2와, IFN- γ 만이 공동-배지에서 검출되었다(도 21A, 도 21B). 반대로, HBe-Fc 구성물로 면역된 쥐의 CD4⁺ T-세포를 사용한 공동-배양에서, CD4⁺ T-세포는 공동-배양 후 48시간만에 심지어 1:1000(DC:T-세포) 비로 활발히 증식되었다. 더욱이, 상기 공동-배지에서 IL-2 및 IFN- γ 의 수치는 HBeAg, 또는 HBcAg 구성물이 투여된 쥐의 CD4⁺ T-세포의 공동-배양에서의 수치보다 상당히 높았다(도 21A, 도 21B). 안티-CD8 항체가 아니라 안티-CD4 항체는 공동-배양 세포에 의해 이들 시토카인의 생산을 현저하게 차단시켰다(도 21C, 도 21D). 게다가, 무관한 항원인 상기 재조합 HBsAg 단백질(American Research Product, Boston, MA)이 HBe/cAg과 나란히 DCs를 펄스하는데 사용되었다. 상기 HBsAg-펄스 DCs는 HBe-Fc 구성물 면역화에 의해 유발된 CD4⁺ T-세포의 특이성을 검증하는 상기 설명된 분석에서 HBe-Fc 구성물 면역된 쥐의 상기 CD4⁺ T-세포를 자극할 수 없었다. 이 결과는 상기 HBe-Fc 구성물은 상기 HBeAg 또는 HBcAg 구성물보다 더 효율적으로 T_H1을 활성화시킬 수 있음을 나타낸다. IL-4의 상당한 수치는 어떠한 실험에서도 검출되지 않았다. 왜냐하면 IL-2 및 IFN- γ 는 주로 T_H1 세포에 의해 생산되기 때문이다. 이 결과는 HBe-Fc 구성물이 T_H1 반응을 유도함을 나타낸다.

<272> **실시예 17**

<273> **인비보 CTL의 유도**

<274> HBe-Fc 구성물에 의한 면역화가 CTL 반응을 유발할 수 있는지를 판단하기 위해서, JAM 테스트가 실시예 11와 유사하게 실행되었다. 다른 면역 쥐의 비장세포는 합성 펩티드 HBcAg 13-27을 포함하는 배지에서 4-6일 동안 인비트로 재자극하고 표적 세포 살해를 측정하기 위해 변환된 작용인자/표적 비로 식별화된-3H, 펩티드(HBcAg 13-27)-펄스 표적세포 EL-4(H-2^b)와 p815(H-2^d)로 공동-배양하였다. 도 22에서 도시된 바와 같이, HBe-Fc 구성물로 면역된 쥐의 비장세포는 HBeAg 또는 HBcAg로 면역된 쥐의 표적 세포 살해보다 상당히 높은 표적 세포 살해를 나타내었다. 상기 살해의 특이성은 H-2^d 배경을 갖는 HBcAg-자극 p815 표적 세포를 살해하는 상기 비장세포의 불능 및 안티-CD4 항체가 아닌 안티-CD8 항체에 의한 살해의 억제에 의해 검증되었다. 더욱이, HBsAg는 HBe-Fc 구성물 면역 쥐의 비장세포를 재자극하기 위해 사용되었으며, HBcAg-자극 타겟에 대한 상당한 살해도 상기 HBsAg-재자극 비장세포에 의해 관찰되지 않았다. HBe-Fc 구성물에 의해 유발된 뛰어난 세포파괴 반응은 DCs에 의한 내재화된 HBe-Fc의 증가된 T-보조 1과 직접적인 MHC 중-I 에 기인한다.

<275> **실시예 18**

<276> **항체의 유도**

<277> HBe-Fc-DC 면역화가 항체 반응을 유발할 수 있는지를 판단하기 위해서, 안티-HBe/cAg 항체 역가는 실시예 6과 유사하게, 다른 백신으로 면역된 쥐의 풀된 혈청에서 측정하였다. 도 23에서 도시된 바와 같이, 안티-HBe/cAg 항체는 HBe-Fc 구성물로 면역화된 쥐의 혈청에서 검출되었다. 상기 항체반응의 특이성은 면역된 쥐에서 HBsAg에 대한 항체의 결핍에 의해 검증되었다. 반대로, 상당히 더 낮은 항체 역가는 HBeAg 또는 HBcAg 구성물(도 23)로 면역된 쥐에서 검출되었다. 취합하면, HBe-Fc DNA는 CD4⁺ T-보조 1과 CD8⁺ 세포독성 T-세포 뿐만 아니라 B-세포 반응을 유도시키는데 있어 고유의 HBeAg 또는 HBcAg를 발현하는 DNA보다 상당히 우수하다.

<278> **실시예 19**

<279> **HBe-Fc DNA 백신에 의한 DCs의 전신 활성화**

<280> 상기 형질도입된 세포로부터 분리되고 항원 제공을 수행하기 위해 몸체를 통하여 순환하는 상기 HBe-Fc 또는 HBeAg 단백질의 가능성을 평가하기 위해서, DC 전이 실험이 수행되었다. DCs는 상기 전이된 DCs가 고유의 CD4⁺와 CD8⁺T-세포를 준비시킬 수 있는지를 평가하기 위해서 면역된 쥐로부터 분리되고 순수 쥐에 전이되었다. 상기 HBeAg-Fc, PEA-HBe, 또는 대조 DNA 백신으로 면역된 쥐는 한 달 후에 희생되었다. 쥐 CD11c(N418) 마이크로비즈(MicroBeads)(Miltenyi Biotec)는 쥐 비장으로부터 DCs를 분리하는데 사용하였다. CD11c+DCs는 순수 쥐(약 $1-5 \times 10^5$ /쥐)에 주입(IP 또는 IV)되었다. 상기 DC 전이 2 내지 4주 후, 상기 쥐는 희생되었고 다른 쥐의 항원-특이적 CD4⁺와 CD8⁺ T-세포 반응이 관찰되었다. 도 24에서 도시된 바와 같이, HBe-Fc 면역된 쥐의 비장세포의 DCs는 효과적으로 순수 T-세포 반응을 활성화시킨 반면에, HBe 또는 HBc 면역된 쥐의 비장세포의 DCs는 순수 쥐

에서 T-세포를 활성화시키지 못했다. 상기 PCR과 내재화 분석의 결과를 취합한 이 결과는 DC 항원 제공이 Fc γ R-중개 항원 세포내섭취(endocytosis)에 의해 증가됨을 나타낸다.

<281> 실시예 20

<282> 변경된 막의 분비 및 세포내 단백질

<283> 단백질 막 전위(translocation) 및 분비를 방지하는 서열을 포함하거나 분비에 대한 신호 서열을 없애기 위한 서열을 포함하는 막 단백질과 세포내 단백질은 추가의 변이 없이 본 발명의 전략을 위해 사용될 수 있다. 단백질 분비를 차단하는 상기 서열의 결실 또는 변이가 단백질 분비를 초래한다고 생각된다. 막 단백질은 종종 높은 비율의 소수성 아미노산의 포함하므로, 이 단백질의 소수성을 변경시킴으로써 막 단백질은 분비에 대해 표적화 되게 한다. 또한 당업자는 상기 레트로젠 전략이 막 단백질의 면역원성을 증가시키는데 사용될 수 있음을 알고 있다. 막 단백질의 결실과 변이에 대한 두 예는 HPV E7와 EBV 단백질이다.

<284> E7은 세포기질 단백질이다. 한 줄의 하전된 잔기의 존재는 단백질의 분비를 방해한다. 이 잔기를 제거함으로써 상기 단백질의 분비를 용이하게 하고 상기 단백질(도 17)을 안정화시킨다. 따라서, HPV 16 E7 단백질의 상기 한 줄의 하전된 잔기는 2번의 PCR 반응에 의해 현재의 구성물에서 제거되었다(굵은선 박스). 그 결과, 선도 신호(IL-2)로 연결한 후 상기 잘린 E7 단백질의 분비는 현저하게 증가되었다. EBV 핵 항원 1은 단백질 막 전위 및 분비를 방해할 수 있는 한 줄기의 소수성 아미노산 잔기를 포함하는 핵 단백질이다. 연구에서, EBNA1 단백질에서 한 줄의 소수성 아미노산 잔기는 결실되었다. 그 결과, 상기 잘린 EBNA1 단백질은 선도 신호 서열과 연결 후 세포로부터 효과적으로 분비되었다.

<285> 상기 서열의 결실 또는 절단 이외에, 당업자는 상기 서열이 상기 단백질의 소수성을 감소시키도록 변이될 수 있음을 알고 있다. 특정위치돌연변이(Site-directed mutagenesis)는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 서열 변화를 선택된 DNA에 유도함으로써 서열 변형체의 제조와 검사를 제공한다.

<286> 일반적으로, 처음에 단일-가닥 벡터를 얻거나 또는 원하는 단백질 또는 유전요소를 암호화하는 DNA 서열의 내부에 포함된 이중-가닥 벡터의 두 가닥을 융해시킨다. 그런 후에 상기 필요한 변이된 서열을 가진 합성적으로 제조된 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 혼성화 조건 선택시 불일치 정도를 고려하여 단일-가닥 DNA 체제로 어닐링된다. 상기 혼성화 생성물은 돌연변이를 가진 가닥(mutation-bearing strand)의 합성을 완성시키기 위해 대장균 중합효소 I (Klenow 분절)과 같은 DNA 중합효소로 처리한다. 그러므로, 헤테로듀플렉스(heteroduplex)가 형성되고, 한 가닥은 원래의 변이되지 않은 서열을 암호화하고, 다른 가닥은 상기 필요한 변이를 가진다. 그런 후에 이 헤테로듀플렉스 벡터는 대장균 세포와 같은 적절한 숙주세포를 형질전환시키는데 사용되고 상기 변이된 서열 배치를 가진 재조합 벡터를 포함하는 클론들이 선택된다.

<287> 특정위치돌연변이는 미국특허 제5,220,007호; 제5,284,760호; 제5,354,670호; 제5,366,878호; 제5,389,514호; 및 제5,789,166호에 개시되어 있다.

<288> 막 단백질 뿐만 아니라, 세포내 단백질도 변이되어 분비된다. 이러한 변이(modification)는 단지 신호 선도 서열의 첨가이다. 예를 들면, MAGE는 분비를 위한 신호 서열이 결핍된 세포내 단백질이다. 실시예 7에서, 신호 서열은 PCR 기술을 사용함으로써 MAGE에 첨가되었다. 상기 신호 서열을 MAGE에 첨가시킴으로써 이 세포내 단백질이 분비된다. 세포내 단백질의 또 다른 변이는 전형적으로 세포내 단백질인 전구체(percursor)를 변경시켜, 성숙한 단백질과 유사하게 분비된다. 예를 들면, IL-1 베타 전구체 단백질은 세포기질이지만, 성숙한 단백질이 분비된다. 그러므로, 사이더와 미첼(J.Biol.Chem, 1995)은 상기 전구체 단백질내 아미노산 잔기를 잘랐다. 그들은 100과 104사이의 몇 개의 아미노산의 결실이 상기 잘린 단백질의 분비 수치를 상기 성숙한 IL-1 베타 프리커서 단백질의 수치까지 증가시킨다고 설명하였다. 그러므로, 당업자는 이 정보를 이용하여 다른 세포내 단백질을 바꿀 수 있다.

<289> 다른 변이는 세포로부터 배출된 바이러스 입자의 사용을 포함한다. 그러므로 상기 레트로젠은 바이러스 유전자에 융합되고 배출을 위해 바이러스 입자로 만들어 진다. 바이러스 입자는 단백질 껍질에 의해 둘러싸인 핵산 계층으로 구성된다. 바이러스 입자의 패키징은 당해 기술분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 수행된다.

<290> 실시예 21

<291> 단백질 당화(glycosylation)

<292> IgG-Fc 당화는 Fc γ R 인식을 거쳐 작용 세포의 최적의 활성화를 위해 필수적인 것으로 당해 기술분야에서 공지

되어 있다. 그러므로, 상기 Fc 모이어티(moiety)를 포함하는 재조합 융합 단백질은 FcγR 에 대한 결합이 잠재적인 효용에 필수적이라면 당화가 가능한 시스템에서 생성되어야 한다. 바큐로바이러스(baculovirus)-곤충세포 시스템은 높은 수율의 재조합 단백질을 생산하는데 일반적으로 사용된다. 코어 올리고당(core oligosaccharide)과 외부 암(outer arm) 과당 잔기를 당단백질에 첨가시키는 이 시스템의 능력은 당업자에 의해 주지되어 있으며 HBe-Fc 융합 단백질의 발현과 정제를 위한 적합한 시스템을 만든다.

<293>

상기 IgG Fc에 융합된 상기 잘린 HBeAg 인프레임으로 구성되는 분비성 HBe-Fc 단백질을 발현하는 tHBeAgFc 플라스미드에 포함된 상기 1230bp HBeFc 분절이 구성되었다. 간략히, 재조합 HBe-Fc 바큐로바이러스는 상기 pFB1 도너(donor) 플라스미드를 가진 pFastBac 시스템(Gibco BRL)을 이용하여 생성되었다. 상기 HBe-Fc 분절은 상기 5'와 3' 말단, 각각에 EcoR I 과 HindIII 제한 부위를 도입하기 위해 상기 5'프라이머(SEQ. ID. No. 17) **5'-GATCGAATTCATGCAACTTTTTTCACCTCTGC-3'**와 3'프라이머 (SEQ. ID. No.

5'-GATCAAGCTTTTCATTTACCCGGAGACAGGGA-3'를 이용하여 tHBeAgFc 주형으로부터 증폭된 제 1 PCR 이다. 이 PCR 생산물은 겔 정화되고, 소화되고, pFB1 도너 플라스미드가 잘린 EcoR I /HindIII에 연결되었다. 이 얻어진 벡터 (pFB1-HBeFc)는 제한 효소 분석에 의해 동정되고 DNA 서열화에 의해 확인되었다. 상기 도너 플라스미드로부터 바큐로바이러스 게놈으로 상기 HBe-Fc 발현 카세트의 특정위치치환은 pFB1-HBeFc 도너 플라스미드로 DH10Bac 대장균을 형질전환시킴으로써 수행되었다. 벡미드(bacmid)로의 치환이 lacZ α 랩티드의 발현을 중단시키는 것과 같이, 재조합 바큐로바이러스는 X-gal 선택에 의해 동정되었다. 재조합 벡미드 DNA는 미니프랩에 의해 분리되고 제조사의 지침에 따라 Sf9 곤충 세포를 트랜스펙션시키는데 사용되었다.

