

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 48/00

(11) 공개번호 특1999-014875
(43) 공개일자 1999년02월25일

(21) 출원번호	특1997-708220	(87) 국제공개번호	WO 96/036366
(22) 출원일자	1997년11월17일	(87) 국제공개일자	1996년11월21일
번역문제출일자	1997년11월17일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 96/007432		
(86) 국제출원출원일자	1996년05월20일		
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이 잔 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 리히텐슈타 인 중국 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지 야 헝가리 아이슬란드 일본 케냐 키르기스스탄 북한 대한민국 카자 흐스탄 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽골 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질 랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니 다도바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포 르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르		
(30) 우선권 주장	8/446,918 1995년05월18일 미국(US)		
	8/580,806 1995년12월29일 미국(US)		
(71) 출원인	내셔널주이쉬센터포이유날러지앤드레스프러토리에디슨 크래포 제임스 디		
	미국 콜로라도 80206 덴버 잭슨 스트리트 1400		
(72) 발명자	다우스티브더블유		
	미국 콜로라도 80210 덴버 사우스 바인 스트리트 2835		
	엘므슬리로빈이		
	미국 콜로라도 80210 덴버 사우스 바일 스트리트 2835		
	포터테런스에이		
	미국 콜로라도 80220 덴버 크라메리아 스트리트 122		
(74) 대리인	원석희, 박해천		

심사청구 : 없음

(54) 주효세포 조절을 위한 유전자 요법

요약

본 발명은 동물체내의 T 세포, 대식세포, 단핵세포 및/또는 천연 킬러세포를 포함한 주효세포의 활성을 억제함으로써 질병을 앓고 있는 동물을 치료하는 핵산-기반 치료조성물을 제공한다. 본 발명의 치료조성물은 치료될 질병에 따라 사이토킨-암호화 핵산분자 및/또는 케모킨-암호화 핵산분자의 존재 또는 부재하에 슈퍼항원-암호화 핵산분자를 포함한다. 또한, 본 발명은 핵산-기반 백신에 사용되는 부형제에 관한 것이다. 본 발명의 부형제 조성물은 사이토킨-암호화 핵산분자 및/또는 케모킨-암호화 핵산분자의 존재 또는 부재하에 슈퍼항원-암호화 핵산분자와 배합된 면역원을 포함한다.

명세서

기술분야

본 발명은 사이토킨 및/또는 케모킨 유전자의 존재 또는 부재하에 슈퍼항원 유전자를 제공함으로써 T 세포 활성을 조절하는 물질 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 사이토킨 및/또는 케모킨 유전자의 존재 또는 부재하에 펩타이드 및 슈퍼항원 유전자를 제공함으로써 T 세포 활성을 조절하는 물질 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 종양 발생, 감염 질환에 대한 면역 반응 및 면역 이상에 의해 유발된 질병을 억제하는 물질 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

질병의 두 가지 주요 원인은 동물의 정상적인 생물학적 기능과 연관된 병원균 및 기능부전을 들 수 있다.

병원균의 예로는 바이러스, 세균, 기생충, 효모 및 기타 진균이 포함된다. 비정상적인 생물학적 기능의 예로는 제어되지 않은 세포 성장, 비정상적인 면역 반응 및 비정상적인 염증 반응이 포함된다. 동물을 질병으로부터 보호하기 위한 시도로서 사용된 전통적인 제제로는 탈조절된 생물학적 기능과 연루된 병원균 또는 세포를 파괴하는 제제가 포함된다. 그러나, 이와 같은 제제는 원치 않는 부작용을 낳을 수 있다. 예를 들면, 바이러스 DNA의 복제를 차단하는 항-바이러스 약물은 흔히 치료 받는 환자의 정상적인 세포에서의 DNA 복제도 차단한다. 암 세포를 파괴하기 위한 화학요법 제제를 이용한 치료는 전형적으로 출혈, 구토, 설사, 궤양, 탈모 및 이차 암 및 감염에 증가된 민감성과 같은 부작용을 유발한다.

질병 치료의 또 다른 방법은 환자의 면역 체계를 조절하여 환자의 고유 방어 기작을 보조하는 것을 들 수 있다. 환자의 면역 반응을 조절하기 위한 시도로서 사용된 전통적인 제제 및 방법도 또한 원치 않는 부작용을 낳고 한정된 효능을 나타낸다. 예를 들면, 자가면역 질병을 앓고 있는 환자를 치료하기 위해 사용된 면역억제제 (예, 사이클로스포린 A, 아자티오프린 및 프레드니손)는 또한 환자의 전체 면역 반응을 억제하여 그럼으로써 감염의 위험을 증가시킨다. 또한, 암을 치료하는데 사용된 면역억제제 (예, 인터루킨)는 환자의 순환계에서 수명이 짧고 다량으로 복용하지 않고는 비효과적이다. 면역 조절의 의학적 중요성 및 현존하는 면역억제제의 부적합성 때문에 면역체계의 특정 부분을 조절하는 제제 및 방법이 수년동안에 걸쳐 연구의 대상이 되어왔다.

환자의 면역 반응을 자극하거나 억제하는 것은 여러 종류의 의학적 이상의 효과적인 치료법이 될 수 있다. T 림프구 (T 세포)는 면역 반응에 연루된 여러 가지의 특정 세포 유형중의 하나이다. T 세포의 활성화는 주조직적합복합체(MHC) 분자의 관계에 있어서 T 세포에 제공된 항원에 의해 조절된다. 그런 다음, T 세포 수용체(TCR)는 MHC:항원 복합체와 결합한다. 일단 항원이 MHC와 복합체를 형성하면, MHC:항원 복합체는 T 세포상의 특정 TCR에 의해 결합되며 그럼으로써 T 세포의 활성을 변경한다.

MHC 분자와 복합하여 T 세포 기능에 영향을 미칠 수 있는 특정 스태필로코커스 내독소 단백질의 사용이 여러 연구자에 의해 제안되어 왔다. 연구자의 예로는 White 등 (Cell 56: 27-35, 1989), Rellahan 등 (J. Expt. Med. 172: 1091-1100, 1990), Micusan 등 (Immunology 5: 3-11, 1993), Hermann 등 (Immunology 5: 33-39, 1993), Bhardwaj 등 (J. Expt. Med. 178: 633-642, 1993) 및 Kalland 등 (Med. Oncol. Tumor Pharmacother., 10: 37-47, 1993)을 들 수 있다. 특히, 많은 연구자들이 스태필로코커스 내독소 단백질은 종양의 치료에 유용한 것으로 제안해왔다. 이들 연구자들의 예로는 Newell 등 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1074-1078, 1991), Kalland 등 (1991년 4월 4일에 공개된 국제특허출원 제W091/04053호), Dohlstein 등 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9287-9291, 1991), Hedlund 등 (Cancer Immunol. Immunother. 36: 89-93, 1993), Lando 등 (Cancer Immunol. Immunother. 36: 223-228, 1993), Lukacs 등 (J. Exp. Med. 178: 343-348, 1993), Ochi 등 (J. Immunol. 151: 3180-3186, 1993) 및 Terman 등 (1993년 12월 9일 공개된 국제특허출원 제W093/24136호)을 들 수 있다. 그러나, 이들 연구자들은 단지 세균 내독소 단백질 자체의 사용만을 제시하였다. 세균 내독소 단백질의 사용은 단백질의 수혜자에게 독성을 나타내는 커다란 단점을 지니고 있다.

따라서, 세균 내독소를 무독성 방식으로 사용하여 질병을 치료해 줄 수 있는 물질 및 방법이 필요하다.

발명의 요약

암, 감염질환 및 면역이상에 의해 발생한 질병을 치료하는데 사용된 전통적인 약제는 흔히 해로운 부작용을 낳는다. 예를 들면, 화학요법 및 방사선요법은 흔히 암 조직을 치료하는 과정동안에 광범위하게 정상 조직에 손상을 입힐 수 있다. 또한, 감염 질환의 예방 또는 치료를 위한 백신 요법은 이에 유용한 부형제가 동물에 독성을 나타내기 때문에 자주 비효과적으로 나타난다.

본 발명은 잠재적으로 독성을 나타내는 면역원성 단백질인 제제로 동물의 안전한 치료를 가능케 하는 유효한 치료 조성물을 제공한다는 점에서 특히 유리하다. 본 발명의 치료 조성물은 전달되었을 때 그 조성물에 함유된 핵산 분자가 발현되어 그 결과로서 유효하고 무독성인 양의 암호화된 단백질이 국부적으로 생성된다. 여기서의 생성 양은 암호화된 단백질이 직접 투여된 경우 요구되는 농도이다. 그러나, 암호화된 단백질이 직접투여되는 경우 독성을 나타낼 수 있는 것이다. 본 발명의 치료 조성물은 동물의 한 부위에서 암호화된 단백질의 장기간 발현을 제공할 수 있다. 이와 같은 장기간 발현은 동물을 치료하는데 유효하지만 무독성인 용량의 암호화된 단백질을 유지할 수 있도록 해주며 동물을 치료하는데 필요한 치료 조성물의 투여 횟수를 제한한다. 또한, 본 발명의 치료 조성물은 독성을 나타내지 않기 때문에 반복 치료에 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 주요 세포 활성을 억제하는 신규한 물질 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 면역반응을 강화하는데 유용한 신규한 부형제에 관한 것이다. 슈퍼항원 단백질이 아닌 슈퍼항원을 암호화한 핵산 분자를 함유한 조성물이 질병을 치료하는데 효과적인 치료제이며 면역반응을 강화하는데 효과적인 부형제임이 본 발명에 이르러 최초로 발견되었다. 본원에서 사용된 용어 질병은 대상자에게 이롭지 않은 모든 생물학적 비정상상을 의미한다. 또한 본 발명자들은 (1) 슈퍼항원, (2) 슈퍼항원과 사이토킨 또는 (3) 슈퍼항원과 케모킨을 암호화한 핵산 분자의 배합물을 투여하였을 때 종양 및 감염질환을 상승효과적으로 유효하게 치료할 수 있음을 발견하였다. 본 발명은 (a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 또는 (b) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자를 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산 분자 및/또는 케모킨을 암호화한 분리된 핵산 분자와 배합하여 함유한 치료 조성물을 포함한다. 본 발명의 치료조성물을 동물에 투여하면 그 결과 본원에서 암호화된 단백질로서 지칭되는 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨이 생성된다. 본 발명의 치료 조성물의 개개 성분은 이하에 상세히 기술될 것이며 그 이후로 본 발명의 치료조성물을 사용하고 전달하는 방법이 기술될 것이다.