<294>

상기 최초 트랜스펙션으로부터 얻은 바이러스의 저장액은 2×10^6 cell/ml로 Sf9 세포의 50ml 현탁 배양액을 0.5ml의 상기 저장액으로 감염시키고 48시간 후 상층액을 수집함으로써 증폭되었다. 그런 후에 이 저장액은 감염된 세포의 면역형광 염색에 의해 조사된 바와 같이 세포의 90% 정도 이상이 재조합 HBe-Fc를 생산하는 2번의 추가적인 증폭을 받는다. 그런 후에 증폭된 저장액은 72-90시간 동안 Sf9 세포의 네 개의 100ml 배양액을 감염시키는데 사용되었다. 상층액을 채취하고 4℃, 14,000RPM에서 20분동안 원심분리에 의해 정제하였다. 그런 후에 상기 정화된 상층액은 단백질 복구를 간섭할 수 있는 플루오닉(pluonic)을 제거하기 위해 5ml 세제 흡수 겔 컬럼(Detergent Absorber Gel Column)(Boehringer Mannheim)을 2번 통과시켰다. 그런 후에 재조합 HBe-Fc 단백질은 1ml/분의 유속으로 단백질 G 컬럼 (Pharmacia)으로 지나감으로써 상기 상층액으로부터 정화된다. 상기 컬럼은 100mM 트리스 pH 6.0 및 10mM 트리스 pH 6.0의 10 볼륨(volume)으로 순차적으로 세척한 후 상기 단백질은 100mM 글리신 pH 2.7의 10 볼륨을 갖는 1ml 부분에서 용출되었다. 모든 부분의 pH는 1M Tris pH 8.0의 1/10 볼륨의 추가로 인해 즉시 중성으로 조정되었다. 부분을 포함하는 단백질은 A₂₈₀에 의해서 판단되고 순수함을 판단하기 위해서 12% SDS-PAGE에 의해 분리되었다. 그런 후에 정화된 부분은 웨스턴 블롯(Western Blot) 처리하였다. 간략히, 용출된 부분을 포함하는 주요 단백질의 15μg은 환원(R) 또는 비-환원(NR) 조건하에서 12% SDS-PAGE에 의해 분리되어 니트로셀룰로오스로 옮겨져 얼룩지고, ECL 웨스턴 블롯팅 검사 시약을 사용하여 성상되었다. 제 1 차 항체인 토끼 anti-HBc와; 제 2 차 항체인 쥐 anti-토끼-과산화효소가 결합한다.

<295>

실시예 22

<296>

MHC-II-제한 항원의 동정

<297>

본 발명은 MHC-II-제한 바이러스 항원, HIV, HCV, EBV, 박테리아 항원, 다른 병원균 항원, 종양 항원, 자가면역 질환과 관련된 자가 항원을 동정하기 위해 사용된다. 본 발명의 발현벡터는 "테스트" 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변이되었다. 본 발명의 이 전략은 새로운 백신을 개발하기 위해 사용되는 새로운 항원/항원결정부를 동정한다.

<298>

첫째, cDNA 라이브러리(library)는 선택된 세포, 즉, 종양 세포로부터 mRNA를 사용하여 구성된다. cDNA가 매우 높은 수치로 관심있는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현하는 세포 또는 조직으로부터 제조되면, 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 대다수의 cDNA 클론은 최소의 노력으로 선택될 수 있다. 덜 풍부하게 번역된 폴리뉴클레오티드 서열의 경우, 상기 라이브러리(library)를 구성하기 전에 다양한 방법이 특별한 mRNA를 풍부하게 하는데 사용될 수 있다. 레트로바이러스는 상기 라이브러리용 벡터로서 사용된다. 레트로바이러스 라이브러리는 발현 클로닝(cloning)을 위해 고도의 복잡한 라이브러리를 사실상 임의의 미토티칼리(mitotically) 활성인 세포 형태로 전달하는 이상적인 방법을 제공한다. 상기 바이러스 입자는 높은 효율로 감염되기 때문에, 상기 바이러스 입자는 트랜스펙션에 기초한 방법보다 더 복잡한 라이브러리를 산출한다. 당업자는 어떤 벡터가 상기 라이브러리를 위해 사용될 수 있는 지 안다. cDNA 라이브러리는 당해 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여 구성된다.

간략히, 종양세포주는 종양샘플로부터 만들어진다. 동일한 포유류의 말초혈액으로부터의 CD4+T-세포는 단핵구/마크로파지로부터 유도된 상기 포유류의 종양 여액-펄스 DCs와 함께 공동-배양함으로써 확장되어 진다. 확장된 자가조직의 CD4+T-세포에 의해 인식된 종양세포가 동정된다. 다음으로, 상기 세포주는 96웰에 놓는다. 확장된 자가조직의 CD4+T-세포는 상기 96웰 속에 첨가되고 상기 96웰 공배양액에서 IFN- γ 또는 GM-CSF 농도를 관찰한다. 다음 단계는 상기 양성 종양세포로부터 mRNA를 추출하고 배양하는 것이다. 분리된 mRNA는 cDNA로 전환되고 벡터 속에 삽입되는데, 예를 들면, GFP 마커를 갖는 렌티바이러스의(lentiviral) 벡터 또는 상기 테스트 cDNA는 본 발명의 발현 벡터 복제된다. 상기 테스트 cDNA는 예를 들면, 실시예 25에서 설명한 바와 같이, 신호염기서열과 세포결합 요소 사이의 벡터 속에 복제된다. 일단 상기 cDNA 라이브러리가 구성되면, 상기 바이러스의 벡터는 패킹 세포 속에 트랜스펙션된다. 다음으로, 동일한 MHC-II 유전형을 갖는 포유류로부터의 단핵구로부터 유도된 면역 DCs는 상기 재조합 벡터와 함께 형질도입되고 효율이 결정된다. 형질도입된 DCs는 확장된 자가조직의 CD4+T-세포와 공배양된다. 양성 클론은 ELISA(GM-CSF) 또는 유동세포 계수법에 의한 IL2 표면 발현에 의해 동정된다. 상기 양성 클론은 상기 단백질(도 26)을 결정하기 위해서 PCR 증폭되고 서열화된다.

<299> 인간 계놈은 CD4+T-세포에 의해 인식되는 단백질과 항원결정부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 동정하기 위해 스크린된다. 이 폴리뉴클레오티드 생산물은 암치료 또는 자가 면역질환 치료, 또는 유전자 치료를 위한 면역내성을 유도하기 위해 사용된다. 이 기초적인 스크린 방법은 작은 치료 분자를 디자인하기 위한 항원결정부를 동정한다.

<300> 그러므로, 당업자는 이 스크린 방법이 다양한 계놈, 즉, 인간, 바이러스, 박테리아, 또는 기생충을 스크린하기 위해 변형된다는 것을 인식한다. cDNA 라이브러리의 구성은 당업계에 공지되어 있다. 그러므로, 당업자는 항원을 동정하는 본 발명을 변경하기 위하여 이 정보를 사용할 수 있다.

<301> 본 명세서에서 설명된 모든 특허와 간행물은 본 발명이 속한 기술분야의 당업자의 수준을 나타낸다. 본 명세서에 포함된 모든 특허와 간행물은 마치 각 개개 간행물이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되도록 나타내는 것과 같은 정도로 참고로 포함된다.

<302> 인용 문헌

Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A., *Nature* 383, 787-93 (1996).

Albert, M.L., Sauter, B. & Bhardwaj, N., *Nature* 392, 86-9 (1998).

Ausubel et al. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York)

Banchereau, J. & Steinman, R.M., *Nature* 392, 245-52 (1998).

Bangham et al., *J. Mol. Biol.*, 13:238, 1965.

Bei R, Schlom J, Kashmiri SVS., *J Immunol Meth*; 186:245-255 (1995).

Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F. & Heath, W.R., *Journal of Experimental Medicine* 186, 65-70 (1997).

<303>

- Bennett, S.R. et al., *Nature* 393, 478-80 (1998).
- Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988).
- Bona, C.A., Casares, S. & Brumeanu, T.D., *Immunology Today* 19, 126-33 (1998).
- Chaux, P. et al., *J. Experimental Medicine* 189, 767-78 (1999).
- Chen, J.D., Bai, X., Yang, A.G., Cong, Y. & Chen, S.Y., *Nature Medicine* 3, 1110-6 (1997).
- Cyster, J.G., Hartley, S.B. & Goodnow, C.C., *Nature* 371, 389-95 (1994).
- Daeron, M., *Annual Review of Immunology* 15, 203-34 (1997).
- De Veerman, M. et al., *Journal of Immunology* 162, 144-51 (1999).
- Deamer and Uster, "Liposome Preparation: Methods and Mechanisms," *LIPOSOMES*, M. Ostro ed. (1983).
- Ferrari, C. et al., *J. Immunol.* 145, 3442-9 (1990).
- Gallagher, S., Winston, S.E., Fuller, S.A. & Hurrell, J.G.R. *Current Protocols in Immunology (Supplement 26)*, Vol. 2 (ed. Coico, R.) 8.100.1-8.10.21 (John Wiley & Sons, Inc., 1998).
- Gaugler, B. et al., *Journal of Experimental Medicine* 179, 921-30 (1994).
- Gerhardt et al. (eds., 1994, *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC).
- Ghosh and Bachhawat, In: Wu G. Wu C ed., *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, New York: Marel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Gilboa, E., *Immunity* 11, 263-70 (1999).

Greenberg, P.D., Cheever, M.A. & Fefer, A., *Journal of Experimental Medicine* 154, 952-63 (1981).

Gregoriadis, *DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE*, G. Gregoriadis (ed.), 1979, pp. 287-341.

Haeflner-Cavaillon, N., Klein, M. & Dorning, K.J., *Journal of Immunology* 123, 1905-13 (1979).

Harlow et al., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York;

Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883;

Hsu TA, Takahashi N, Tsukamoto Y, Kato K, Shimada I, Masuda K, Whiteley EM, Fan JQ, Lee YC, Betenbaugh MJ. *J Biol Chem* 1997; 272:9062-9070.

Hu, P. et al., *Human Antibodies & Hybridomas* 6, 57-67 (1995).

Huang, A.Y. et al., *Science* 264, 961-5 (1994).

Hung, K. et al., *Journal of Experimental Medicine* 188, 2357-68 (1998).

Inaba, K. et al., *Journal of Experimental Medicine* 176, 1693-702 (1992).

James, R.F., Edwards, S., Hui, K.M., Bassett, P.D. & Grosveld, F., *Immunology* 72, 213-8 (1991).

Jarvis D, Kowar Z, Hollister J., *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:528-533.

Kalams, S.A. & Walker, B.D., *Journal of Experimental Medicine* 188, 2199-204 (1998).

Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.

Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.

- Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L., *Science* 267, 243-6 (1995).
- Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Jefferis R., *J Immunol* 1996; 157:4963-4969.
- Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Nakagawa H, Jefferis R., *FASEB J* 1995; 9:115-119.
- Mackey, M.F. et al., *Cancer Research* 57, 2569-74 (1997).
- Manici, S. et al., *Journal of Experimental Medicine* 189, 871-6 (1999).
- Matzinger, P., *Journal of Immunological Methods* 145, 185-92 (1991).
- Mellman, I., Turley, S.J. & Steinman, R.M., *Trends in Cell Biology* 8, 231-7 (1998).
- Mumberg, D. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8633-8 (1999).
- Nestle, F.O. et al., *Nature Medicine* 4, 328-32 (1998).
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nuchtern, J.G., Biddison, W.E. & Klausner, R.D., *Nature* 343, 74-6 (1990).
- Ossendorp, F., Mengede, E., Camps, M., Filius, R. & Melief, C.J., *Journal of Experimental Medicine* 187, 693-702 (1998).
- Ou, J.H., Laub, O. & Rutter, W.J., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 1578-82 (1986).
- Pardoll, D.M. & Topalian, S.L., *Current Opinion in Immunology* 10, 588-94 (1998).
- Ravetch et al., 1993, *Ann. Rev. Immunol.* 9:457-492)

Regnault, A. et al., *Journal of Experimental Medicine* 189, 371-80 (1999).

Reynolds, S.R. et al., *International Journal of Cancer* 72, 972-6 (1997).

Ridge, J.P., Di Rosa, F. & Matzinger, P., *Nature* 393, 474-8 (1998).

Rosenberg, S.A., *Immunity* 10, 281-7 (1999).

Rosenfeld et al., *Clin. Res.*, 39(2), 311A (1991a);

Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)

Sanderson, S., Frauwirth, K. & Shastri, N., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7217-21 (1995).

Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R. & Melief, C.J., *Nature* 393, 480-3 (1998).

Serre, K. et al., *J. Immunology* 161, 6059-67 (1998).

Sigal, L.J., Crotty, S., Andino, R. & Rock, K.L., *Nature* 398, 77-80 (1999).

Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., *J. of Cell Biology* 55, 186-204 (1972).

Steinman, R.M. & Swanson, J., *J. of Experimental Medicine* 182, 283-8 (1995).

Syrengeles, A.D. & Levy, R., *J. of Immunology* 162, 4790-5 (1999).

Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 75:4194-98 (1978).

Tanaka, F. et al., *Cancer Research* 57, 4465-8 (1997).

Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejean, A., *Nature* **317**, 489-95 (1985).

Valmori, D. et al., *Journal of Experimental Medicine* **189**, 895-906 (1999).

van der Bruggen, P. et al., *European Journal of Immunology* **24**, 3038-43 (1994).

Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P., *Current Opinion in Immunology* **9**, 684-93 (1997).

Vijayasaradhi, S., Xu, Y., Bouchard, B. & Houghton, A.N., *Journal of Cell Biology* **130**, 807-20 (1995).

Watts, C., *Annual Review of Immunology* **15**, 821-50 (1997).

Weber, J.S. et al., *Journal of Immunotherapy* **22**, 431-40 (1999).

Wong et al., *Gene*, **10**:87-94, 1980.

Wu, T.C. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 11671-5 (1995).

Yang, A.G., Bai, X., Huang, X.F., Yao, C. & Chen, S., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11567-72 (1997).

Zajac et al., *Curr. Opin. Immunol.* **10**:444 (1998).

<308>

<309>

당업자는 본 발명이 목적을 달성하고 언급될 뿐만 아니라 본 발명에 고유한 목표 및 장점들을 얻기 위해서 잘 적용된다는 것을 쉽게 인식할 것이다. 본 명세서에 기술된 백신, 벡터, 방법, 절차 및 기술들은 현재 바람직한 실시예를 나타내는 것이고, 예로 간주되며, 그 범위를 한정하는 것으로 간주되는 것은 아니다. 실시예의 변경 및 다른 용도는 당업자들에게는 알 수 있을 것이며, 상기 변경 및 다른 사용은 본 발명의 취지 내에 포함되거나 또는 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의된다.

산업상 이용 가능성

<310>

당업계에서는 포유동물의 질병 치료를 위해 면역 반응을 유발하는 효율적이면서 규제된 수단을 오랫동안 요구하여 왔다. 본 발명은 이러한 요구를 만족시킨다.

도면의 간단한 설명

<172>

도 1A와 도 1B는 본 발명의 레트로젠(retrogen) 전략을 나타내는 도면이다. 본 발명의 상기 레트로젠은 세포, 예로 근육 세포(도 1A)에서 형성되고, 항원 제공 세포(도 1B)에 의하여 흡수된다. 상기 레트로젠은 항원 제공 세포에서 처리되고 그 다음 MHC-I 또는 MHC-II 복합체로서 발현되거나, 도 1A 와 도 1B에 도시된 B 세포 수용체에 제공된다. 상기 레트로젠의 MHC-I 제공은 세포독성 CD8+ T 세포를 활성화시키고 상기 레트로젠의 MHC-II 제공은 CD4+ T 세포를 활성화시킨다.

<173>

도 2A, 도 2B와 도 2C는 발현 벡터의 일련의 개략도이다. 도 2A는 HBeAg(분비성, secretory), HBeAg(세포기질, cytosolic) 또는 상기 도면에서 보이는 융합 유전자를 발생시킴과 상기 유전자를 레트로바이러스 벡터 또는 발현 벡터 pRc/CMV로 복제함으로써 구축되는 신호 서열(분비성)을 가진 Fc 분절으로 구성되는 벡터를 나타낸 도면이다. 도 2B와 도 2C는 구축되는 또 다른 벡터를 나타낸 도면이다.