본 발명의 한 가지 양태는 동물에 주요세포 면역성을 증가시키는 방법을 포함하며 이 방법은 (a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 또는 (b) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자를 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산 분자 및/또는 케모킨을 암호화한 분리된 핵산 분자와 배합하여 함유한 유효량의 치료조성물을 동물에 투여함을 특징으로 한다. 이러한 본 발명의 양태에 따르면, 핵산 분자는 하나 이상의 전사조절

서열에 작동적으로 연결되며 치료조성물은 비정상 세포를 함유한 동물의 한 부위에 겨냥된다. 본 발명에 따르면 주효세포는 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 대식세포, 단핵세포 및/또는 천연 킬러세포를 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 방법은 비정상 세포 또는 병원체로부터 유도된 항원이 동물체내에 출현했을 때 사멸시키거나 사이토킨 또는 케모킨을 분비할 수 있는 주효세포의 수를 증가시키기 위해 수행될 수 있다. 본 발명에 따른 치료 조성물의 유효량은 본원에 기술된 질병을 치료할 수 있는 양을 포함한다. 또 다르게는 본 발명의 방법은 자가항원에 의해 우선적으로 자극되고 팽창되는 T 세포 서브세트에서 발견되는 T 세포의 수를 감소시키기 위해 수행될 수 있다.

본원에 사용된 용어 주효세포 면역성은 비정상 세포의 부위에 주효세포의 수 및/또는 활성을 증가시키는 것을 가리킨다. 특히, T 세포 활성은 비정상 세포의 부위에 T 세포의 수 및/또는 활성을 증가시키는 것을 가리킨다. 또한, 본원에 사용된 용어 비정상 세포는 비정상 성장, 발생 또는 치사와 같은 비정상적인 생물학적 기능을 나타내는 세포를 지칭한다. 본 발명의 비정상적인 세포는 바람직하게는 암세포, 감염균(즉, 병원체)로 감염된 세포 및 비정상적인 증식 성장을 나타내는 비암성세포(예, 유육종증, 육아종질병 또는 유두종) 및 암세포 및 감염세포로 감염된 세포를 포함한다. 본 발명의 다른 양태는 암을 앓고 있는 동물을 치료하는 방법인데, 이 방법은 (a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 또는 (b) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자를 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산 분자와 배합하여 함유한 유효량의 치료 조성물을 동물에 투여함을 특징으로 한다. 이러한 본 발명의 양태에 따르면, 핵산 분자는 하나 이상의 전사조절서열에 작동적으로 연결되며 치료조성물은 암세포 부위에 겨냥된다.

본 발명에 따른 치료 조성물의 한가지 양태는 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자(또한, 본원에서 슈퍼항원-암호화 핵산 분자로도 지칭된다)를 포함한다. 본 발명에 따른 치료조성물의 다른 양태는 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산 분자(또한, 본원에서 사이토킨-암호화 핵산 분자로도 지칭된다) 및/또는 케모킨을 암호화한 분리된 핵산 분자(또한, 본원에서 케모킨-암호화 핵산 분자로도 지칭된다)와 배합되어 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자를 포함한다. 이들 양태에 따르면, 핵산 분자는 하나 이상의 전사조절서열에 작동적으로 연결된다. 본원에서는 화합물을 단수로 지칭하지만 이는 하나 이상의 복수 화합물을 언급하는 것이다. 본 발명에 따르면, 분리된 또는 생물학적으로 순수한 핵산 분자는 이의 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자이다. 그러므로, 분리된 및 생물학적으로 순수한 핵산 분자가 정제된 정도를 반드시 반영하는 것은 아니다. 분리된 핵산 분자는 DNA, RNA 또는 이들 각각의 유도체를 포함할 수 있다. 분리된 슈퍼항원 또는 사이토킨 핵산 분자는 이의 천연 공급원으로부터 전체(즉, 완전한) 유전자로서 또는 MHC 분자에 결합할 수 있는 슈퍼항원 단백질 또는 상보적인 사이토킨 수용체에 결합할 수 있는 사이토킨 단백질을 암호화할 수 있는 유전자의 일부분으로서 수득될 수 있다. 핵산 분자는 또한 재조합 기술(예, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 클로닝) 또는 화학합성을 이용하여 생성될 수 있다. 핵산 분자는 천연 핵산 분자 및 이의 동족체를 포함한다. 동족체에는 이들로 한정되는 것은 아니지만 천연 대립 변이체 및 변형된 핵산 분자가 포함된다. 변형된 핵산 분자는 뉴클레오타이드가 삽입, 결실, 치환 및/또는 역위된 것으로 그러나 이러한 변형이 본 발명의 작용성 슈퍼항원 또는 작용성 사이토킨을 암호화하는 핵산 분자의 능력을 실질적으로 저해하지 않는 정도에 있는 것이다.

핵산 분자 동족체는 본 분야 전문가에 알려져 있는 많은 방법을 사용하여 제조할 수 있다(참조예: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). 예를 들면, 이들로 한정되는 것은 아니지만 고전적인 돌연변이 기술 및 재조합 DNA 기술, 예컨대 부위-유도된 돌연변이법, 핵산의 화학적 처리에 의한 돌연변이, 핵산 단편의 제한 효소 절단, 핵산 단편의 연결, 중합효소 연쇄 반응 증폭 및/또는 핵산 서열의 선택된 영역의 돌연변이화의 유도, 올리고뉴클레오타이드 혼합물의 합성 및 혼합물 그룹을 연결하여 핵산 분자의 혼합물 및 이들의 조합물을 작제하는 것을 포함한 여러가지 기술을 이용하여 핵산 분자를 변형할 수 있다. 핵산 분자 동족체는 핵산에 의해 암호화된 단백질의 작용(예, 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨 활성)에 대해 스크리닝함으로써 변형된 핵산의 혼합물로부터 선택될 수 있다. 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨 활성에 대한 스크리닝 기술은 본 분야의 전문가에게는 잘 알려져 있다.

비록 핵산 분자라는 용어는 주로 물리적인 핵산 분자를 지칭하고 핵산 서열이라는 용어는 주로 핵산분자를 구성하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭하지만, 이들 두 용어는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 특히 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨 단백질을 암호화한 핵산 분자 또는 핵산 서열에 대하여 그러하다. 또한, 재조합 분자라는 용어는 일차적으로 전사조절서열에 작동적으로 연결된 핵산 분자를 지칭하지만 동물에 투여되는 핵산 분자라는 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 지금까지 기재된 본 발명의 슈퍼항원 또는 사이토킨 단백질은 이들로 한정되는 것은 아니지만 완전한 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨 암호화 영역, MHC 분자에 결합할 수 있는 부분적인 슈퍼 영역을 가진 단백질, 상보적인 사이토킨 수용체에 결합할 수 있는 사이토킨 암호화 영역, 상보적인 케모킨 수용체에 결합할 수 있는 케모킨 암호화 영역, 상이한 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨의 조합물을 포함한 융합단백질 및 키메라 단백질을 포함한다.

본 발명의 한가지 양태는 완전한 슈퍼항원의 적어도 일부분 또는 슈퍼항원의 동족체를 암호화한 분리된 슈퍼항원-암호화 핵산 분자이다. 본원에 사용된 용어 슈퍼항원의 적어도 일부분이란 TCR이 생성된 슈퍼항원:MHC 복합체에 결합할 수 있도록 하는 양상으로 MHC 분자에 결합할 수 있는 슈퍼항원 단백질의 일부분을 지칭한다. 바람직하게는, 본 발명의 슈퍼항원 핵산분자는 슈퍼항원의 전체 암호영역을 암호화한 것이다. 더욱 바람직하게는 리더 서열이 없는 암호영역을 암호화한 것이다. 세균성 리더 서열이 없는 펩타이드 슈퍼항원의 생산은 세포로부터 슈퍼항원의 분비를 강화하는데 바람직하다. 본원에 사용된 슈퍼항원의 동족체는 이 동족체를 암호화한 핵산 서열이 MHC 분자에 결합할 수 있는 단백질을 암호화하기에 충분하게 천연 슈퍼항원 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질이다.

본 발명에 따르면, 슈퍼항원은 MHC 분자에 결합할 수 있는 한 부류의 T 세포 조절 단백질을 포함한다. 슈퍼항원은 MHC 분자의 세포외 일부분과 결합하여 MHC:슈퍼항원 복합체를 형성한다. T 세포의 활성은 TCR이 MHC:슈퍼항원 복합체에 결합할 때 변형될 수 있다. 특정 상황에서 MHC:슈퍼항원 복합체는 유사분열 역할(즉, T 세포의 증식을 자극하는 능력) 또는 억제 역할(즉, T 세포 서브세트의 결실)을 할 수 있다. MHC:슈퍼항원 복합체가 자극 또는 억제 역할을 하는 능력은 농도 및 환경(즉, 조직 위치 및/또는 사이토킨의 존재)과 같은 요인에 의해 결정될 수 있다.

슈퍼항원의 유사분열 역할은 슈퍼항원이 이와 특이적으로 결합하는 TCR을 갖는 T 세포의 특별한 서브세트의 증식을 자극할 수 있다는 점에서 다른 공지된 미토겐 (예, 식물로부터 유도된 렉틴)과 구분된다. 예를 들면, 슈퍼항원은 혼합된 림프구군에 첨가되었을 때 혼합된 세포군으로부터 선택된 T 세포군의 증식을 자극할 수 있다. MHC 분자와 복합된 슈퍼항원에 의해 자극된 T 세포 서브세트의 예로는 마우스

V1, V3, V7, V8.1, V8.2, V8.3, V10, V11, V17, V15,

또

V16

는 새를 포함한 TCR을 발현하는 T 세포 또는 사람

V1.1, V2, V3, V5, V6, V7.3, V7.4, V9.1, V12, V14, V15, V17

또

V20

는 새를 포함한 TCR을 발현하는 T 세포를 포함한다.