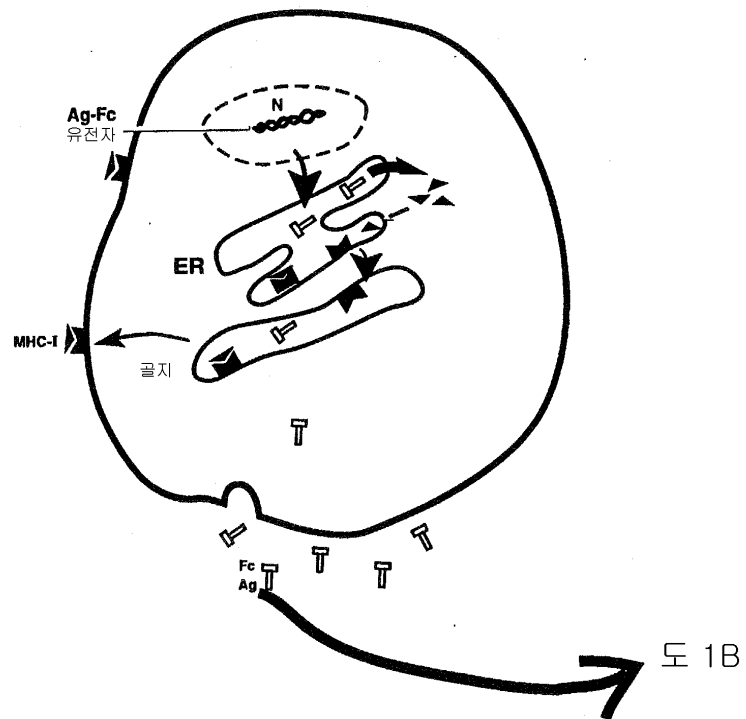
- <174> 도 3은 HBe-레트로겐의 발현과 분비를 도시한 웨스턴 블롯의 이미지를 나타낸 도면이다. COS 세포는 여러 발현 벡터에 의하여 감염된다. 배지(M)와 세포 여액(C)은 anti-IgG 또는 anti-HbeAg 항체에 의해 결정화되고 SDS-PAGE로 분석된다.
- <175> 도 4A, 도 4B와 도 4C는 수지상 세포에서 레트로겐의 형질 도입과 발현을 도시한 일련의 그래프이다. 쥐 골수 세포는 여러 재조합 레트로바이러스 벡터에 의해 형질 도입된다. 즉, 세포는 성숙되어 GM-CSF, TNF와 IL-4 존재 하에 수지상 세포로 성숙되고 anti-NGFR에 의해 염색된다. 상기 세포는 유동 세포계수법에 의하여 측정된다. 도 4A는 형질 도입되지 않은 수지상 세포를 나타내는 도면이다. 도 4B는 형질 도입된 수지상 세포를 나타내는 도면이다. 도면 4C는 음성 대조군이다.
- <176> 도 5A, 도 5B, 도 5C, 도 5D 및 도 5E는 유동 세포계수법으로 결정된 수지상 세포에 있는 표면 마커(MHC-I, MHC-II, 공통 자극 및 부착 분자(CD11C, CD54, CD80 및 CD86))의 존재를 묘사한 일련의 도면이다. 도 5A는 CD11C 표면 마커를 나타낸 도면이다. 도 5B는 CD54 표면 마커를 나타낸다. 도 5C는 CD80 표면 마커를 나타낸다. 도 5D는 CD86 표면 마커를 나타낸다. 그리고, 도면 5E는 MHC-II의 존재를 나타낸다.
- <177> 도 6A와 도 6B는 레트로겐-형질 도입된 수지상 세포에 의하여 순수 CD4+ T 세포가 인비트로 활성화되는 것을 묘사한 두 개의 막대 그래프이다. 도 6A는 공통 배지에 있는 IFN- γ 의 수치를 나타낸 도면이다. 도 6B는 공동 배지에 있는 GM-CSF의 수치를 나타낸 도면이다.
- <178> 도 7A와 도 7B는 MHC-II 의존 활성화를 나타낸다. 도 7A는 HBe-레트로겐 및 상기 야생형 쥐로부터 얻은 공동 배지양되고 순수 CD4+ T 세포로 형질도입된 MHC-II 제거(knockout, KO) 쥐 또는 야생형(WT) C57BL/6 쥐로부터 얻은 세포에서의 시토카인 농도를 나타낸 도면이다. 도 7B는 상기 GM-CSF 시토카인 농도를 나타낸 도면이다.
- <179> 도 8은 면역된 쥐의 혈청에서 항체 반응을 나타낸 도면이다.
- <180> 도 9A, 도 9B, 도 9C, 도 9D, 도 9E 그리고 도 9F는 s-MAGE-3-Fc 융합 단백질의 구축과 발현을 나타낸다. 도 9A는 재조합 레트로바이러스 벡터의 도식적인 개략도이다. (S: 신호 서열, IRES: 내부 리보솜 엔트리(entry) 부위 서열.) 도 9B는 수지상 세포에 있는 다른 구성물의 발현이고 상기 수지상 세포는 쥐의 anti-MAGE-3와 anti-쥐 IgG HRP 접합체로 염색되어 웨스턴 블롯 분석에 의하여 결정된다. 도 9C는 이미지 콰نت(Image Quant) 프로그램을 사용하는 포스퍼이미저(PhosphorImager(Molecular Dynamics))로 분석한 도 9B의 웨스턴 블롯의 단백질 밴드 세기를 보여준다. 도 9D, 도 9E 그리고 도 9F는 각 구성물에 의하여 형질 도입되고 MHC-II(도 9E)(M5/114.15.2), CD40(도 9D)(HM40-3), 그리고 CD86/B7.2(도 9F)(GL1)(PharMingen)을 위해 염색되는 형질 도입된 수지상 세포의 유동 세포계수법 분석을 나타낸 도면이다.
- <181> 도 10A, 도 10B, 도 10C 그리고 도 10D는 CD4+ T 세포의 공배양이후 배지에서 다른 벡터들로 형질 도입된 수지상 세포로 면역된 쥐의 인비보 CD4+ Th1 반응을 유도하는 것을 보여주는 도면이다. 도 10A는 IFN- γ 의 농도를 보여준다. 도 10B는 IL-2의 농도를 보여준다, 도 10C는 TNF- α 의 농도를 보여준다. 도 10D는 IL-4의 농도를 보여준다.
- <182> 도 11A와 도 11B는 anti-CD4와 anti-CD8 항체(도 11A)의 존재 또는 비존재에서 s-MAGE-3-Fc-수지상 세포로 공배양되거나 HbAg 형질 도입된 수지상 세포(도 11B)로부터 공배양된 s-MAGE-3-Fc-수지상 세포 면역된 쥐로부터 분리된 CD4+ T 세포내의 IFN- γ 수치를 나타낸다.
- <183> 도 12A, 도 12B, 도 12C 그리고 도 12D는 1000:1의 비율로 동일한 면역된 쥐의 배수(drainage) 림프 결절(LN)로부터 분리된 수지상 세포군으로 공배양된 수지상 세포로 면역된 쥐의 울혈(pooled) 비장세포로부터 분리된 CD4+ T 세포에 있는 시토카인 수치를 보여주고, 도 12A는 IFN- γ 의 농도를 보여준다. 도 12B는 IL-2의 농도를 보여준다. 도 12C는 TNF- α 의 농도를 보여준다. 도 12D는 IL-4의 농도를 보여준다.
- <184> 도 13은 조사한(irradiated) EL4-MAGE-3 세포를 인비트로 재자극한(E) 면역된 쥐 또는 3H-티미딘 표지된 표적 세포인 EL4-MAGE-3 또는 EL4-HbAg(대조군)(T)로 공배양한 면역된 쥐로부터 분리한 비장세포의 세포 독성 반응을 인비보 유도하는 것을 보여준다,
- <185> 도 14는 수지상 세포의 면역 6주후 유도된 항체 반응을 보여준다.
- <186> 도 15는 ELISA에 의해 측정된 anti-CD40L 항체(MR1, PharMingen)의 존재 또는 비존재에서 공배양하여 IL-12의 수치를 측정하여 s-MAGE-3-Fc-수지상 세포와 T-세포의 증폭된 상호작용을 보여준다.
- <187> 도 16A와 도 16B는 접종하기전 다른 구성물로 형질 도입한 수지상 세포 1×10^5 로 *i.v.* 주사에 의해 면역시킨

쥐의 항암 면역성을 보여준다. 도 16A는 종양 부피를 보여준다. 도 16B는 각 군에서 생존한 쥐의 백분율을 보여준다.

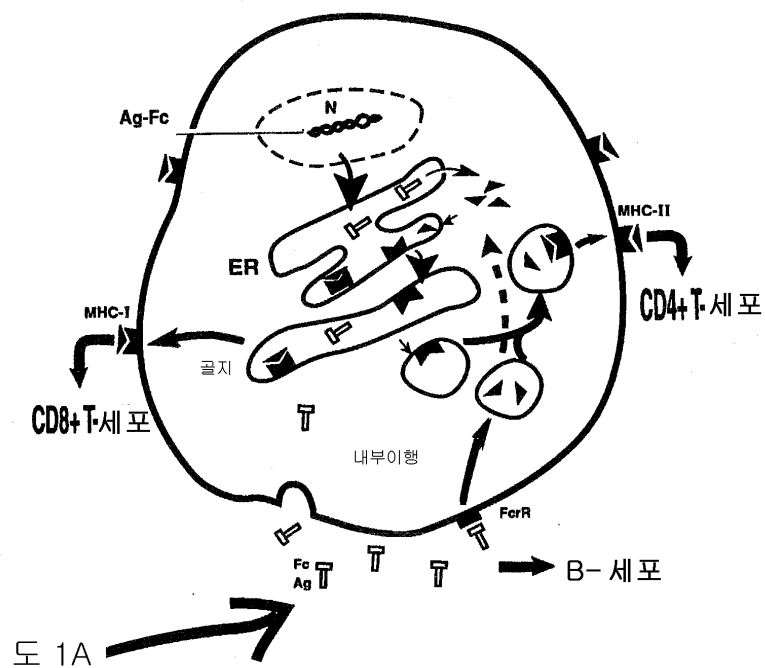
- <188> 도 17은 HPV 16E7의 하전된 아미노산 잔기를 보여주고, 상기 잔기는 제거되어 단백질을 안정화시키고 분비를 증진시킨다.
- <189> 도 18은 발현 벡터의 개략도를 나타낸 도면이다. HBe-Fc 융합 유전자, HBcAg(세포기질의, cytosolic) 유전자, HBeAg(분비, secretory) 유전자, 또는 신호 서열(분비)를 가진 Fc cDNA 분절은 각각 CMV 프로모터 제어하에서 pRc/CMV 벡터로 복제된다.
- <190> 도 19A와 도 19B는 HBe-Fc, HBcAg, HBeAg 그리고 Fc 구성물의 발현을 나타낸다. 도 19A는 웨스턴 블롯 분석으로 결정되었을 때 세포에서 발현된 다른 구성물의 발현을 보여준다. 도 19B는 이미지 퀀트 프로그램을 사용하여 포스퍼 이미저(Molecular Dynamics)로 분석한 도 19A에 있는 웨스턴 블롯의 단백질 밴드 세기를 보여준다.
- <191> 도 20은 면역 4주후 희생된 다른 플라스미드나 초회피항원자극을 받은(primed) T 세포로 DNA 면역시킨후 쥐의 T 세포 반응을 유도하는 도면이다. 비장세포는 HBe/cAg 재조합 단백질에 의해 5주간 재자극된다.
- <192> 도 21A, 도 21B, 도 21C 그리고 도 21D는 면역 4주후 희생되거나 다른 플라스미드로 면역된 쥐의 CD4+ T 세포 반응의 인비보 유도를 나타낸다. 도 21A와 도 21B는 HBe/cAg 펄스드(pulsed)-수지상 세포로 복제하여 공배양한 CD4+ T 세포를 보여준다. 도 21C와 도 21D는 안티-CD4+ 또는 안티-CD8+ 항체의 존재 또는 비존재에서 HBe/cAg 펄스드-수지상 세포로 공배양한 HBeFc 면역된 쥐로부터의 CD4+ T 세포를 보여준다. 배지에 있는 IFN- γ 와 IL-2의 농도는 공배양 24시간후 ELISA로 결정된다.
- <193> 도 22는 DNA 면역된 쥐로부터 분리하여 5일 동안 조사한 EL4-HBcAg 세포를 인비트로 재자극한 비장세포에서 CTL 반응의 인비보 유도를 나타낸다. 상기 재자극된 비장세포(E)는 ^3H -표지된 표적 세포, EL4-HbcAg 또는 EL4-MAGE3(대조군)(T)과 4시간 동안 공배양된다.
- <194> 도 23은 항체 반응 유도를 보여준다. DNA 면역 4-6주후 쥐로부터 얻은 HBc/eAg-특이 IgG 항체는 ELISA에 의해 결정된다.
- <195> 도 24는 수지상 세포 전이 실험 데이터를 나타낸 도면이다. CD11c+ 수지상 세포는 DNA 백신으로 면역된 도너(donor) 쥐의 비장세포로부터 분리된다. 상기 초회피항원자극을 받은 수지상 세포는 공동유전자의 순수 수용체의 측꼬리정맥으로 주입된다. 양자 전이 2-4주후 T 세포 증식 분석이 수행된다.
- <196> 도 25는 MHC-II 제한 항원 결정부를 동정하기 위해 cDNA 라이브러리의 구축을 위한 레트로바이러스 벡터의 개략도이다.
- <197> 도 26은 CD4+ 보조 T 세포 반응을 유도할 수 있는 MHC-II 제한 항원 결정부를 동정하기 위한 과정의 개략도이다.