본 발명의 슈퍼항원-암호화 핵산 분자는 바람직하게는 이들로 한정되는 것은 아니지만 스타필로코커스 내독소, 레트로바이러스 항원, 스트렙토코커스 항원, 마이코플라스마 항원, 마이코박테리아 항원, 바이러스 항원 (예, 마우스 유방 종양 바이러스, 레비즈 바이러스 또는 헤르페스 바이러스) 및 엔도기생충 항원 (예, 원생동물 또는 장내기생충 항원)을 포함한 슈퍼항원을 암호화한다. 더욱 바람직한 것은 스타필로코커스 내독소이며 가장 바람직한 것은 스타필로코커스 내독소 A (SEA), 스타필로코커스 내독소 B (SEB), 스타필로코커스 내독소 C₁ (SEC₁), 스타필로코커스 내독소 C₂ (SEC₂), 스타필로코커스 내독소 C₃ (SEC₃), 스타필로코커스 내독소 D (SED), 스타필로코커스 내독소 E (SEE) 및 독성 쇼크 증후군 독소 (TSST)이다.

본 발명의 스타필로코커스 내독소를 암호화한 바람직한 핵산은 서열분석번호1 (완전한 SEB 유전자), 서열분석번호3 (완전한 SEA 유전자) 또는 서열분석번호6 (완전한 TSST 유전자)로 나타나는 핵산서열을 포함한다. 본 발명의 바람직한 스타필로코커스 내독소 단백질은 서열분석번호2 (완전한 SEB 단백질), 서열분석번호4 (완전한 SEA 단백질) 또는 서열분석번호7 (완전한 TSST 단백질)로 나타나는 아미노산서열을 포함한다.

바람직한 양태로서 슈퍼항원을 암호화한 본 발명의 핵산서열은 서열분석번호1의 염기쌍 46 내지 적어도 염기쌍 768에 해당하는 핵산서열 또는 서열분석번호3 또는 서열분석번호6의 염기쌍 46 내지 약 염기쌍 751에 해당하는 핵산서열을 포함한다.

본 발명의 또 다른 양태는 완전한 사이토킨 또는 사이토킨 단백질의 동족체를 암호화한 사이토킨-암호화 핵산 분자를 포함한다. 본원에 사용된 사이토킨의 동족체는 사이토킨 활성을 갖도록 천연 사이토킨 아미노산 서열과 충분히 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. 본 발명에 따르면, 사이토킨은 다른 세포의 생물학적 기능에 영향을 미칠 수 있는 단백질을 포함한다. 사이토킨에 의해 영향을 받는 생물학적 기능은 이들로 한정되는 것은 아니지만 세포 성장, 세포 분화 또는 세포 치사를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 사이토킨은 세포의 표면상의 특정 수용체와 결합할 수 있으며 그럼으로써 세포의 생물학적 기능에 영향을 미치는 것이다.

본 발명의 사이토킨-암호화 핵산 분자는 이들로 한정되는 것은 아니지만 림프구, 근육세포, 조혈전구세포, 비만세포, 천연킬러세포, 대식세포, 단핵세포, 상피세포, 내피세포, 수지상세포, 간엽세포, 랑게르한스세포, 육아종에서 발견된 세포 및 모든 세포기원의 종양세포, 보다 바람직하게는 간엽세포, 상피세포, 내피세포, 근육세포, 대식세포, 단핵세포, T 세포 및 수지상세포의 생물학적 기능에 영향을 미칠 수 있는 사이토킨을 암호화한다.

본 발명의 바람직한 사이토킨 핵산분자는 조혈세포 성장인자, 인터루킨, 인터페론, 면역글로불린 과부류 분자, 종양괴사인자 부류분자 및/또는 케모킨 (즉, 세포, 특히 식세포의 이동 및 활성화를 조절하는 단백질)을 암호화한다. 본 발명의 보다 바람직한 사이토킨 핵산분자는 과립구대식세포 콜로니 자극인자(GM-

CSF), 종양괴사인자 (TNF-), 대식세포 콜로니 자극인자(M-CSF), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-15(IL-15) 및/또는 IGIF를 암호화한

다. 훨씬 더 바람직한 본 발명의 사이토킨 핵산 분자는 GM-CSF, IL-2, IL-12, IGIF 및/또는 TNF- 이며, 가장 바람직한 것은 GM-CSF이다.

본 분야의 전문가라면 명백히 인식할 수 있듯이, 본 발명은 모든 유형의 동물로부터 유도된 사이토킨에 적용될 수 있다. 사이토킨을 유도하기 위한 바람직한 동물은 마우스, 사람, 고양이 및 개가 포함된다. 사이토킨을 유도하기 위한 보다 더 바람직한 동물은 고양이, 개 및 사람이 포함된다. 사이토킨을 유도하기 위한 훨씬 더 바람직한 동물은 사람이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 사이토킨-암호화 핵산 분자는 치료받을 동물과 동일한 종의 동물로부터 유도된다. 예를 들면, 개의 핵산분자로부터 유도된 사이토킨-암호화 핵산분자는 개의 질병을 치료하는데 사용한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 사이토킨-암호화 핵산분자는 공지된 사람 GM-CSF를 암호화한 핵산분

자를 포함한다. 본 발명의 사람 GM-CSF-암호화 핵산분자는 Nash (Blood 78:930, 1991)에 기재된 사람 GM-CSF 핵산서열로부터 디자인된 프라이머로 표준 PCR 증폭방법을 수행하여 제조할 수 있다. 이러한 PCR 산물은 실시예1에 전반적으로 기술된 방법을 이용하여 PCR₃ 발현벡터내로 클로닝할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태는 완전한 케모킨 또는 케모킨 단백질의 동족체를 암호화한 케모킨-암호화 핵산분자를 포함한다. 본원에 사용된 케모킨의 동족체는 케모킨 활성을 갖도록 천연 케모킨 아미노산 서열과 충분히 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. 본 발명에 따르면, 케모킨은 식세포를 포함하여 면역반응에 연루된 세포 (면역세포)를 유인할 수 있는 단백질을 포함한다. 예를 들면, 면역세포는 혈액으로부터 케모킨이 위치한 부위 (예, 감염부위)로 이동한다. 바람직하게는, 본 발명의 케모킨은 세포표면상의 특정 수용체와 결합할 수 있으며 그럼으로써 세포를 특정위치로 유인한다.

본 발명의 케모킨-암호화 핵산 분자는 이들로 한정되는 것은 수지상세포, 종립구, 대식세포, T 림프구 및 랑게르한스세포, 더욱 바람직하게는 수지상세포, 대식세포 및 T 림프구를 포함한 세포를 부위로 유인할 수 있는 케모킨을 암호화한다.

본 발명의 바람직한 케모킨-암호화 핵산분자는 -케모킨 또는 -케모킨을 암호화한다. 본 발명의 보다 바

람직한 케모킨-암호화 핵산분자는 C5a, 인터루킨-8(IL-8), 단핵세포 주화성 단백질 1 (MIP1), 단핵세포

주화성 단백질 1 (MIP1), 단핵세포 화학유인 단백질 1(MCP-1), 단핵세포 화학유인 단백질 3(MCP-3), 혈소판 활성화 인자(PAFR), N-포르밀-메티오닐-루실-[³H]페닐알라닌(FMLPR), 류코트리엔 B₄(LTB₄R), 가스트린 분비 펩타이드 (GRP), RANTES, 에오타신, 림포타신, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 및/또는 MGSA/gro

를 암호화한다. 본 발명에 따른 바람직한 케모킨 암호화-핵산 분자는 IL-8, MIP1, MIP1, MCP-1, MCP-

3, RANTES 및/또는 NAP-2를 암호화하고, 더욱 바람직하게는 IL-8, RANTES, MIP1 및/또는 MIP1를 암호화한다.

본 분야 전문가에게는 명백한 바와 같이, 본 발명은 모든 유형의 동물로부터 유도된 케모킨에 적용될 수 있다. 케모킨을 유도하는 바람직한 동물은 마우스, 사람, 개, 고양이, 소 및 말이 포함된다. 케모킨을 유도하는 보다 바람직한 동물은 개, 고양이, 사람 및 소가 포함된다. 케모킨을 유도하는 훨씬 더 바람직한 동물은 사람이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 케모킨-암호화 핵산분자는 치료받을 동물과 동일한 종의 동물로부터 유도된다. 예를 들면, 개의 핵산분자로부터 유도된 케모킨-암호화 핵산분자는 개의 질병을 치료하는데 사용한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 케모킨-암호화 핵산분자는 개, 고양이, 사람, 소 및/또는 말 케모

킨을 암호화한 핵산분자를 포함한다. 본 발명의 바람직한 핵산분자는 공지된 IL-8, 란테스, MIP1 및/또

는 MIP1를 암호화한다. 예를 들면, 본 발명의 사람 MIP1-암호화 핵산분자는 공지된 사람 MIP1-암호화 핵산서열로부터 디자인된 프라이머로 표준 PCR 증폭방법을 수행하여 제조할 수 있다. 이러한 PCR 산물은 일반적으로 실시예1에 기술된 방법을 사용하여 PCR₃ 발현벡터내로 클로닝할 수 있다.

본 발명은 하나 이상의 전사 조절 서열과 작동적으로 연결되어 재조합 분자를 형성하는 본 발명의 핵산분자를 포함한다. 용어 작동적으로 연결된이란 핵산분자가 숙주세포내로 형질감염 (즉, 형질전환, 형질유도 또는 형질감염)되었을 때 발현될 수 있도록 한 양상으로 전사 조절 서열에 연결되는 것을 가리킨다. 전사 조절서열은 전사의 개시, 연장 및 종결을 조절하는 서열이다. 특히 중요한 전사조절서열은 프로모터, 인해서, 오퍼레이터 및 리프레서 서열과 같이 전사의 개시를 통제하는 서열이다. 적합한 전사조절서열로서는 본 발명의 재조합 세포중 하나 이상에서 작용할 수 있는 것이라면 어떠한 전사조절서열도 포함된다. 본 분야에는 여러 가지의 전사조절서열이 공지되어 있다. 바람직한 전사조절서열은 동물, 세균, 기생충, 곤충세포, 보다 바람직하게는 동물세포에서 작용하는 것이다. 더욱 바람직한 전사 조절 서열로는 이들로

한정되는 것은 아니지만 시미안 바이러스 40 (SV-40), -악틴, 레트로바이러스 롱 터미널 반복체 (LTR), 로우스 사코마 바이러스 (RSV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), *tac*, *lac*, *trp*, *trc*, *oxy-pro*, *omp/lpp*,

rrnB, 박테리오파아지 람다 () (예, p_L 및 p_R 및 이러한 프로모터를 포함한 융합체), 박테리오파아지 T7, T7/*lac*, 박테리오파아지 T3, 박테리오파아지 SP6, 박테리오파아지 SP01, 메탈로티오네인, 알파 교배 인자, 피키아 알코올 옥시다제, 알파바이러스 서브게놈성 프로모터 (예, 신드비스 바이러스 서브게놈성 프로모터), 백콜로바이러스, 헤리오티스 제아 곤충 바이러스, 백시니아 바이러스 및 기타 폭스바이러스, 헤르페스바이러스, 및 아데노바이러스 전사 조절 서열 뿐만 아니라 기타 진핵 세포에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 서열이 포함된다. 또한 적합한 발현 조절 서열로는 조직-특이성 프로모터 및 인핸서 (예, 종양 세포-특이성 인핸서 및 프로모터), 및 유도성 프로모터 (예, 테트라사이클린)이 포함된다. 본 발명의 전사 조절 서열은 또한 본 발명의 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨을 암호화한 유전자와 천연적으로 연결된 천연 전사 조절 서열을 포함할 수 있다.

DNA 또는 RNA일 수 있는 본 발명의 재조합 분자는 또한 해독 조절 서열, 복제원 및 기타 재조합 세포와 융화성인 조절서열을 함유할 수 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명의 재조합 분자는 또한 발현된 슈퍼항원, 사이토킨 또는 케모킨 단백질이 이 단백질을 생성하는 세포로부터 분비되도록 해주는 분비 시그널 (즉, 시그널 단편 핵산 서열)을 함유한다. 적합한 시그널 단편은 (1) 세균성 시그널 단편, 특히 슈퍼항원 시그널 단편, (2) 사이토킨 시그널 단편, (3) 케모킨 시그널 단편 또는 (4) 본 발명의 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨 단백질의 분비를 유도할 수 있는 모든 이질성 시그널 단편을 포함한다. 바람직

한 시그널 단편은 이들로 한정되는 것은 아니지만 SEB, SEA, TSST, GM-CSF, M-CSF, TNF, IL-1, IL-2,

IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, C5a, IGIF, IL-8, MIP1, MCP-1, MCP-3, PAFR, FMLPR, LTB₄R, GRP, RANTES, 에오타신, 림포타신, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 및/또는 MGSA/gro 단백질과 결합된 시그널 단편을 포함한다.

본 발명의 바람직한 재조합 분자는 슈퍼항원을 암호화하는 핵산분자를 함유한 재조합 분자, 사이토킨을 암호화하는 핵산분자를 함유한 재조합 분자, 케모킨을 암호화하는 핵산분자를 함유한 재조합 분자, 슈퍼항원을 암호화하는 재조합 분자와 사이토킨을 암호화하는 재조합 분자를 함유하여 키메라 재조합 분자를 형성하는 재조합 분자, 또는 슈퍼항원을 암호화하는 재조합 분자와 케모킨을 암호화하는 재조합 분자를 함유하여 키메라 재조합 분자를 형성하는 재조합 분자를 포함한다. 이러한 재조합 키메라 분자에 함유된 핵산 분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되며, 여기서 키메라 재조합 분자에 함유된 각각의 핵산분자는 동일하거나 상이한 조절 서열을 사용하여 발현될 수 있다. 본 발명의 바람직한 재조합 분자는 서열분석번호1, 서열분석번호3, 서열분석번호5 또는 이의 조합으로 나타나는 핵산 서열을 포함한다. 특히 바람직한 재조합 분자는 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S, PCR₃-TSST 및 PCR₃-GM₃을 포함하며 이들의 제조는 본원에 기술되어 있다. 다른 바람직한 핵산 서열은 란테스 핵산서열 (서열분석번호

호13), MIP1 핵산서열 (참조: Davatelis et al., *J. Exp. Med.* 167:1939-1944, 1988) 및 MIP1 핵산서열 (참조: Sherry et al., *J. Exp. Med.* 168:2251-2259, 1988)을 포함한다.

본 발명에 따르면, 재조합 분자는 디시스트론성일 수 있다. 시스트론은 천연 생물학적 기능을 갖는 아미노산 서열을 암호화할 수 있는 DNA 단위를 지칭한다. 디시스트론성 플라스미드는 2개의 시스트론을 함유한 플라스미드를 일컫는다. 바람직하게는, 본 발명의 디시스트론성 재조합 분자는 진핵성 리보솜이 결합할 수 있는 내부 리보솜 엔트리 사이트 (IRES)를 포함한다 (참조예: Jang et al., *J. Virol.* 62:2636-2643, 1988; Pelletier et al., *Nature* 334:320-325, 1988; Jackson, *Nature* 353:14-15, 1991; Macejek et al., *Nature* 353:90-94, 1991; Oh et al., *Genes Develop.* 6:1643-1653, 1992; Molla et al., *Nature* 356:255-257, 1992; 및 Kozak, *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 27(4,5):385-402, 1992).

한 가지 양태로서, 본 발명의 디시스트론성 재조합 분자는 IRES 핵산서열에 의해 분리된 본 발명의 슈퍼항원-암호화 핵산분자 및 본 발명의 사이토킨-암호화 핵산분자 또는 IRES 핵산서열에 의해 분리된 본 발명의 슈퍼항원-암호화 핵산분자 및 본 발명의 케모킨-암호화 핵산분자에 작동적으로 연결된 진핵성 프로모터를 포함한다.

또 다른 양태로서, 본 발명의 디시스트론성 재조합 분자는 IRES 핵산서열에 의해 분리된 본 발명의 제1 슈퍼항원-암호화 핵산분자 및 본 발명의 제2 슈퍼항원-암호화 핵산분자에 작동적으로 연결된 진핵성 프로모터를 포함한다. 바람직하게는, 제1 슈퍼항원-암호화 핵산분자는 제2 슈퍼항원-암호화 핵산분자와 상이한 슈퍼항원을 암호화한다.

본 발명의 하나 이상의 재조합 분자는 본 발명의 암호화된 산물 (즉, 슈퍼항원 단백질, 사이토킨 및 케모킨 단백질)을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명의 암호화된 산물은 이 단백질을 생성하기에 효과적인 조건하에서 세포내에서 본 발명의 핵산분자를 발현시킴으로써 생성된다. 암호화된 단백질을 생성하는 바람직한 방법은 숙주 세포를 하나 이상의 본 발명의 재조합 분자를 형질전환시켜 (즉, 재조합 분자가 세포에 의해 발현되도록 하는 양상으로 세포내로 그 재조합 분자를 도입한다) 재조합 세포를 형성하는 것이다. 형질전환에 적합한 숙주 세포는 재조합 분자가 도입될 수 있는 세포라면 어떠한 것도 포함된다. 숙주세포는 미형질전환된 세포이거나 이미 하나 이상의 재조합 분자로 형질전환된 세포일 수 있다. 본 발명의 숙주 세포는 세균, 진균, 동물 기생충, 곤충 및 동물 세포를 포함하여 본 발명의 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨을 생성할 수 있는 세포라면 어떤 것도 가능하다. 바람직한 숙주 세포는

포유동물 및 조류 세포를 포함한다. 보다 더 바람직한 숙주 세포로서는 포유동물 림프구, 근육 세포, 조혈전구세포, 비만세포, 천연 킬러세포, 대식세포, 단핵세포, 상피세포, 내피세포, 수지상세포, 간엽세포, 랑게르한스세포, 육아종에서 발견되는 세포 및 모든 세포기원의 종양세포가 포함된다. 본 발명의 훨씬 더 바람직한 숙주 세포로는 포유동물 간엽세포, 상피세포, 내피세포, 대식세포, 단핵세포, 근육세포, T 세포 및 수지상세포가 포함된다.

본 발명에 따르면, 재조합 분자는 생체내 (즉, 동물체내) 또는 시험관내 (즉, 조직배양과 같은 동물체외)에서 숙주 세포내로 도입될 수 있다. 숙주 세포내로 핵산분자의 도입은 세포내로 핵산분자를 삽입할 수 있는 방법이라면 어떠한 것에 의해서도 달성될 수 있다. 형질전환 기술은 이들로 한정되는 것은 아니지만 형질감염, 전기충격법, 미세주입법, 리포펙션, 흡착법 및 프로토플라스트 융합을 포함한다. 생체내에서 재조합 분자를 숙주 세포내로 도입하는 바람직한 방법은 리포펙션 및 흡착법 (이하에 기술되어 있다)이다.

본 발명의 재조합 세포는 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨을 암호화하는 핵산분자가 도입된 세포를 포함한다. 한가지 양태로서, 본 발명의 재조합 세포는 PCR_3 -SEB, PCR_3 -SEA, PCR_3 -SEB.S, PCR_3 -SEA.S, PCR_3 -TSST 또는 이들의 조합체의 적어도 일부분을 포함한 핵산분자로 형질감염된다. 특히 바람직한 재조합 세포는 PCR_3 -SEB, PCR_3 -SEA, PCR_3 -SEB.S, PCR_3 -SEA.S 또는 PCR_3 -TSST로 형질감염된 세포이며 훨씬 더 바람직한 재조합 세포는 PCR_3 -SEB.S, PCR_3 -SEA.S, 또는 PCR_3 -TSST로 형질감염된 세포이다.

또 다른 양태로서, 본 발명의 재조합 세포는 PCR_3 -SEB, PCR_3 -SEA, PCR_3 -SEB.S, PCR_3 -SEA.S, PCR_3 -TSST 또는 이들의 조합체 및 PCR_3 -GM₃의 적어도 일부분을 포함한 핵산분자로 형질전환된다. 특히 바람직한 자극적인 재조합 세포는 PCR_3 -SEA 및 PCR_3 -GM₃, PCR_3 -SEA.S 및 PCR_3 -GM₃, PCR_3 -SEB 및 PCR_3 -GM₃, PCR_3 -SEB.S 및 PCR_3 -GM₃ 또는 PCR_3 -TSST 및 PCR_3 -GM₃로 형질전환된 세포이다. 훨씬 더 바람직한 자극적인 재조합 세포로서는 PCR_3 -SEB.S 및 PCR_3 -GM₃, PCR_3 -SEA.S 및 PCR_3 -GM₃ 또는 PCR_3 -TSST 및 PCR_3 -GM₃로 형질전환된 세포가 포함된다.