도면

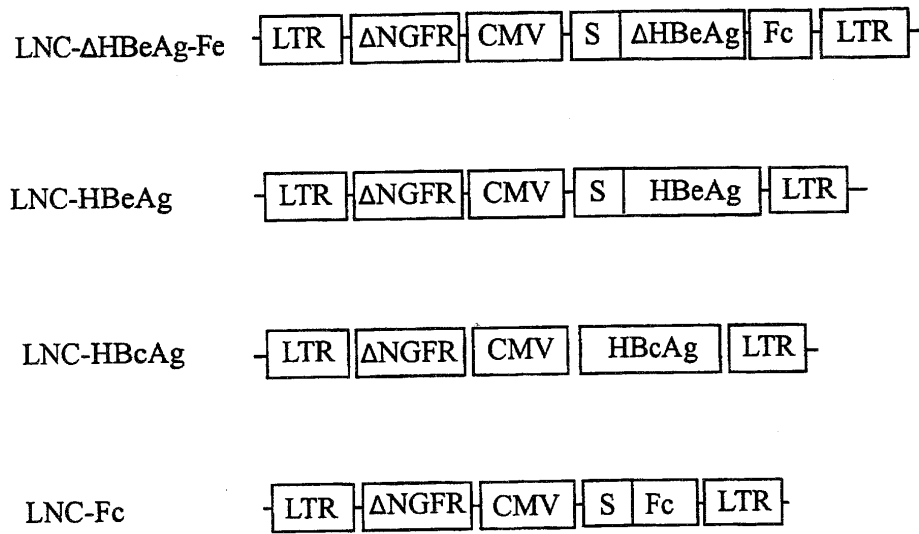
도면1A



도면1B

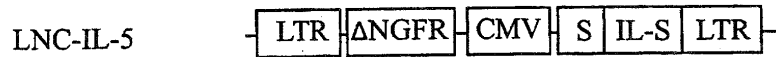


도면2A



도면2B

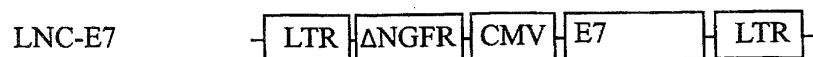
세포결합용 IL-5(HbeAg, B 형간염 바이러스)



티로니나아제용 Fc 분절 (흑색종)

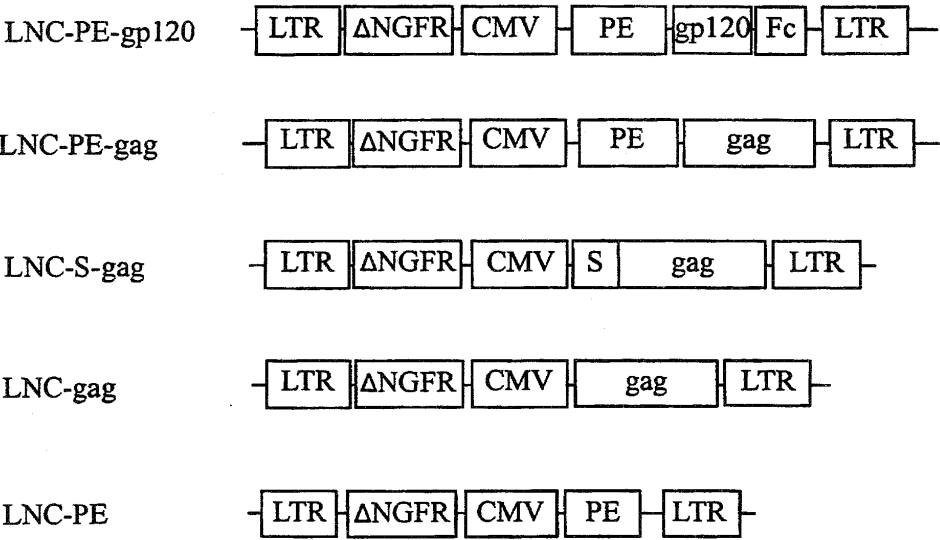


파필로마 바이러스 16E-7 용 Fc 분절 (경부암)