재조합 DNA 기술을 사용하여 예를 들면 숙주 세포내에서의 핵산분자의 복제수, 핵산분자의 전사효율, 생성된 전사물의 해독효율 및 해독후 변형효율을 조작함으로써 형질전환된 핵산분자의 발현을 개선할 수 있다. 본 발명의 핵산분자의 발현을 증대시키는데 유용한 재조합 기술로서는 이들로 한정되는 것은 아니지만 핵산분자를 고복제수 플라스미드에 작동적으로 연결하고, 핵산분자를 하나 이상의 숙주 세포 염색체내로 통합하며, 벡터 안정화 서열을 플라스미드에 부가하고, 전사 조절 시그널 (예, 프로모터, 오퍼레이터, 인핸서)을 치환 또는 변형하고, 해독 조절 시그널 (예, 리보솜 결합 부위, 샤인-달가르노 서열)을 치환 또는 변형하며, 숙주 세포의 코돈 용법에 상응하도록 본 발명의 핵산분자를 변형하고, 전사물을 탈안정화하는 서열을 결실시키는 것들을 포함한다. 본 발명의 발현된 재조합 단백질의 활성은 그러한 단백질을 암호화하는 핵산분자를 단편화하거나 변형하거나 유도체화함으로써 개선될 수 있다.

본 발명의 조성물의 추가의 양태는 T 세포 활성의 하강조절을 억제할 수 있는 화합물을 포함할 수 있다. 특히, 이와 같은 화합물로서는 CTLA-4의 억제제가 포함될 수 있다. CTLA-4의 억제제는 CTLA-4의 활성을 억제하고/하거나 CTLA-4가 이의 천연 리간드 (예, B7)에 결합하는 것을 억제할 수 있는 모든 화합물을 포함한다. 바람직하게는, CTLA-4의 억제제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 CTLA-4의 리간드 또는 CTLA-4의 동족체 (즉, 길항제)를 포함한다. CTLA-4의 바람직한 리간드는 CTLA-4 활성을 억제하는 양상으로 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체, B7 분자의 적어도 일부분, 특히 B7 융합단백질 또는 CTLA-4에 결합하는 합성 뉴클레오타이드를 포함한다. CTLA-4의 바람직한 동족체는 B7 시그널 형질도입을 활성화하지 않고 B7 분자에 결합하는 CTLA-4를 억제하는 양상으로 B7에 결합할 수 있는 분자를 포함한다. CTLA-4 억제제가 본 발명의 조성물중에 배합될 때 핵산분자, 단백질 또는 합성 키메릭 분자를 포함할 수 있음은 본 발명의 범위에 속한다.

본 발명의 또 다른 양태로서, 치료조성물은 또한 억제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 담체는 본 발명의 핵산분자를 적합한 생체내 또는 시험관내 부위로 전달하기 위한 비히클로서 적합한 모든 물질을 지칭한다. 그럼으로써, 담체는 본 발명의 핵산분자를 함유한 치료조성물의 억제학적으로 허용되는 부형제로서 작용할 수 있다. 바람직한 담체는 핵산분자가 세포에 도달하였을 때 핵산분자가 세포내로 들어가 세포에 의해 발현될 수 있는 형태로 본 발명의 핵산분자를 유지할 수 있다. 본 발명의 담체는 (1) 핵산분자를 세포로 특정적으로 겨냥하는 것은 아니나 수송하는 부형제 또는 보조제 (비-타겟성 담체) 및 (2) 핵산분자를 동물 또는 특정 세포내의 특정 부위로 전달하는 부형제 또는 보조제 (타겟성 담체)가 포함된다. 비-타겟성 담체의 예로는 이들로 한정하는 것은 아니지만 포스페이트 완충된 염수, 링게르 용액, 덱스트로즈 용액, 혈청-함유 용액, 행크용액, 기타 생리수용액, 오일, 에스테르 및 글라이콜이 포함된다. 수성 담체는 수혜자의 생리 상태를 예를 들면 화학적 안정성 및 등장성을 강화함으로써 적절하게 조절하는데 필요한 적절한 보조물질을 함유할 수 있다.

적절한 보조물질로서는 예를 들면 아세트산나트륨, 염화나트륨, 나트륨 락테이트, 염화칼륨, 염화칼슘 및 기타 포스페이트 완충액, 트리스 완충액 및 중탄산 완충액을 만드는데 사용되는 물질이 포함된다. 또한, 보조물질로서 티메로살, m- 및 o-크레졸, 포르말린 및 벤졸 알코올과 같은 보존제가 포함될 수 있다. 에어로졸 전달을 위해 바람직한 보조물질로는 동물에 무독성인 계면활성물질, 예를 들면 탄소수가 약 6 내지 22개의 지방산의 에스테르 또는 부분에스테르가 포함된다. 에스테르의 예로는 카프로산, 옥탄산, 라우르산, 팔미트산, 스테아린산, 리놀렌산, 리놀레산, 올레스테린산 및 올레산을 들 수 있다. 다른 담체로서 예를 들면 피부를 통해 바이오리시틱 건으로 사용하기 위한 금속입자 (예, 금입자)를 포함할 수 있다. 본 발명의 치료조성물은 통상의 방법에 의해 멸균되고/되거나 동결건조될 수 있다.

타겟성 담체는 본원에서 전달 비히클로서 언급된다. 본 발명의 전달 비히클은 본 발명의 치료조성물을 동물의 표적부위로 전달할 수 있다. 표적 부위란 치료조성물을 전달하고자 하는 동물의 한 부위를 지칭한다. 예를 들면, 표적부위는 리보솜 또는 다른 전달 비히클을 이용한 직접 주사 또는 전달에 의해 겨냥되는 악성종양세포, 비-악성종양세포, 임파선 또는 병원체에 의해 발생한 병소 또는 그러한 세포, 종양 또는 병소의 주변지역일 수 있다. 전달 비히클의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 인공적이고

천연적인 지질-항유 전달 비히클이 포함된다. 천연 지질-항유 전달 비히클은 세포 및 세포막을 포함한다. 인공적인 지질-항유 전달 비히클은 리포솜 및 미셀을 포함한다. 본 발명의 전달 비히클은 동물의 특정부위를 겨냥하기 위하여 변형할 수 있으며 그럼으로써 그 부위로 본 발명의 핵산분자가 이동하여 이용된다. 적합한 변형으로는 전달 비히클의 지질부분의 화학구조를 조작하고/하거나 전달 비히클을 원하는 부위, 예를 들면 바람직한 세포 유형으로 특정적으로 겨냥할 수 있는 화합물을 비히클내로 도입하는 것이 포함된다. 특정적으로 겨냥한다 함은 전달 비히클이 특정 세포에 비히클내의 화합물과 세포표면상의 분자와의 상호작용에 의해 결합하도록 유도함을 일컫는다. 적합한 타겟성 화합물은 특정부위에서 다른 분자를 선택적으로 (즉, 특정적으로) 결합할 수 있는 리간드를 포함한다. 이러한 리간드의 예로는 항체, 항원, 수용체 및 수용체 리간드가 포함된다. 예를 들면, 암세포의 표면상에서 발견된 항원에 특이적인 항체를 전달 비히클이 암세포로 이동할 수 있도록 리포솜 전달 비히클의 외부 표면에 도입할 수 있다. 종양 세포 리간드는 종양 세포의 표면상의 분자와 결합할 수 있는 리간드를 포함한다. 전달 비히클의 지질 부분의 화학구조를 조작함으로써 전달 비히클의 세포외 또는 세포내 겨냥을 조정할 수 있다. 예를 들면, 화학구조를 리포솜의 지질부분에 부가하여 리포솜의 지질 이중층의 전하를 변경할 수 있으며 그럼으로써 리포솜은 특정 전하특징을 갖는 특정세포와 융합한다.

본 발명의 바람직한 전달 비히클은 리포솜이다. 리포솜은 본 발명의 핵산분자를 동물의 바람직한 부위로 전달하기에 충분한 시간동안 동물의 체내에서 안정하게 존재할 수 있다. 본 발명의 리포솜은 동물에 투여 후 바람직하게는 약 30분 이상, 더욱 바람직하게는 약 1시간 이상, 더 더욱 바람직하게는 약 24시간 이상 동물의 체내에서 안정하게 존재한다.

본 발명의 리포솜은 본 발명의 핵산분자를 동물의 특정 또는 선택된 부위로 겨냥할 수 있는 지질조성물을 포함한다. 바람직하게는, 리포솜의 지질 조성물은 동물의 모든 기관, 더욱 바람직하게는 폐, 간, 지라, 심장, 뇌, 임파선 및 피부, 더 더욱 바람직하게는 폐로 겨냥할 수 있다.

본 발명의 리포솜은 겨냥된 세포의 원형질막과 융합하여 핵산분자를 세포내로 전달할 수 있는 지질 조성물을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 리포솜의 형질감염효율은 약 10^6 세포로 전달된 리포솜 16 나노

몰 (nmol)당 약 0.5 마이크로그램 (g) 이상의 DNA, 더욱 바람직하게는 약 10^6 세포로 전달된 리포솜 16

nmol당 약 1.0 g 이상의 DNA, 더 더욱 바람직하게는 약 10^6 세포로 전달된 리포솜 16 nmol당 약 2.0 g 이상의 DNA이다.

본 발명의 바람직한 리포솜은 직경이 약 100 내지 약 500 nm, 더욱 바람직하게는 약 150 내지 약 450 nm, 더 더욱 바람직하게는 약 200 내지 약 400 nm이다.

본 발명에서 사용하기에 적합한 리포솜은 어떠한 리포솜도 포함된다. 본 발명의 바람직한 리포솜으로는 예를 들면 본 분야의 전문가에게 알려져 있는 유전자 전달 방법에서 표준적으로 사용되는 리포솜이 포함된다. 보다 더 바람직한 리포솜은 다가양이온성 지질 조성을 갖는 리포솜 및/또는 폴리에틸렌글라이콜에 연결된 콜레스테롤 골격을 갖는 리포솜을 포함한다. 더 더욱 바람직한 리포솜으로는 실시예2에 기술된 방법에 따라 생성된 리포솜이 포함된다. 한가지 양태로서, 본 발명의 리포솜은 종양 세포에 리포솜을 겨냥할 수 있는 화합물을 포함한다. 이러한 리포솜은 바람직하게는 리포솜의 외부 표면에 노출된 종양 세포 리간드를 포함한다.

리포솜과 본 발명의 핵산분자와의 복합체형성은 본 분야의 표준방법 (참조예: 실시예2에 기술된 방법)을 사용하여 달성할 수 있다. 본 발명의 핵산분자가 리포솜에 첨가되는 적합한 농도는 세포가 주효세포 면역성을 원하는 양상으로 조절하기에 충분한 슈퍼항원 및/또는 사이토킨 단백질을 생성할 수 있도록 세포에 충분한 양의 핵산분자를 전달하기에 유효한 농도를 포함한다. 바람직하게는 핵산분자는 리포솜 약 8 nmol

당 본 발명의 핵산분자 약 0.1 g 내지 약 10 g의 비율로 리포솜과 배합되며, 더욱 바람직하게는 리포솜

약 8 nmol당 본 발명의 핵산분자 약 0.5 g 내지 약 5 g의 비율로, 더 더욱 바람직하게는 리포솜 약 8

nmol당 본 발명의 핵산분자 약 1.0 g의 비율로 리포솜과 배합된다.

또 다른 바람직한 전달 비히클은 재조합 바이러스 입자 백신을 포함한다. 본 발명의 재조합 바이러스 입자 백신은 재조합 분자가 세포내로 DNA의 유입을 허용하여 그 DNA가 세포내에서 발현되도록 하는 바이러스 피막에 포장되어 있는 본 발명의 치료조성물을 포함한다. 많은 재조합 바이러스 입자가 사용될 수 있으며 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 알파바이러스, 폭스바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 아레나바이러스 및 레트로바이러스를 주재로된 것들이 포함된다.

또 다른 바람직한 전달 비히클은 재조합 세포 백신을 포함한다. 본 발명의 바람직한 재조합 세포 백신은 이인자형 (즉, 환자이외의 다른 공급원으로부터 유도된 그러나 환자와 조직학상 융화가능한 세포) 또는 자가 (즉, 환자로부터 분리된 세포) 종양 세포가 치료조성물에 함유된 재조합분자로 형질감염되고 조사되며 환자에게 예를 들면 경피, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 투여되는 종양 백신을 포함한다. 종양 세포

백신에 의해 투여될 치료조성물은 담체없이 본 발명의 재조합 분자를 포함한다. 종양 세포 백신 치료는 종양 및 전이성 암을 모두 치료하는데 유용하다. 본 발명에 따른 종양 백신은 전이성 질병을 예방할 뿐만 아니라 진행중인 전이성 질병을 치유를 포함하여 전이성 암을 치료하는데 특히 유용하다. 개발 및 투여 방법은 본 분야의 표준방법을 포함한다 (참조예: Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-3543, 1993-이의 전체내용은 본원에 참조사항으로 인용된다).

본 발명의 치료조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 암, 자가면역질환, 감염성질환 및 기타 T 세포 활성을 자극하거나 억제함으로써 경감될 수 있는 질병을 포함한 여러 종류의 질병을 치료하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 치료는 동물을 질병으로부터 보호하거나 동물의 질병을 경감시킴을 나타낸다. 본 발명의 치료조성물은 암세포가 면역제거를 피할 수 있도록 하는 (즉, 암세포가 질병에 반응하여 동물에 의해 나타나는 면역반응을 회피하는) 기전을 극복한다는 점에서 암의 치료에 유리하다. 암세포는 예를 들면 단지 미미하게 면역원성을 나타내고, 세포 표면 항원을 조절하며 면역 억제를 유도함으로써 면역제거를 피할 수 있다. 암의 치료에 사용하기에 적합한 치료조성물은 슈퍼항원-암호화 재조합 분자, 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 본 발명의 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨 재조합 분자와의 배합물을 포함한다. 암의 치료에 사용하기에 바람직한 치료 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 전달 비히클, 바람직하게는 리포좀과 (별도로 또는 함께) 배합된 슈퍼항원-암호화 재조합 분자, 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 본 발명의 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨 재조합 분자와의 배합물을 포함한다. 본 발명의 치료조성물은 겨냥된 세포에 유입되었을 때 세포독성 T 세포, 천연 킬러 세포, T 헬퍼세포 및 대식세포를 활성화하는 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨 단백질의 생성을 유도한다. 이러한 세포 활성화는 암세포에 대한 면역 반응의 상대적 결여를 극복하며 그 결과 그러한 세포의 파괴를 유발한다.

본 발명의 치료조성물은 종양 및 전이성 암 모두를 치료하는데 유용하다. 본 발명 치료조성물로의 치료는 전이성 암의 전통적인 요법이 안고 있는 단점을 해결해 준다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 수술하여 치료될 수 없는 분산된 전이성 암 세포를 겨냥할 수 있다. 또한, 이러한 조성물의 투여는 화학요법 및 방사선요법에 의해 유발되는 해로운 부작용을 일으키지 않는다.

본 발명의 치료조성물은 바람직하게는 각종 암 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 흑색종, 편평세포암, 유방암, 두개암 및 구개암, 갑상선암, 연조직육종, 골육종, 고환암, 전립선암, 난소암, 방광암, 피부암, 뇌암, 혈관육종, 혈관성유종, 비만세포 종양, 1기간암, 폐암, 췌장암, 위장암, 신장세포암, 조혈세포 신형성, 백혈병 및 임파종을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 치료조성물로 치료하는데 특히 바람직한 암은 흑색종, 폐암, 갑상선암, 유방암, 신장세포암, 편평세포암, 뇌종양 및 피부암이다. 본 발명의 치료조성물은 악성 및 양성 종양을 포함하여 상기 암으로 발전한 종양을 치료하는데 유용하다.

본 발명의 치료조성물은 병원체의 전파로 기인하는 일차병소 (예, 육아종)에 대한 장기간의 겨냥된 요법으로서 감염질환의 치료에 또한 유리하다. 본원에 사용된 용어 병소는 동물이 병원균에 의해 감염되어 형성된 병소를 지칭한다. 감염질환의 치료를 위해 사용하기에 바람직한 치료조성물은 슈퍼항원-암호화 재조합 분자, 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 본 발명의 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨 재조합 분자와의 배합물을 포함한다. 감염질환의 치료를 위해 사용하기에 더욱 바람직한 치료조성물은 전달 비히클, 바람직하게는 본 발명의 리포좀과 배합하여 슈퍼항원-암호화 재조합 분자, 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 본 발명의 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨 재조합 분자와의 배합물을 포함한다. 암의 치료를 위해 기술된 기전과 유사한, 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨으로 감염질환의 치료는 병원균에 의해 형성된 병소에 대한 면역반응의 결핍을 극복하는 증가된 T 세포, 천연 킬러 세포 및 대식세포 활성을 낳을 수 있다.

본 발명의 치료조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 세포내 세균 (즉, 숙주세포에 내재하는 세균), 내부 기생충, 병원성 진균 및 엔도기생충을 포함한 병원체 의해 유발된 감염질환의 치료에 특히 유용하다. 본 발명의 치료조성물로 치료하는데 특히 바람직한 감염질환은 폐렴, 나, 아스퍼질로스병, 크지디오이데스증, 크립토코커스증, 레이슈마니아증 및 톡소플라스모증이 포함된다.

질병을 앓고 있는 동물을 치료하기 위하여 본 발명의 치료조성물은 조성물이 질병으로부터 동물을 치료하는데 효과적인 양상으로 동물에 투여된다. 예를 들면, 재조합 분자는 효과적인 양상으로 동물에 투여될 때 그 동물이 앓고 있는 질병을 경감시키기에 충분한 양상으로 주효세포 면역성을 자극할 수 있다. 본 발명에 따르면, 질병의 치료는 질병을 경감시키고/시키거나 일차 질병의 발생으로부터 기인하는 이차 질병의 발전을 예방함을 의미한다.

유효한 투여 프로토콜 (즉, 유효한 양상으로 치료조성물을 투여)은 질병의 완치를 낳는 적합한 투여용량 파라미터 및 투여방식을 포함한다. 유효한 투여용량 파라미터 및 투여방식은 특정 질병에 대한 본 분야의 표준방법을 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 방법으로는 예를 들면 생존율, 부작용 (즉, 독성) 및 질병의 발전 또는 퇴행의 측정을 포함한다. 특히, 본 발명의 치료조성물로 암을 치료할 때 그의 투여용량 파라미터 및 방식의 유효성은 반응율을 평가함으로써 결정할 수 있다. 이와 같은 반응율은 부분적인 또는 완전한 경감으로 반응하는 환자 집단중에서 치료된 환자의 백분율을 나타낸다. 경감은 예를 들면 종양 크기를 측정하거나 조직샘플내 암세포의 존재를 현미경으로 검사함으로써 측정할 수 있다.

본 발명에 따르면, 적합한 단일 용량 크기는 적합한 기간에 걸쳐 일회 이상 투여하였을 때 질병을 앓고 있는 동물을 치료할 수 있는 용량이다. 용량은 치료될 질병에 따라 다양할 수 있다. 암을 치료하는 경우 적합한 단일 용량은 치료될 질병이 1기종양인지 전이형태의 암인지에 의해 결정될 수 있다. 직접 주사 기술로 사용하기에 적합한 본 발명의 치료조성물의 용량은 본 분야의 전문가에 의해 동물의 크기를 기준으로 전신투여에 적절한 단일 용량 크기를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 종양을 치료하는데 적합한 치료 조성물의 단일용량은 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨 재조합 분자와의 배합물을 종양 부위에 또는 근처에 있는 세포내로 형질감염시킨후 종양을 감소시키고 바람직하게는 제거하기에 충분한 상기 재조합 분자의 양이다. 슈퍼항원-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일용량은 표적 세포군으로 형질감염되었을 때 형질감염 세포당 약 250

페토그램 (fg) 내지 약 1 g, 바람직하게는 약 500 fg 내지 약 500 pg, 더 더욱 바람직하게는 약 1 pg 내지 약 100 pg의 슈퍼항원의 생성을 낳는 양이다. 사이토킨-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은

표적 세포군으로 형질감염되었을 때 형질감염 세포당 약 10 pg 내지 약 1 g, 바람직하게는 약 100 pg 내지 약 750 pg, 더 더욱 바람직하게는 약 500 pg의 사이토킨의 생성을 낳는 양이다. 케모킨-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 표적 세포군으로 형질감염되었을 때 형질감염 세포당 약 1 fg 내지 약 1

g, 바람직하게는 약 1 pg 내지 약 10 ng, 더 더욱 바람직하게는 약 1 pg 내지 약 1 ng의 케모킨의 생성을 낳는 양이다.