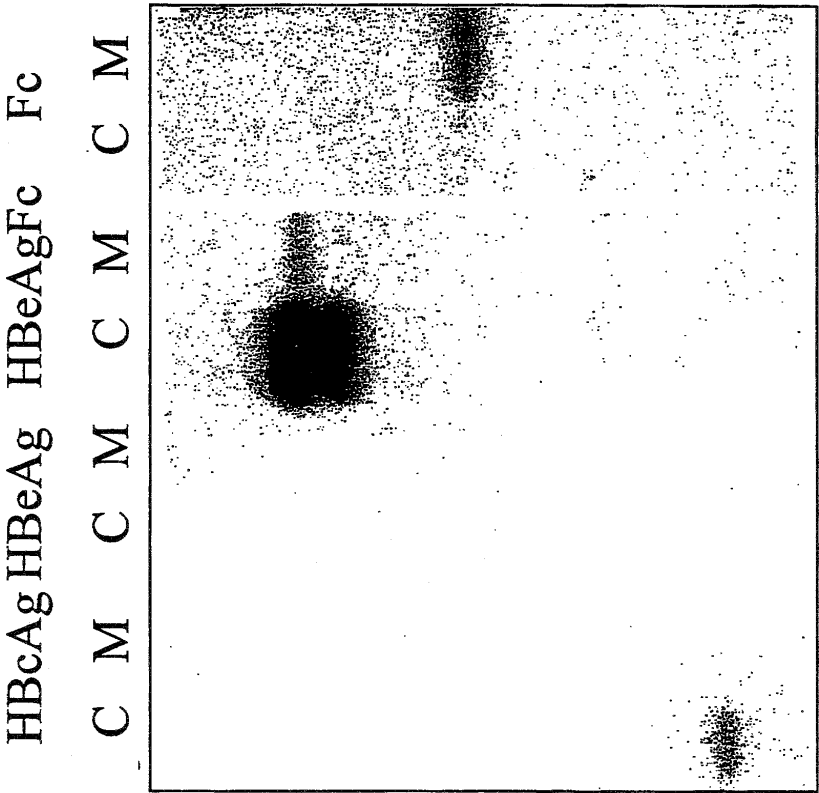


도면2C

HIV-1 용 PET 세포 - 결합 영역

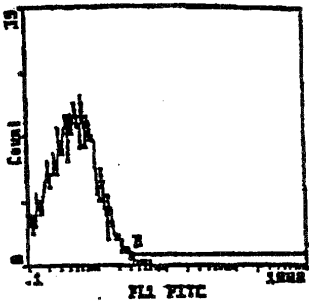


도면3



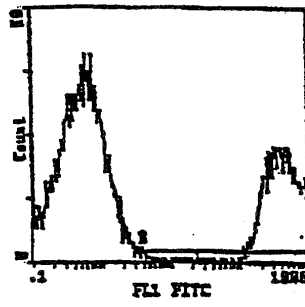
도면4A

형질도입되지 않은 DCs



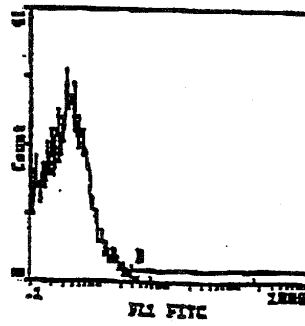
도면4B

형질도입된 DCs



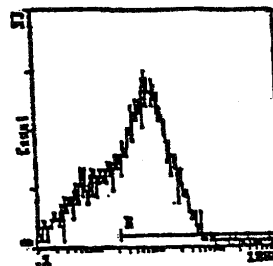
도면4C

네가티브 조절



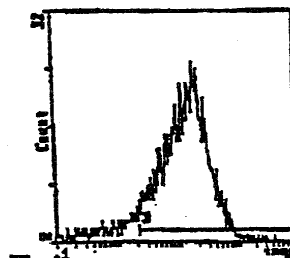
도면5A

CD11C



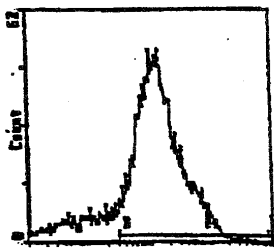
도면5B

CD54



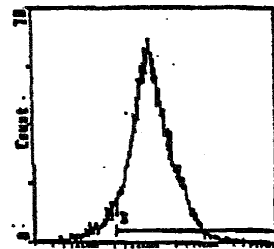
도면5C

CD80



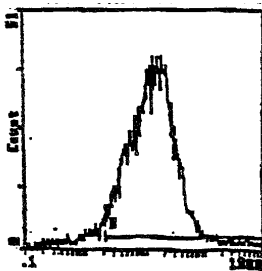
도면5D

CD86

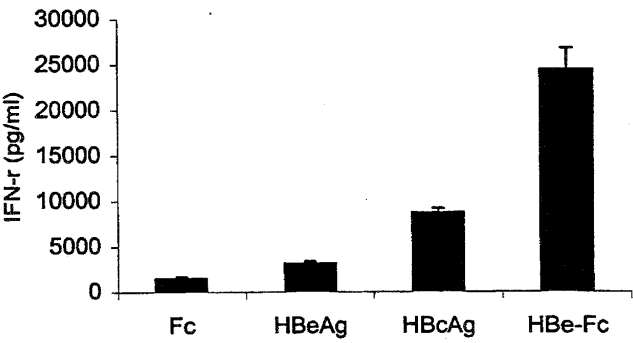


도면5E

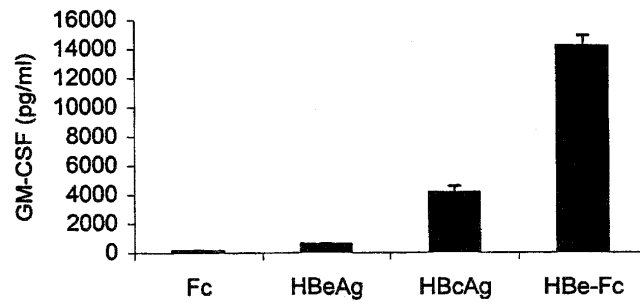
MHC-II



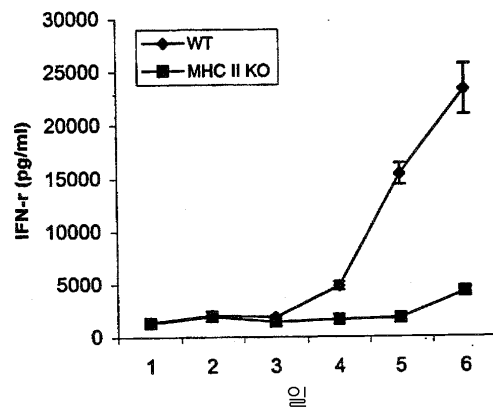
도면6A



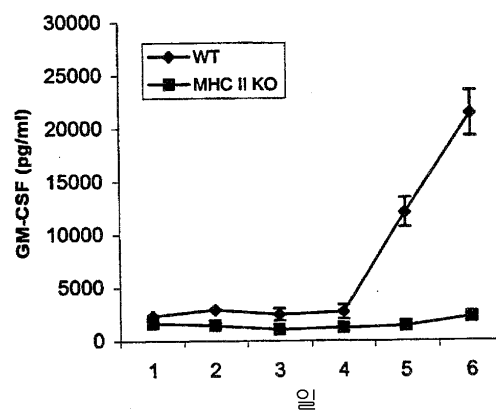
도면6B



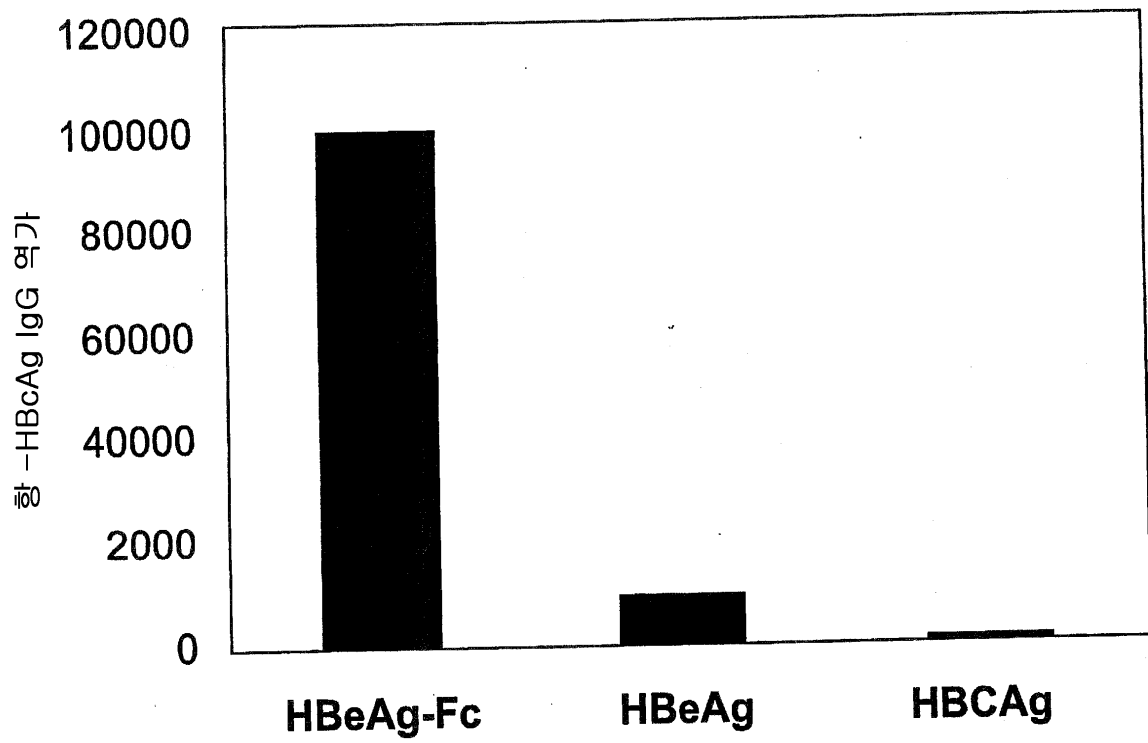
도면7A

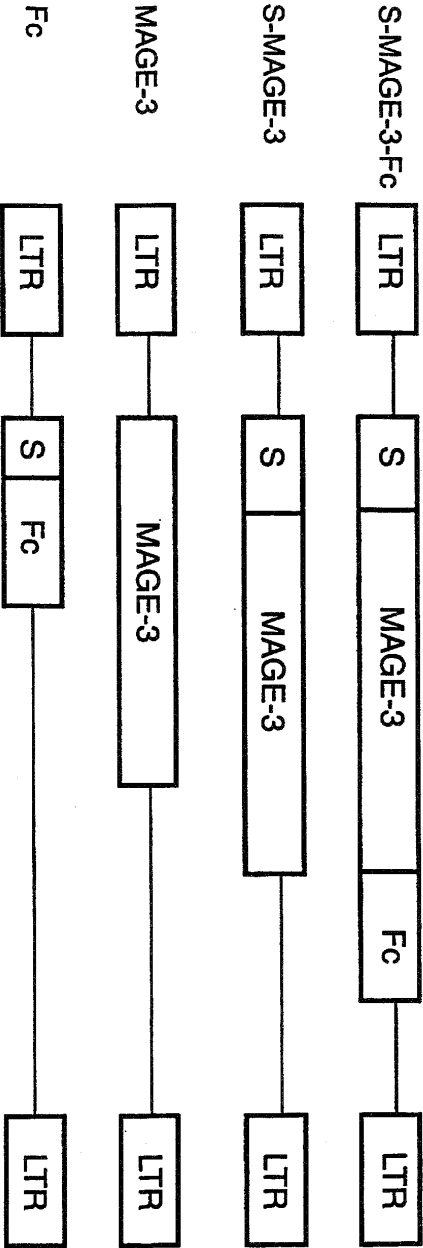


도면7B



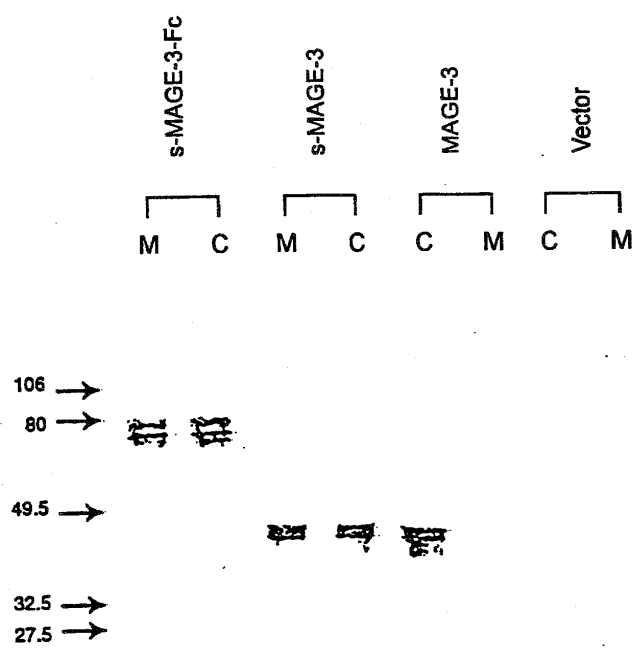
도면8



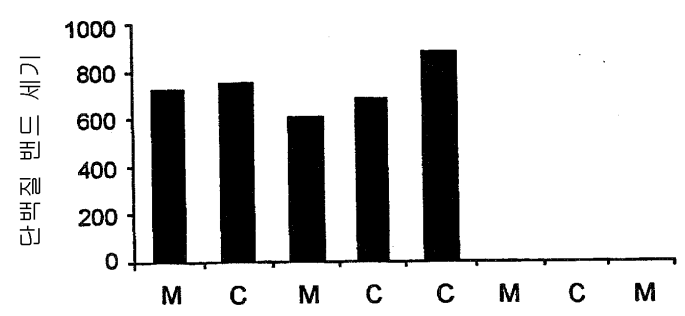


도면9A

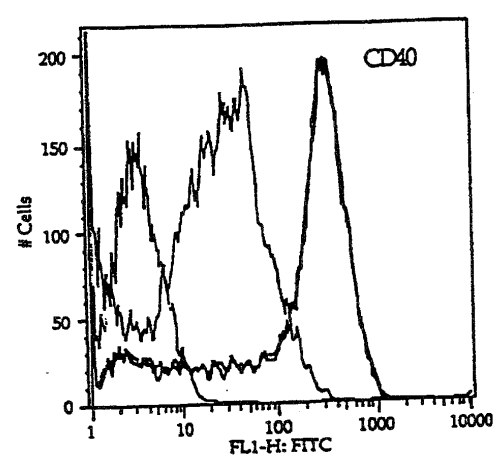
도면9B



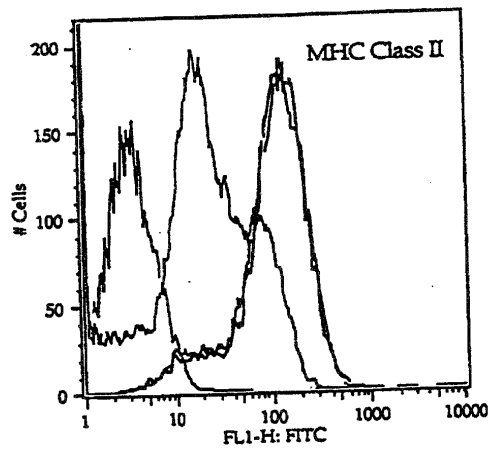
도면9C



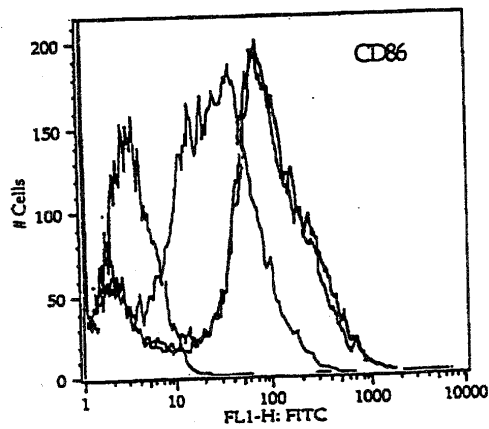
도면9D