종양을 치료할 동물에 투여하기 위한 비-타겟성 담체중의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨-암호화 재조합 분자와의 배합물의 적합한 단일 용량은 그 재조합 분자를 종양 부위에 또는 근처에 있는 세포내로 형질감염시킨후 그 종양을 감소 및 바람직하게는 제거할 수 있는 양이다. 종양을 치료하는데 바람직한 치료조성물의 단일용량은 약

200 g 내지 약 2 mg의 총 재조합 분자이며, 더욱 바람직하게는 약 150 g 내지 약 1 mg의 총 재조합 분

자, 더 더욱 바람직하게는 약 200 g 내지 약 800 g의 총 재조합 분자이다. 리포솜과 복합된 슈퍼항원-

암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 리포솜 800 nmol당 총 DNA 약 100 g 내지 리포솜 16 mol당

총 재조합 분자 약 2 mg이며, 더욱 바람직하게는 리포솜 1.2 mol당 약 150 g 내지 리포솜 8 mol당 총

재조합 분자 약 1 mg, 훨씬 더 바람직하게는 리포솜 2 ml당 약 200 g 내지 리포솜 3.2 mol당 총 재조

합 분자 약 400 g이다.

종양을 치료할 동물에 투여될 비-타겟성 담체중의 사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 케모킨-암호화 재조

합 분자의 바람직한 단일 용량은 총 재조합 분자 약 100 g 내지 약 2 mg이며, 더욱 바람직하게는 약 150

g 내지 약 1 mg의 총 재조합 분자, 훨씬 더 바람직하게는 약 200 g 내지 약 400 g의 총 재조합 분자이다. 종양을 치료할 동물에 투여될 리포솜과 복합된 사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 케모킨-암호화 재

조합 분자의 바람직한 단일 용량은 리포솜 800 nmol당 총 재조합 분자 약 100 g 내지 리포솜 16 mol당

총 재조합 분자 약 2 mg이며, 더욱 바람직하게는 리포솜 1.2 mol당 약 150 g 내지 리포솜 8 mol당 총

재조합 분자 약 1 mg, 훨씬 더 바람직하게는 리포솜 2 ml당 약 200 g 내지 리포솜 6.4 mol당 총 재조

합 분자 약 400 g이다.

전이성 암을 치료할 동물에 투여될 비-타겟성 담체중의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용

량은 총 재조합 분자 약 100 g 내지 약 4 mg이며, 더욱 바람직하게는 약 150 g 내지 약 3 mg의 총 재조

합 분자, 훨씬 더 바람직하게는 약 200 g 내지 약 2 mg의 총 재조합 분자이다. 전이성 암을 치료할 동물에 투여될 리포솜과 복합된 슈퍼항원-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 리포솜 800 nmoi당 총

재조합 분자 약 100 g 내지 리포솜 32 moi당 총 재조합 분자 약 4 mg이며, 더욱 바람직하게는 리포솜

1.6 moi당 약 200 g 내지 리포솜 24 moi당 총 재조합 분자 약 3 mg, 훨씬 더 바람직하게는 리포솜 3.2

ml당 약 400 g 내지 리포솜 16 moi당 총 재조합 분자 약 2 mg이다.

전이성 암을 치료할 동물에 투여될 비-타겟성 담체중의 사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 케모킨-암호화

재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 총 재조합 분자 약 100 g 내지 약 4.0 mg이며, 더욱 바람직하게는

약 150 g 내지 약 3 mg의 총 재조합 분자, 훨씬 더 바람직하게는 약 200 g 내지 약 2 mg의 총 재조합 분자이다. 전이성 암을 치료할 동물에 투여될 리포솜과 복합된 사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 케모킨

-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 리포솜 800 nmoi당 총 재조합 분자 약 100 g 내지 리포솜

32 moi당 총 재조합 분자 약 4.0 mg이며, 더욱 바람직하게는 리포솜 1.6 moi당 약 200 g 내지 리포솜

24 moi당 총 재조합 분자 약 3 mg, 훨씬 더 바람직하게는 리포솜 3.2 ml당 약 400 g 내지 리포솜 16

moi당 총 재조합 분자 약 2 g이다.

본 발명에 따르면, 비-타겟성 담체 또는 리포솜중에 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 그리고 비-타겟성 담체 또는 리포솜중에 사이토킨-암호화 재조합 분자를 포함한, 병소를 치료하는데 유용한 치료조성물의 단일 용량은 상기된 종양을 치료하는데 사용된 용량과 실질적으로 유사하다.

동물에 투여되는 용량의 횟수는 질병의 중증 및 개개 환자의 치료에 대한 반응에 따라 좌우된다. 예를 들면, 큰 종양은 보다 작은 종양보다 더 많은 투여용량이 요구될 수 있다. 그러나, 일부 경우, 만일 큰 종양을 가진 환자가 보다 작은 종양을 가진 환자 보다 더욱 호전적으로 반응한다면, 큰 종양을 갖는 환자는 보다 작은 종양을 가진 환자보다 적은 용량을 필요로 할 수 있다. 따라서, 적합한 용량의 횟수는 질병의 경감을 낳는데 필요한 어떠한 횟수도 포함한다는 점은 본 발명의 범위내에 속한다 할 것이다. 바람직한 프로토콜은 약 1년 동안에 상기된 단일 용량의 월간 투여이다. 종양을 치료하기 위하여 비-타겟성 담체중의 또는 리포솜과 복합된 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨-암호화 재조합 분자와의 배합물의 바람직한 용량의 횟수는 환자당 약 1 내지 약 10회 투여이며, 보다 바람직하게는 약 2 내지 약 8회 투여, 훨씬 더 바람직하게는 약 3 내지 약 5회 투여이다. 바람직하게는 이러한 투여는 경감의 징조가 나타날 때까지 2주 마다 한번씩 받고 그런다음 질병이 완치될 때까지 한달에 한번 받는다.

전이성 암을 치료하기 위하여 비-타겟성 담체중의 또는 리포솜과 복합된 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 또

는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨-암호화 재조합 분자와의 배합물의 바람직한 용량의 횡수는 환자당 약 2 내지 약 10회 투여이며, 보다 바람직하게는 약 3 내지 약 8회 투여, 훨씬 더 바람직하게는 약 3 내지 약 7회 투여이다. 바람직하게는 이러한 투여는 경감의 징조가 나타날 때까지 2주 마다 한번씩 받고 그런다음 질병이 완치될 때까지 한달에 한번 받는다.

본 발명에 따르면, 비-타켓성 담체 또는 리포솜중에 각각 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 또는 이 슈퍼항원-암호화 재조합 분자와 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨-암호화 재조합 분자와의 배합물을 포함한, 병소를 치료하는데 유용한 치료조성물의 용량의 횡수는 상기된 종양을 치료하는데 사용된 용량의 횡수와 실질적으로 유사하다.

치료조성물은 본 발명의 도입된 재조합 분자가 질병을 치료할 동물의 체내에서 치유력이 있는 단백질로 발현될 수 있도록 하는 양상으로 동물에 투여된다. 치료조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 동물의 한 부위내로 그 조성물을 국소 투여하는 것을 포함한 여러 가지의 방법으로 동물에 투여할 수 있다. 그러한 부위의 예로는 임파선, 파괴될 비정상적인 세포 또는 병원균을 함유한 부위(예, 종양 또는 병소의 부위내에 국소 주사) 및 전신 투여를 포함한다.

국소 투여에 의해 전달될 치료조성물은 (a) 비-타켓성 담체중의 본 발명의 재조합 분자 (예, 문헌 Wolff et al., 1990, Science 247, 1465-1468에 교시된 바와 같은 나상 DNA 분자로서) 및 (b) 본 발명의 전달 비히클에 복합된 본 발명의 재조합 분자를 포함한다. 국소 투여에 적합한 전달 비히클은 리포솜을 포함한다. 국소 투여용 전달 비히클은 또한 상기된 바와 같이 비히클을 특정 부위로 겨냥하기 위한 리간드를 포함한다.

국소 투여의 바람직한 방법은 직접 주사하는 것이다. 직접 주사 기술은 예를 들면 조성물을 비정상적인 세포에 의해 형성된 종괴, 임파선 또는 병원체에 의해 유도된 육아종괴내로 주사함으로써 질병을 치료하는데 특히 유용하다. 바람직하게는, 전달 비히클과 복합된 본 발명의 재조합 분자는 종양괴, 임파선, 육아종괴 또는 암세포의 부위내로 또는 국소적으로 직접 주사하여 투여한다. 종괴 부위 또는 세포 내에 조성물을 국소 투여함이란 그 조성물을 종괴 또는 세포의 수 센티미터 및 바람직하게는 수 밀리미터 내에서 주사함을 일컫는다. 주사하는데 바람직한 종양괴는 분리된 내부 몸체 및 각질의 덩어리 종양을 포함한다. 주사하는데 바람직한 내부 몸체 종양은 뇌, 유방, 간, 신장, 결장, 전립선, 고환, 난소, 지라 및/또는 임파선에서 형성되는 분리된 덩어리 종양을 포함한다. 주사하는데 바람직한 각질 종양은 분리된 덩어리 흑색종을 포함한다.

주사하는데 바람직한 임파선은 비정상세포 또는 병원체를 함유한 부위를 드레인하는 드레이닝 임파선을 포함한다. 본원에 사용된 용어 드레이닝 임파선은 동물의 임파유동의 방향을 기준으로 하여 비정상세포 또는 병원체를 함유한 부위의 아래에 위치한 임파선을 일컫는다 (참조: Hole, Human Anatomy and Physiology, Edward G. Jaffe, ed., Wm. C Brown Publishers, Dubuque, IA 및 G.C. Christiansen et al., Anatomy of the Dog, W.B. Saunders Publishers, Philadelphia, PN, 1979- 이들 두 문헌은 본원에 참조사항으로 인용된다). 주사하는데 바람직한 드레이닝 임파선은 비정상세포 또는 병원체를 함유한 부위에 가장 인접한 드레이닝 임파선을 포함한다. 따라서, 본 분야 전문가가 비정상세포 또는 병원체를 함유한 부위의 위치를 기준으로 임파선 주사부위를 선정할 수 있다. 주사될 임파선의 예로는 종양이 구강에 위치하는 경우 하악골 임파선 및 종양이 앞다리에 위치하는 경우 표재성 경부 임파선을 포함한다. 주효세포는 비정상세포 또는 병원체를 함유한 부위로부터 이동한다. 임파선으로 본 발명의 치료조성물을 주사했을 때 그 결과 임파선으로부터의 주효세포 또는 임파선내로 드레인된 주효세포에 의해 슈퍼항원, 사이토킨 및/또는 케모킨이 발현될 수 있다. 이러한 발현은 T 림프구의 활성화 결과를 낳을 수 있으며, 그 T 림프구는 비정상세포 또는 병원체를 함유한 부위로 역 이동하여 그 부위에서 면역반응을 강화할 수 있다.