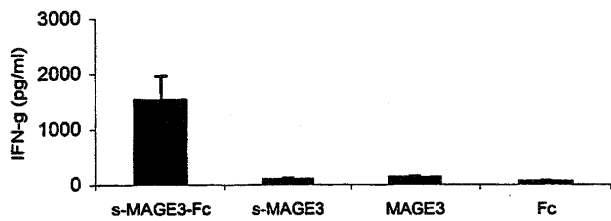
도면9E



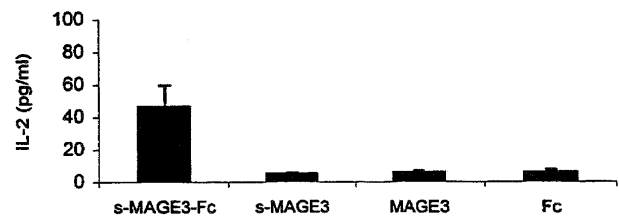
도면9F



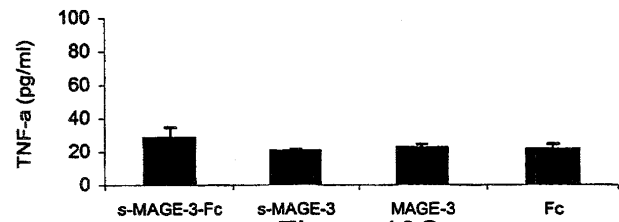
도면10A



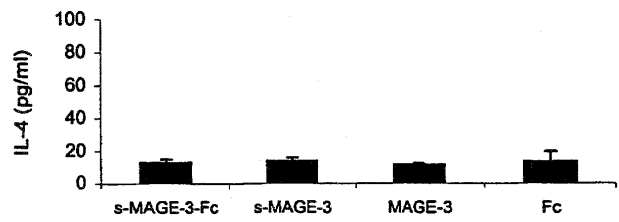
도면10B



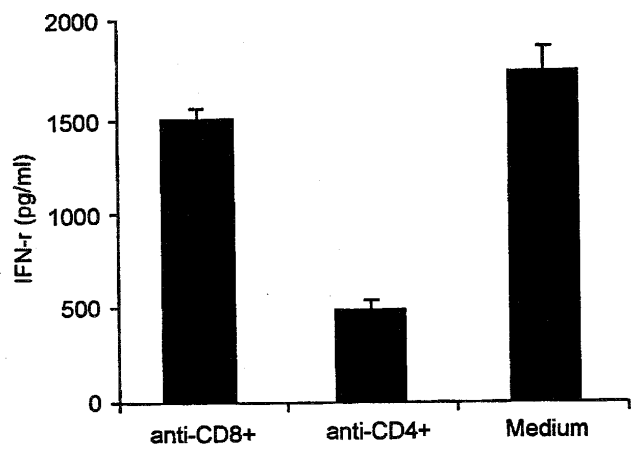
도면10C



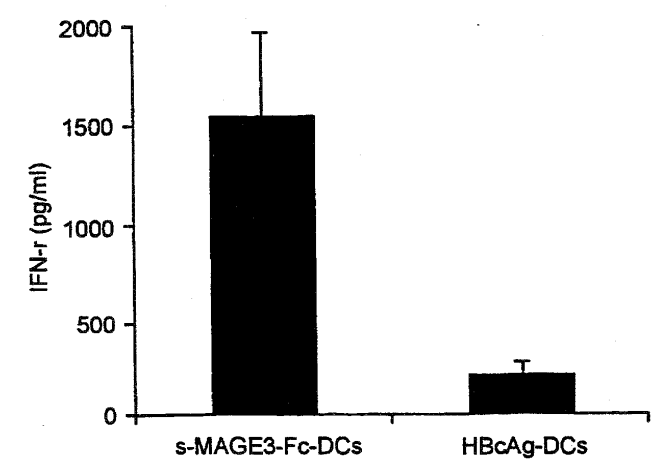
도면10D



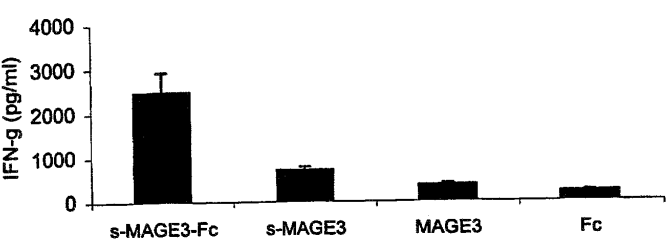
도면11A



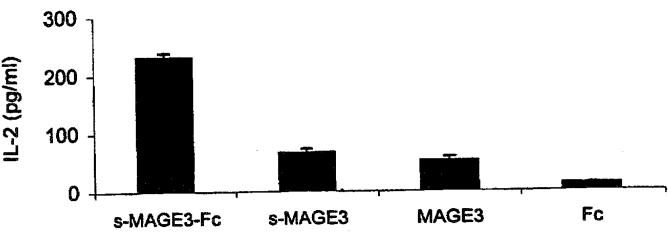
도면11B



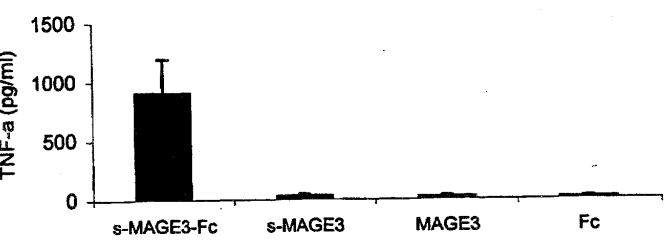
도면12A



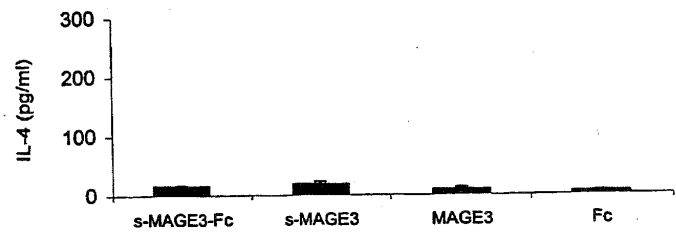
도면12B



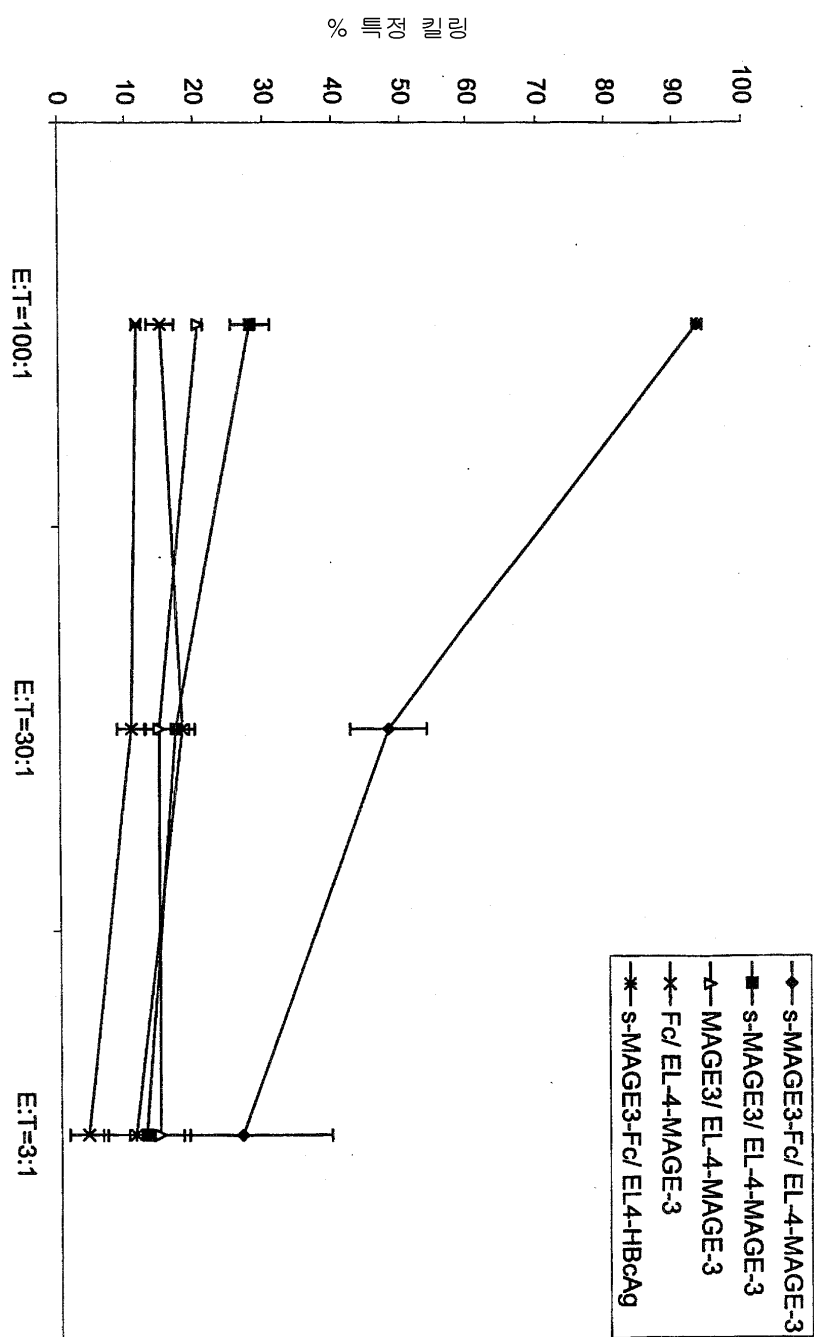
도면12C



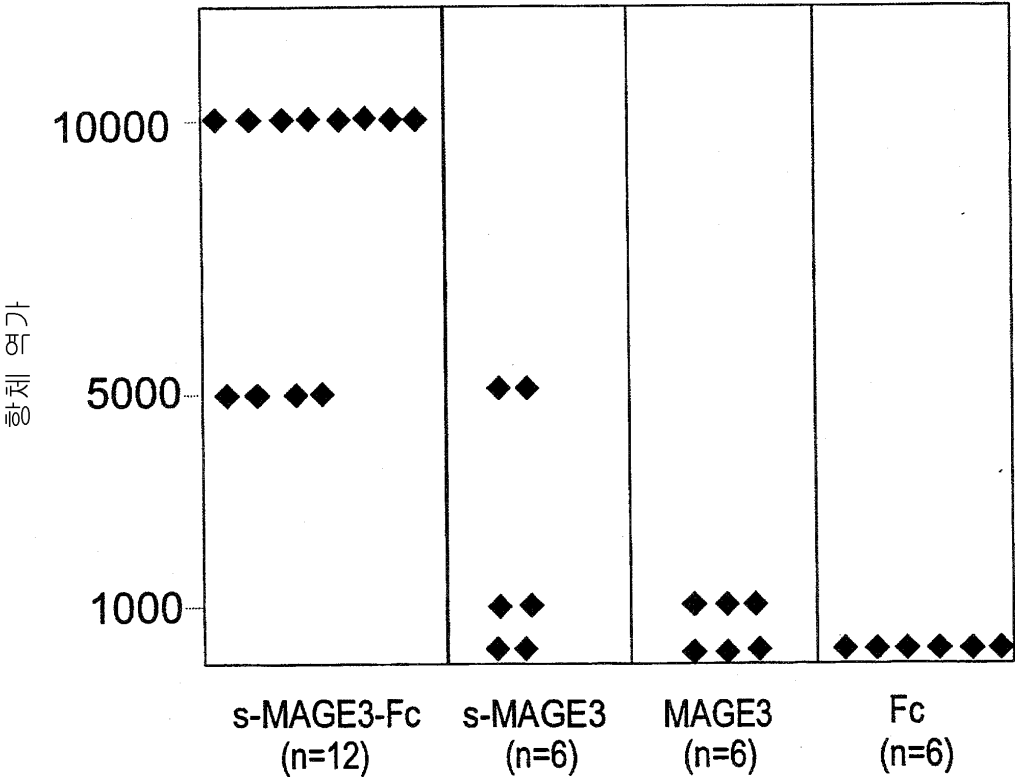
도면12D



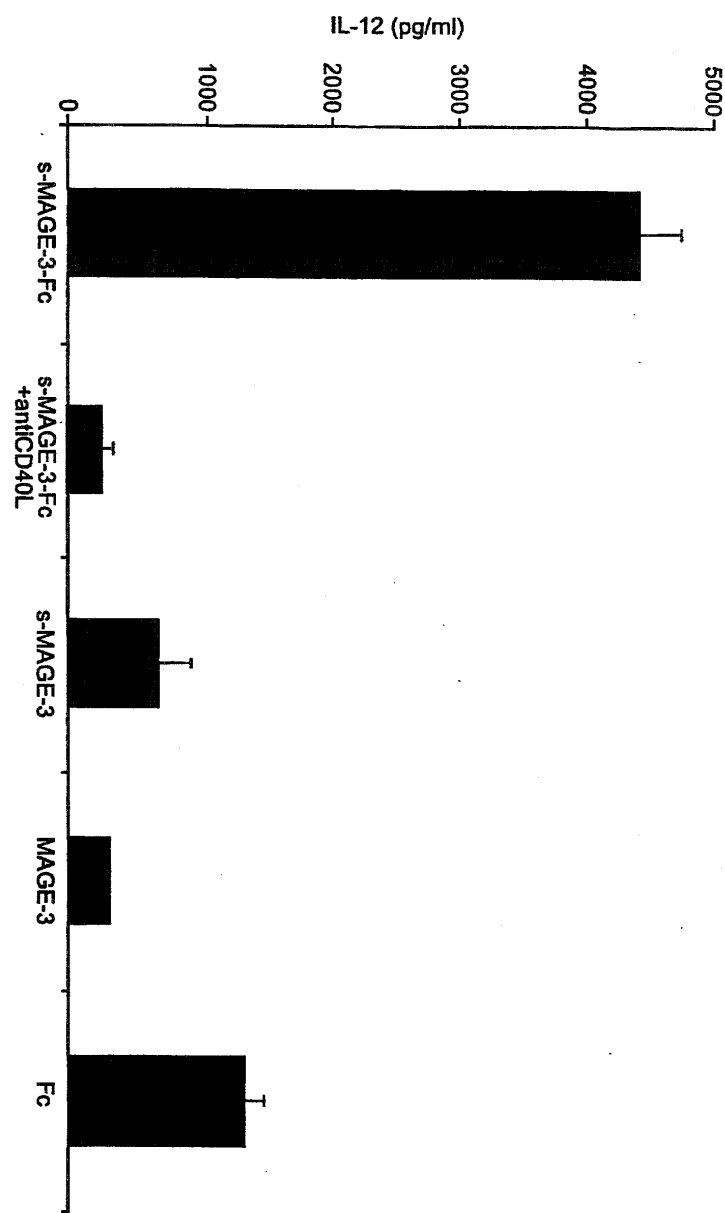
도면13



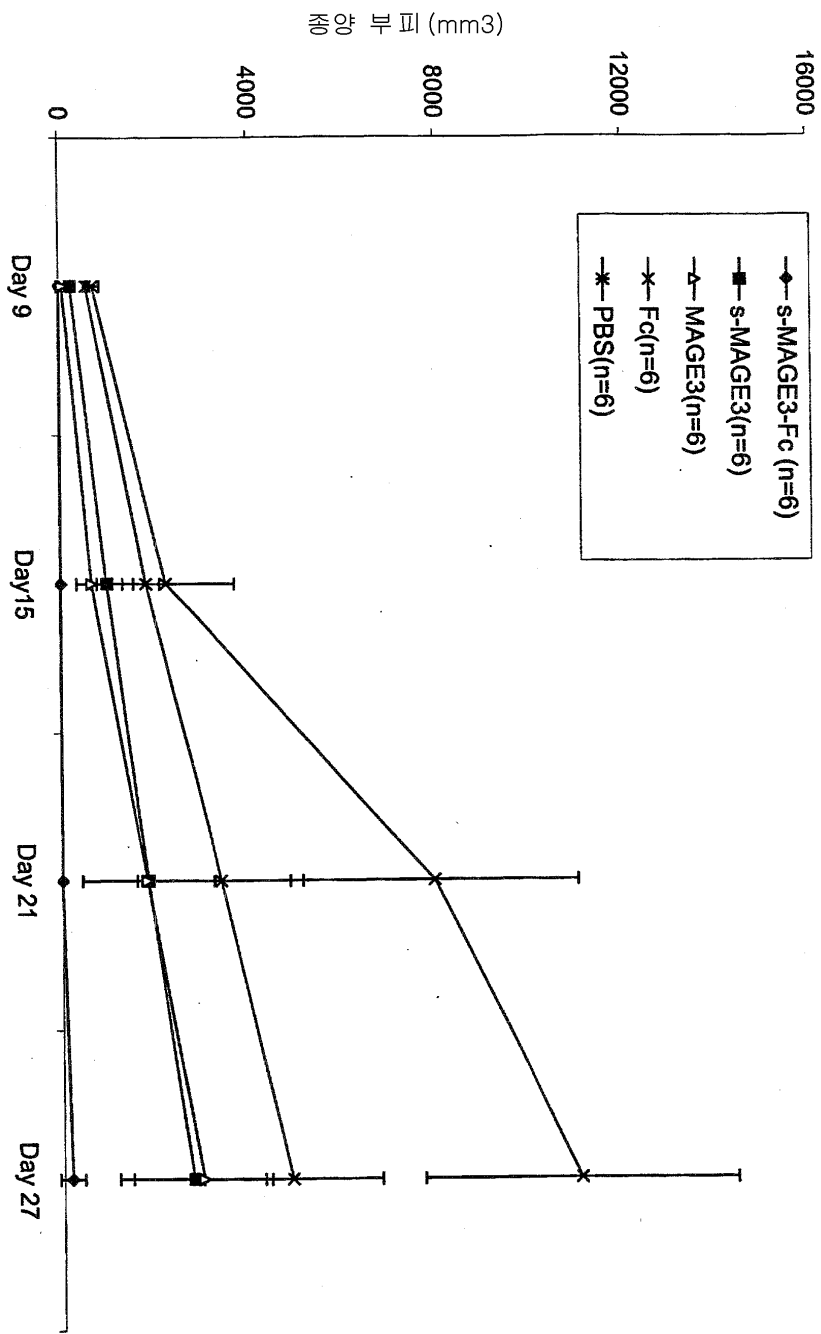
도면14



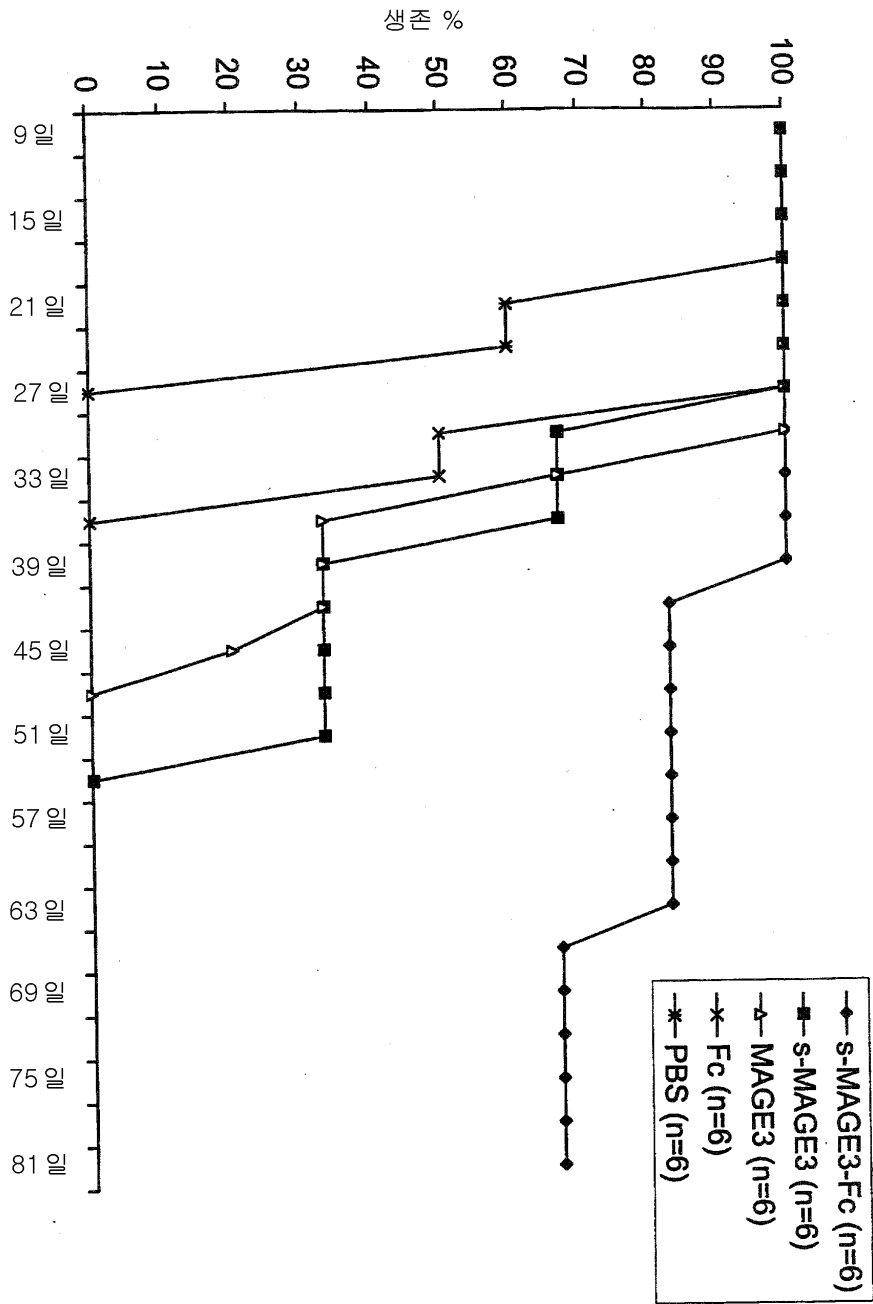
도면15



도면16A



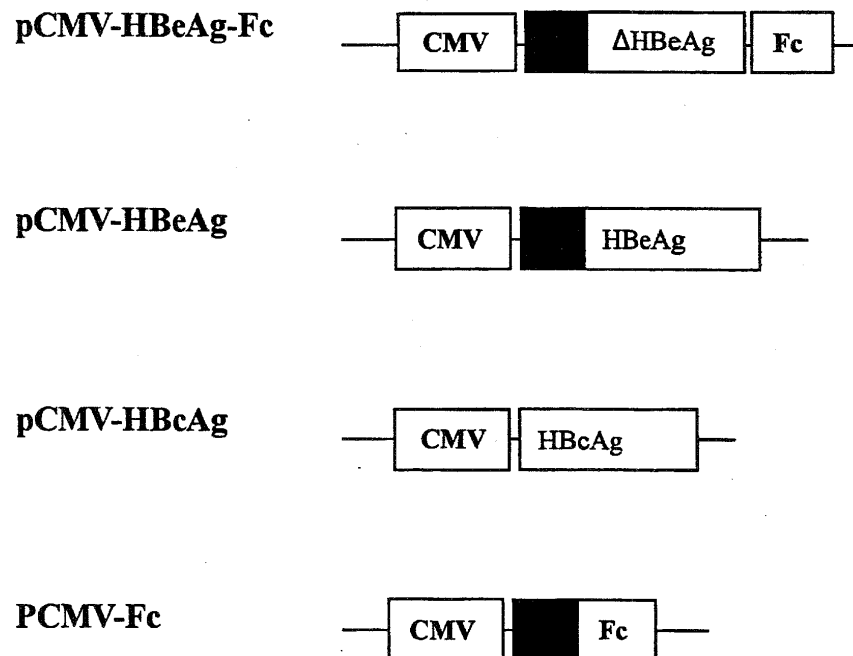
도면16B



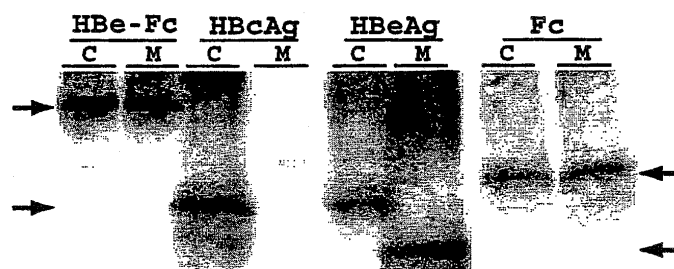
도면17

SEQ. ID. NO. 19 M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T D
 L Y C Y E Q L S D S S E E E D E I D G P A G
 Q A E P D R A H Y N I V T F C C K C D S T L
 R L C V Q S T H V D I R T L E D L L M G T L
 G I V C P I C S Q K P -

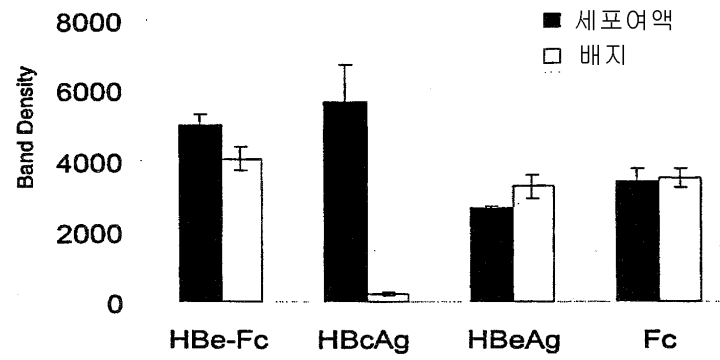
도면18



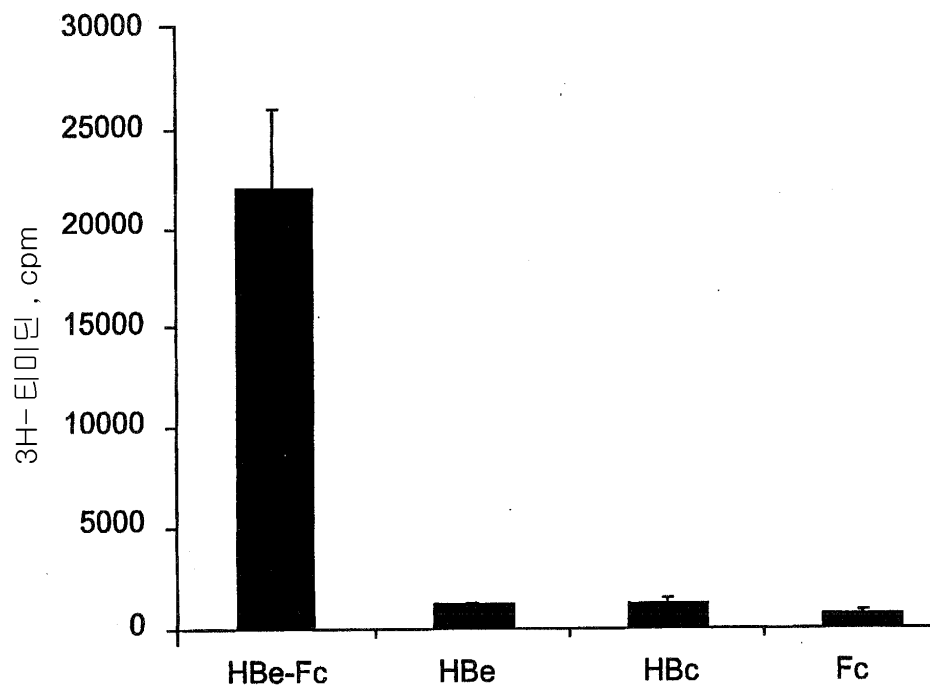
도면19A



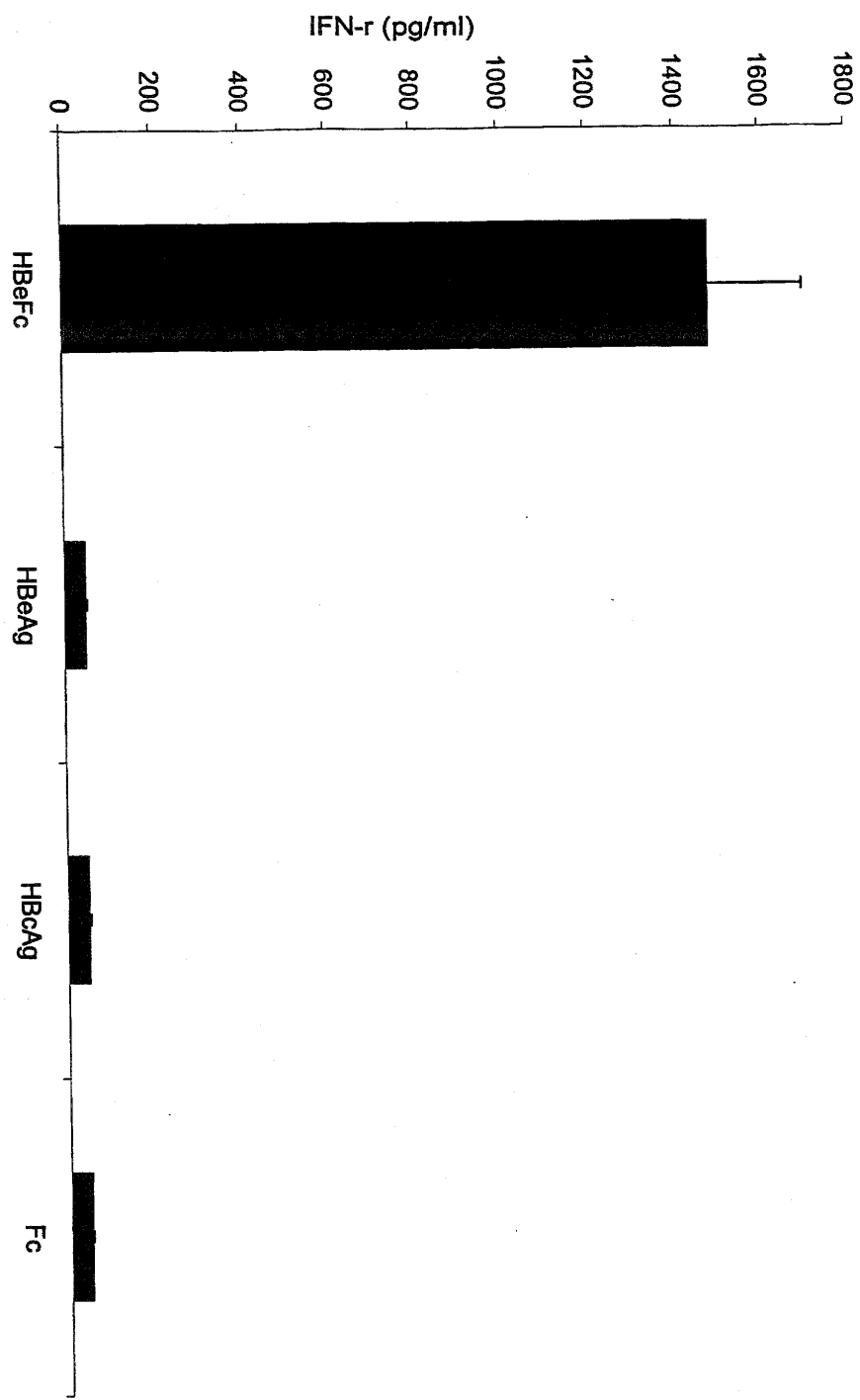
도면19B



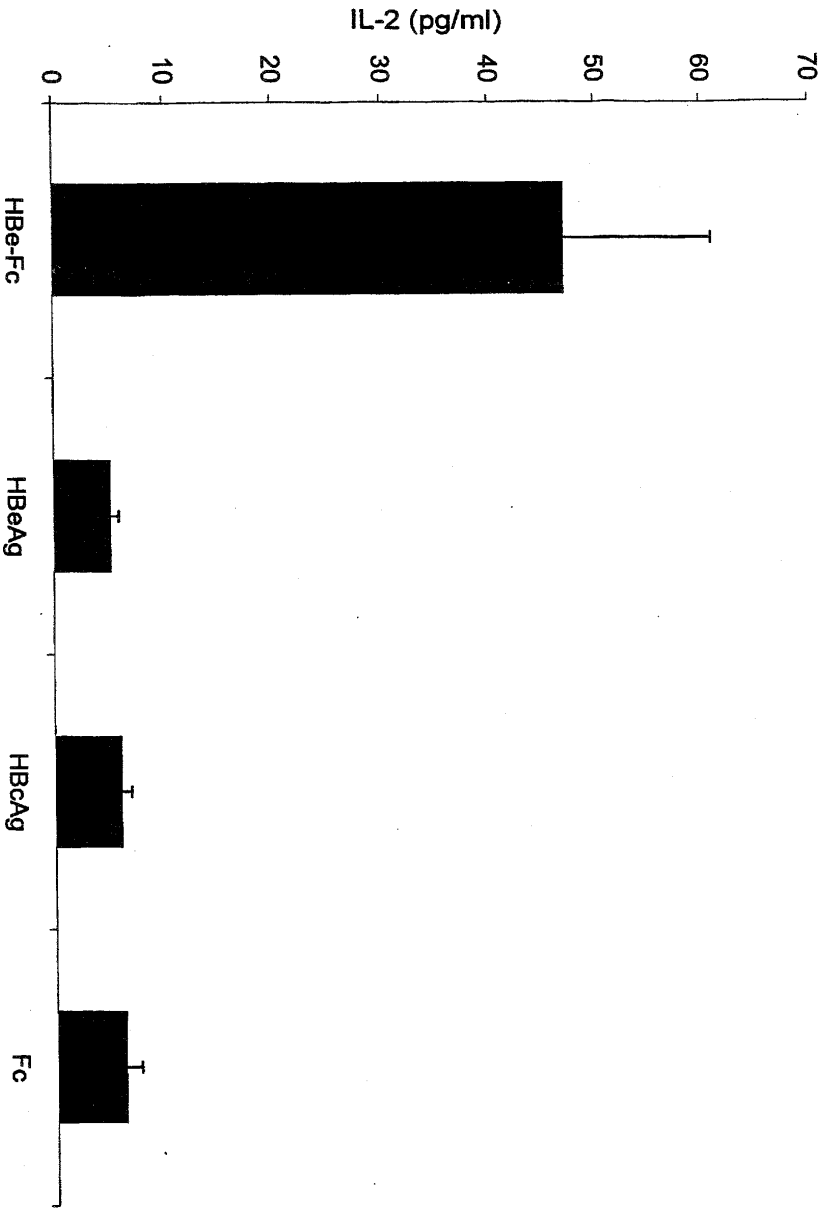
도면20



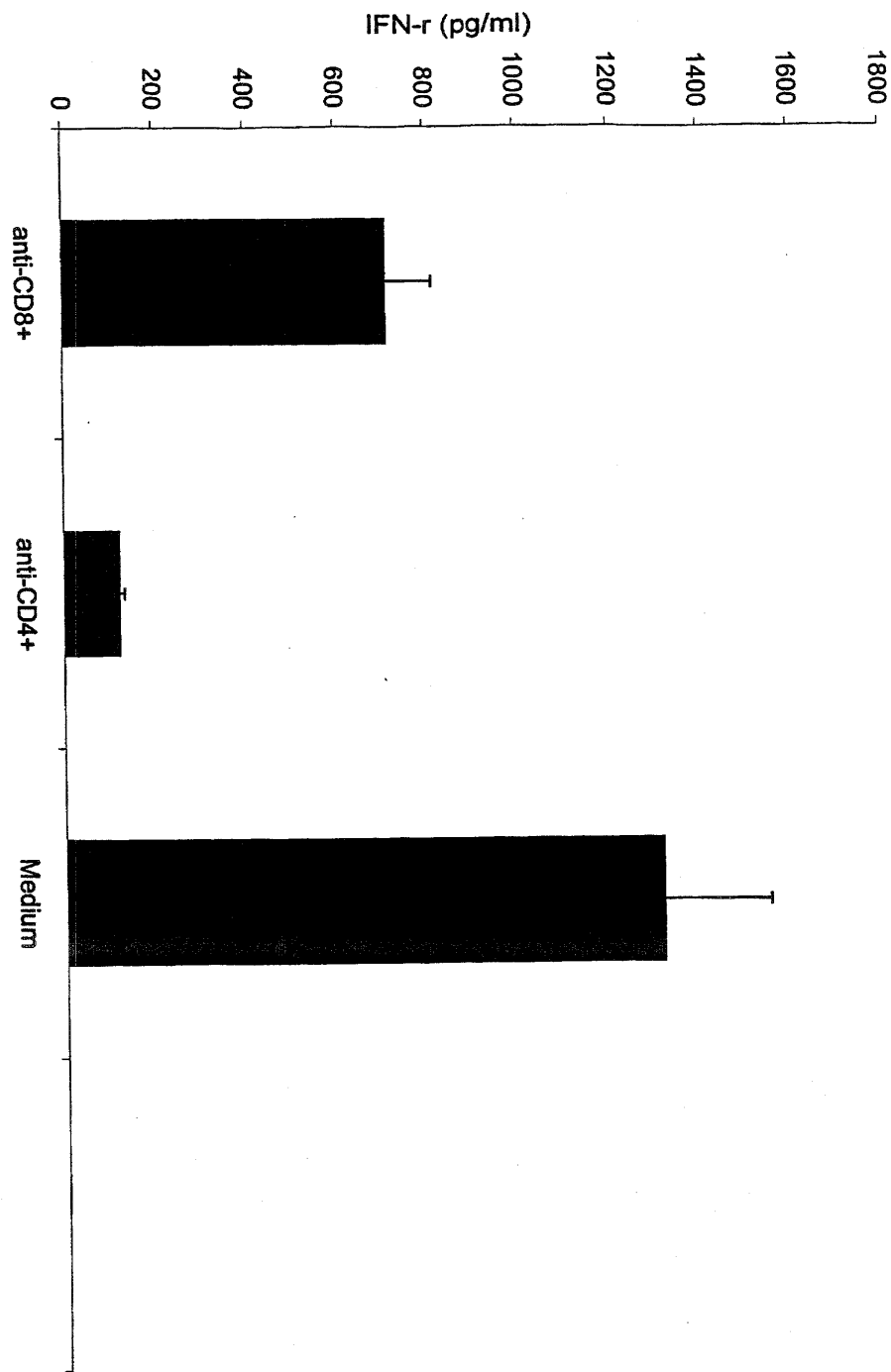
도면21A



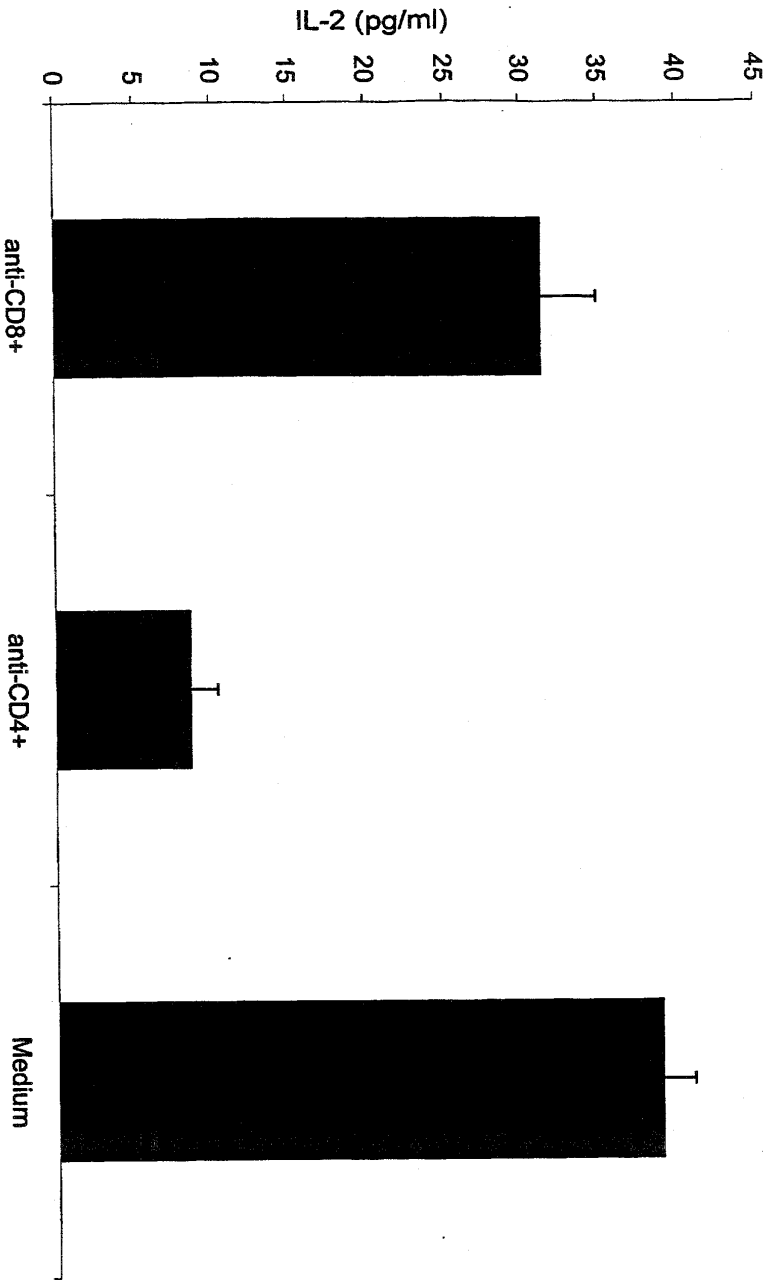
도면21B



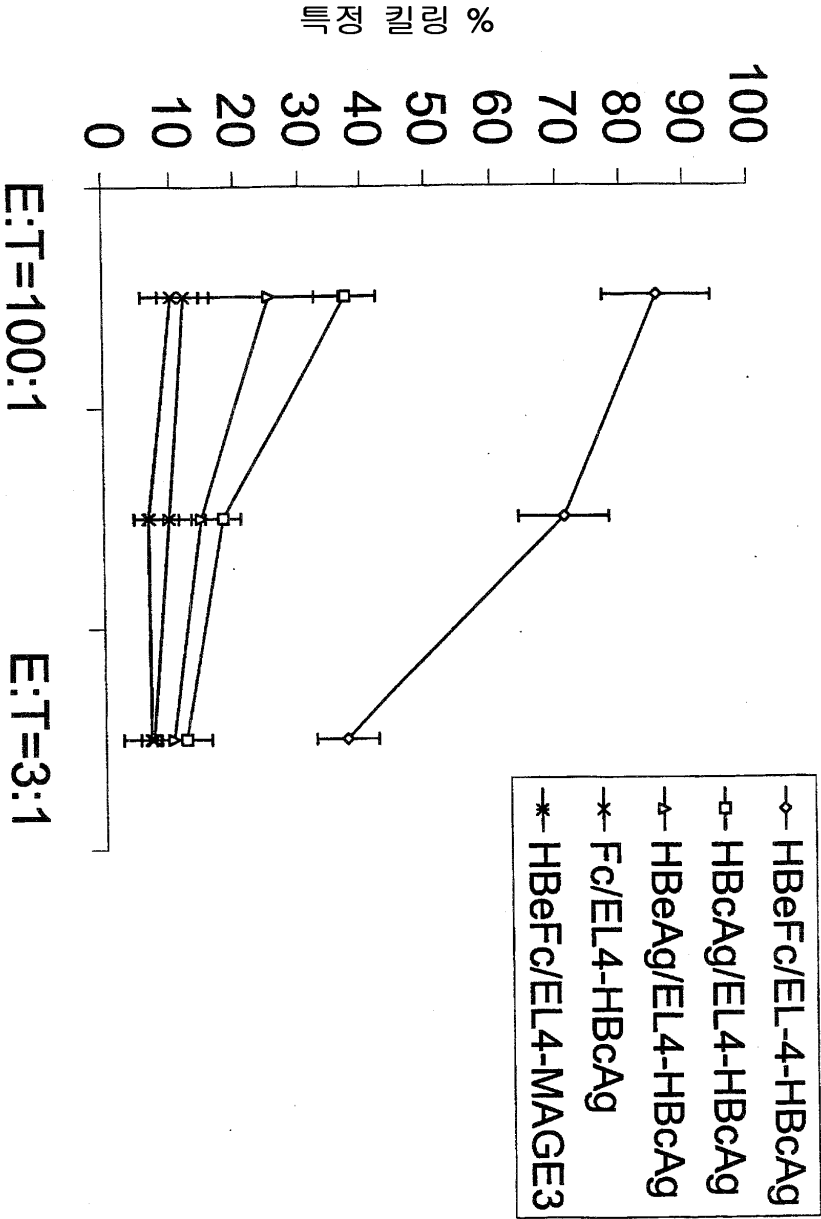
도면21C



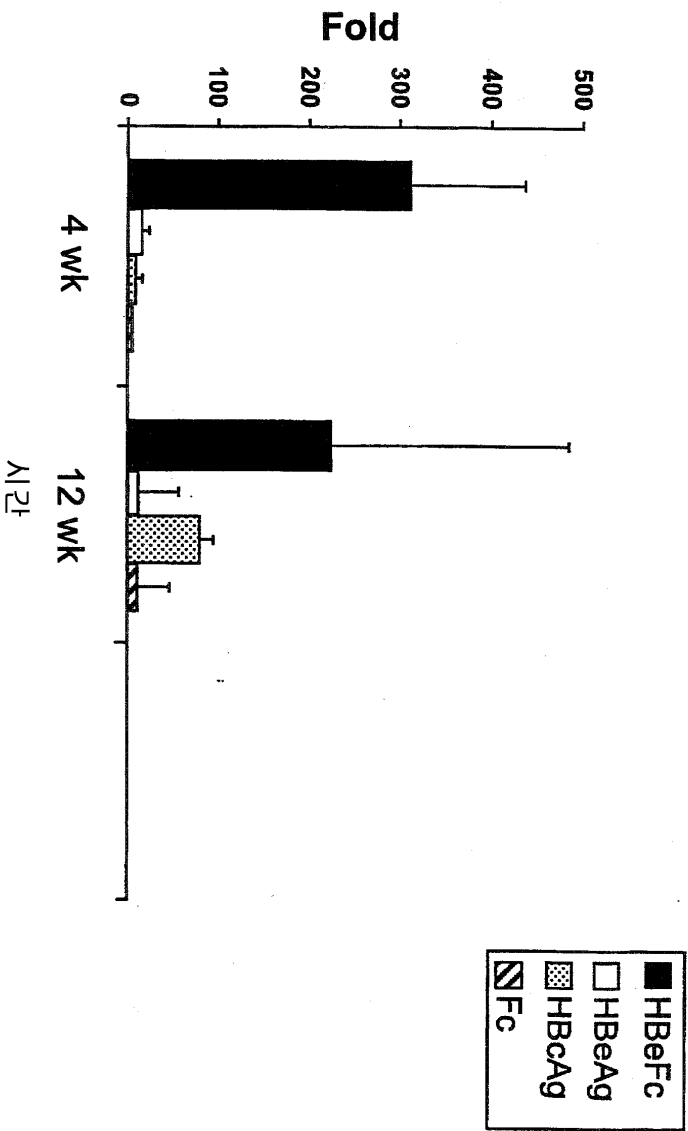
도면21D



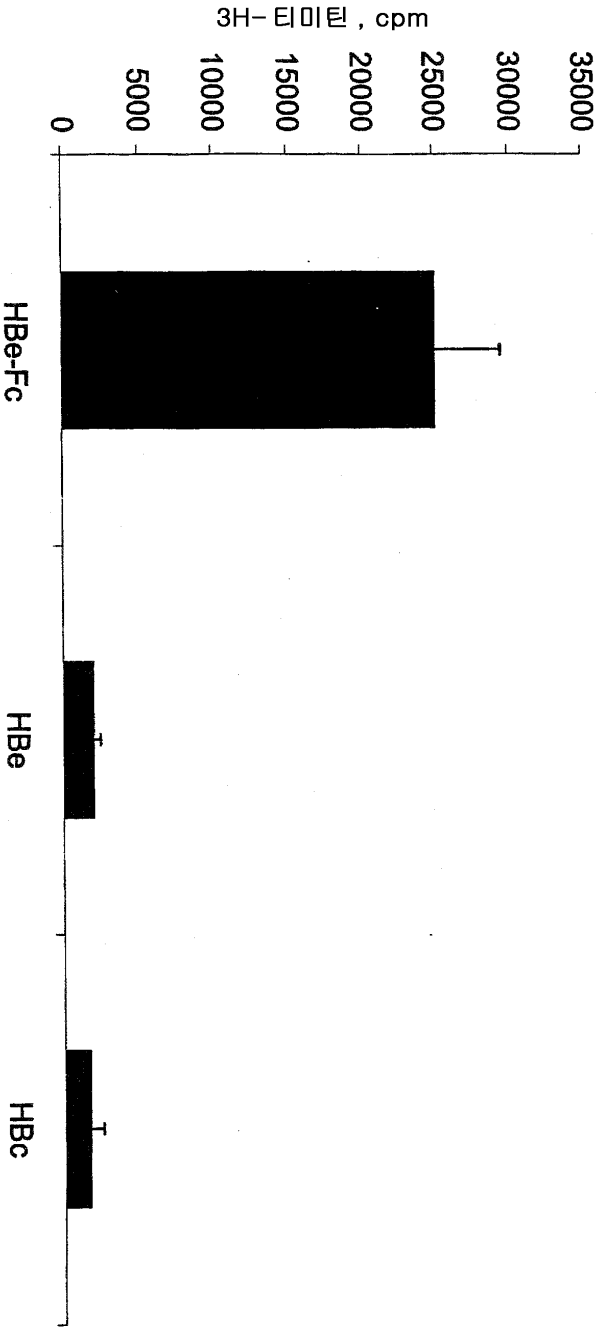
도면22



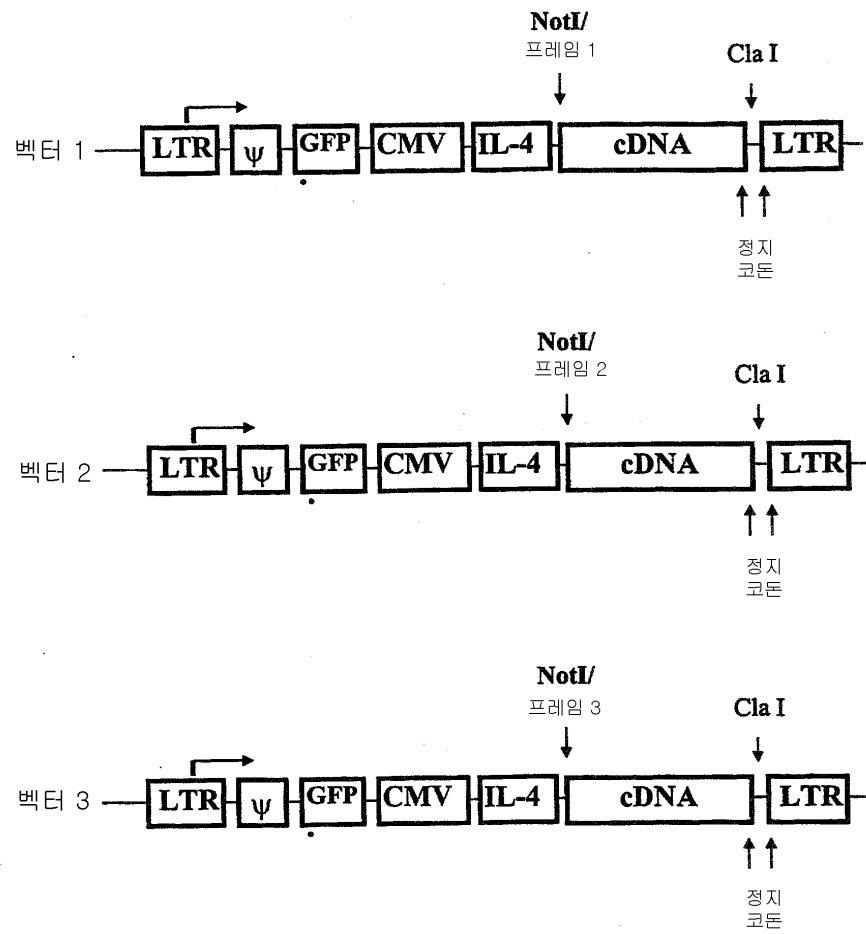
도면23



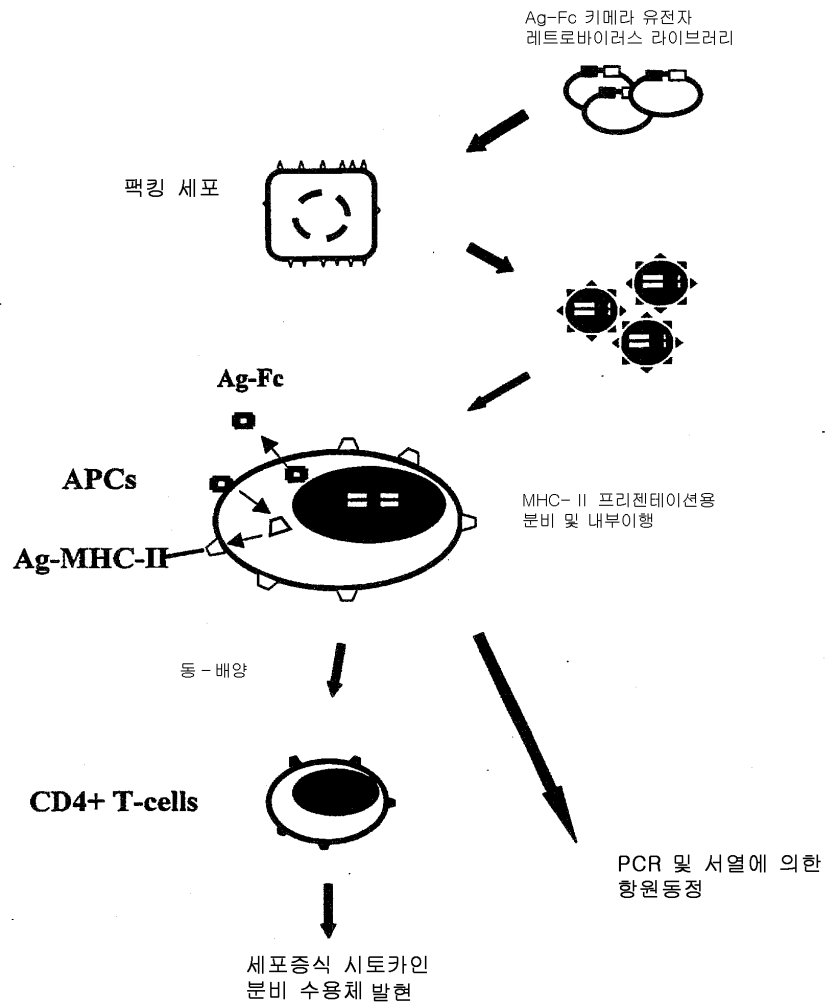
도면24



도면25



도면26



서열 목록

- <110> WAKE FOREST UNIVERSITY
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR IDENTIFYING ANTIGENS WHICH ELICIT AN IMMUNE RESPONSE
- <150> US60/132,752
- <151> 1999-05-06
- <150> US60/132,750
- <151> 1999-05-06
- <160> 19

<170>	Kopatent In 1.71	
<210>	1	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
	acgcgtcgac atgcctcttg agcagaggag tcag	34
<210>	2	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	ccgctcgagt cactcttccc cctctctcaa aac	33
<210>	3	
<211>	103	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	3	
	acgcgtcgac atgaaggctt ccgcggcagc cctcgctgtc atctcattg ctactgccct	60
	ctgcgctcct gcatctgcca tgcctcttga gcagaggagt cag	103
<210>	4	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	
	ataagaatgc ggccgctctc ttccccctct ctcaaaac	38
<210>	5	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	5	
	ataagcggcc gctaaaaactc acacatgccc a	31

<210>	6	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	6	
	ccgctcgagt catttaccg gagacaggga gag	33
<210>	7	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	7	
	gcagctccca gatgggtcct gtccaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcac	55
<210>	8	
<211>	68	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	8	
	acgcgtcgac atgggaacat ctgtggttct tccttctcct ggtggcagct cccagatggg	60
	tcctgtcc	68
<210>	9	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Hepatitis B virus	
<400>	9	
	ttaagcttat gcaacttttt cacctctgcc taatc	35
<210>	10	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Hepatitis B virus	
<400>	10	
	tttctagaat cgattaacat tgagattccc gaga	34
<210>	11	

<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Hepatitis B virus	
<400>	11	
	gtgcggccgc tctaacaaca gtagtttccg gaagtgt	37
<210>	12	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Hepatitis B virus	
<400>	12	
	ttaagcttat ggacattgac cttataaag aatttgagc	40
<210>	13	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	13	
	ataagcggcc gctaaaactc acacatgccc a	31
<210>	14	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	14	
	tattctagat cgatcactca tttaccgga gacagg	36
<210>	15	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens (first 30)/Murine (last 25)	
<400>	15	
	gcagctccca gatgggtcct gtccaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcac	55
<210>	16	
<211>	69	
<212>	DNA	

<213> Murine

<400> 16
ttaaagcttca tatgggaaca tctgtgggttc ttccttctcc tgggtggcagc tcccagatgg 60
gtcctgtcc 69

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 17
gatcgaattc atgcaacttt ttcacctctg c 31

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18
gatcaagctt tcattttacc ggagacaggg a 31

<210> 19

<211> 98

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type E7

<400> 19
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu
Gln Leu Ser Asp Ser Ser
20 25 30
Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60
Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80
Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95
Lys Pro