국소 투여의 또 다른 방법은 수술 부위에 또는 주변에 본 발명의 치료조성물을 접촉시키는 것이다. 예를 들면, 환자는 종양을 제거하기 위하여 수술을 받을 수 있다. 종양을 제거할 때, 치료조성물을 그 수술부위내 조직의 표면에 피복하거나 수술부위내 조직 부위내로 주사할 수 있다. 이와 같은 국소 투여는 수술로 절개되지 않는 암세포를 치료함은 물론 1기 종양의 발생을 예방하거나 수술부위에서의 2기 종양의 발생을 예방하는데 유용하다.

한가지 양태로서, 본 발명의 치료조성물은 생체내에서 종양 세포에 도입할 수 있다. 다른 양태로서, 본 발명의 치료조성물은 생체내 또는 시험관내에서 비-종양 세포에 도입할 수 있다. 생체내에서 치료조성물을 도입하는 방법은 본원에 기술되어 있다. 시험관내에서 치료조성물을 도입하는 방법은 본 발명의 핵산 분자가 세포의 원형질막을 통과한 다음 그 세포내에서 발현되도록 하기에 충분한 시간동안 치료조성물의 존재하에서 세포를 배양하는 것과 같은 본 분야의 표준방법을 포함한다.

전신 투여에 유용한 치료조성물은 본 발명의 겨냥된 전달 비히클에 복합된 본 발명의 재조합 분자를 포함한다. 전신 투여용으로 적합한 전달 비히클은 비히클을 특정 부위로 겨냥하는 리간드, 바람직하게는 비히클을 치료될 질병에 따라 암 또는 병소 부위로 겨냥하는 리간드를 포함하는 리포솜을 포함한다. 암을 치료하는 경우엔, 암세포 또는 암세포의 영역내에 있는 세포에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드가 바람직하다. 전신 투여는 종양 및 전이성 암 및 전신 감염질환 모두를 치료하는데 유용하다. 특히, 전신 투여는 암세포가 분산되어 있는 (즉, 단일 종양괴내에 국한되어 있지 않은) 전이 형태의 암을 치료하는데 유용하다. 전신 투여는 기관이 겨냥된 치료부위일 때, 특히 도달하기 어려운 기관 (예, 심장, 비장, 폐 또는 간)일 때 특히 유리하다.

전신 투여의 바람직한 방법으로는 정맥내 주사, 에어로졸, 경구 및 경피 (국소) 전달이 포함된다. 정맥내 주사는 본 분야의 표준 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 또한, 에어로졸 전달도 본 분야의 표준 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (참조예: Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992-이의 전체 내용은 본원에 참조 사항으로 인용된다). 경구 전달은 본 발명의 치료조성물을 동물의 장내에서 소화효소에 의한 분해에 견딜 수 있는 담체에 복합시킴으로써 수행할 수 있다. 이러한 담체의 예로는 본 분야에 공지된 것과 같은 플라스틱 캡슐 또는 정제가 포함된다. 국소 전달은 본 발명의 치료조성물을 피부내로 통과할 수 있는 친유성 물질 (예, DMSO)와 혼합함으로써 수행할 수 있다.

본 발명의 치료조성물은 모든 동물, 바람직하게는 포유동물 및 조류, 더욱 바람직하게는 사람, 애완동물,

경제적인 생산성 동물 및 동물원 동물에 투여할 수 있다. 경제적인 생산성 동물은 가축 또는 유용한 산물을 제공하는 동물 (예, 우유 생산용 양)을 포함한다. 동물원 동물은 동물원에서 생활하는 동물을 포함한다. 보호하기에 바람직한 동물로는 사람, 개, 고양이, 양, 소, 말 및 돼지가 포함되며, 특히 바람직한 동물은 사람과 개이다. 본 발명의 치료조성물은 동종 번식종 동물의 질병을 치료하는데 유효한 한편, 특히 종양을 가진 이종 번식종 동물을 치료하는데 유용하다.

본 발명의 또 다른 양태는 동물에서 T 세포 활성을 억제하는 방법이며, 이 방법은 (a) 슈퍼항원을 암호화한 나상 핵산 분자 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 핵산분자는 전사조절 서열에 작동적으로 연결되어 있고 치료조성물은 과다한 T 세포 활성을 함유한 동물의 부위로 겨냥되는 유효량의 치료조성물을 동물에 투여함을 포함한다.

적합한 양태로서, 본 발명의 치료방법에 유용한 본 발명의 치료조성물의 단일 용량크기, 용량수 및 투여 방식은 본원에 상세히 기술되어 있다.

본 발명의 치료조성물은 또한 자가항원 (즉, 외부항원이 아닌 그 자신의 항원)에 의해 T 세포의 해로운 자극을 억제한다는 점에서 자가면역 질병의 치료에 유리하다. 치료조성물중의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자는 세포내로 형질감염됐을 때 자가면역 질병에 연루된 해로운 T 세포군을 제거하는 슈퍼항원을 생성한다. 자가면역 질병의 치료에 사용하기에 바람직한 치료조성물은 본 발명의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 포함한다. 자가면역 질병의 치료에 사용하기에 더욱 바람직한 치료조성물은 본 발명의 비-타겟성 담체, 바람직하게는 염수 또는 포스페이트 완충염수와 배합된 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 포함한다. 이러한 본 발명의 치료조성물은 이들로 한정하는 것은 아니지만 다발성 경화증, 전신성 홍반성낭창, 중증 성근무력증, 류마티스성 관절염, 인슐린 의존성 당뇨병, 건선, 다발동맥염, 면역 중재된 맥관염, 면역 중재된 사구체염, 염증성 신경병 및 유육종증을 포함한 자가면역 질병의 치료에 특히 유용하다.

자가면역 질병을 치료할 동물에 투여될 비-타겟성 담체중의 슈퍼항원-암호화 핵산분자의 단일 용량은 체

중 Kg당 총 재조합 분자 약 0.1 g 내지 약 200 g이며, 더욱 바람직한 용량은 체중 Kg당 총 재조합 분자

약 0.5 g 내지 약 150 g이고, 더욱 바람직한 용량은 체중 Kg당 총 재조합 분자 약 1 g 내지 약 10 g 이다.

자가면역 질병을 치료할 동물에 투여될 비-타겟성 담체중의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자의 용량수는 6개월마다 약 1회 주사, 더욱 바람직하게는 3개월마다 약 1회 주사, 더 더욱 바람직하게는 한달에 약 1회 주사하는 것이다.

자가면역 질병을 치료하기 위하여 본 발명의 치료조성물을 투여하는 바람직한 방법은 국소투여, 더욱 바람직하게는 직접 주사이다. 직접 주사기술은 특히 자가면역 질병의 치료에 중요하다. 바람직하게는, 치료조성물은 환자의 근육세포내로 직접 주사한다. 이 결과 본 발명의 재조합 분자는 장기간 (예, 수주 내지 수개월) 발현한다. 바람직하게는, 나상 DNA의 형태인 본 발명의 재조합 분자를 환자의 근육 세포내로 직접 주사하여 투여한다.

본 발명의 다른 관점은 질병으로부터 동물을 보호하기 위한 핵산-기본 백신 또는 질병에 걸린 동물의 치료요법에 사용되는 부형제이다. 본 발명의 부형제는 (a) 본 발명의 슈퍼항원-암호화 핵산분자 또는 (b) 본 발명의 슈퍼항원-암호화 핵산 분자와 본 발명의 사이토킨 핵산분자, 본 발명의 케모킨 핵산분자 또는 이들의 혼합물과의 배합물을 포함한다.

본 발명의 부형제와 배합하여 본 발명의 부형제 조성물 (즉, 질병을 경감시키는데 유용한 예방치료제 또는 치료요법으로서 유용한 백신 조성물)을 형성하는데 적합한 화합물로서는 면역원으로서 동물에 투여되는 모든 화합물을 포함한다. 본원에 사용된 본 발명의 면역원은 동물에 면역반응을 일으킬 수 있는 화합물을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 면역원은 병원체를 포함한 외래균으로부터 유도된다. 또한, 바람직하게는 본 발명의 면역원은 알레르겐 (유기 또는 무기), 종양 항원 및 자가 항원을 포함한다.

바람직한 면역원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 바이러스, 세균, 진핵성 기생충 및 단세포 원생생물 (예, 아메바)을 포함한 병원체로부터 유도된다. 바람직한 진핵성 기생충으로는 원생동물 기생충, 장내기생충 (예, 선충, 촌충, 흡충, 외부기생충) 및 진균이 포함된다.

바람직한 면역원은 또한 이들로 한정되는 것은 아니지만 식물성 알레르겐, 동물성 알레르겐, 세균성 알레르겐, 기생충성 알레르겐, 접촉 민감성을 일으키는 금속-기본 알레르겐 및 실리카, 베릴륨, 생체이물, 합성약물 및 염료와 같은 무기 알레르겐을 포함한다. 더욱 바람직한 알레르겐으로는 잡초, 풀, 나무, 낙화생, 진드기, 벼룩, 고양이, 말 진애 및 세균 산물 항원이 포함된다.

세균으로부터 유도된 바람직한 면역원으로는 마이코박테리움 감염, 특히 마이코박테리움 튜버클로시스, 마이코박테리움 레프래, 마이코박테리움 아비움 및/또는 마이코박테리움 보비스 감염으로부터 동물을 보호하거나 경감시켜 주는 면역원이 포함된다. 더욱 바람직한 본 발명의 세균성 면역원으로는 1995년 6월 7일에 출원된 미합중국 특허원 제08/484,169호 (이의 내용은 본원에 참조사항으로 인용된다)에 기재된 바와 같이 펩타이드, 이의 의태체 및 그를 함유한 조성물이 포함된다. 한 가지 양태로서, 면역원은 면역원성 단백질질을 암호화하는 핵산분자를 포함한다. 이와 같은 면역원-암호화 핵산분자는 면역원의 아미노산 서열을 기초로하여 본 분야 전문가에 의해 디자인될 수 있다. 또한, 본 발명의 면역원을 암호화한 재조합 분자는 본원에 기술되어 있고 당업자에 알려져 있는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 다른 양태로서, 면역원은 본원에 기술된 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 화합물을 포함한다. 면역원의 그러한 모든 양태는 본 발명의 부형제와 함께 유용하다.

동물을 치료 (즉, 면역화 또는 치료)하기 위하여 본 발명의 부형제 조성물은 이 조성물이 동물을 질병으로부터 보호하거나 동물의 질병을 경감시켜 줄 수 있는 유효한 양상으로 동물에 투여한다. 예를 들면, 부형제는 유효한 양상으로 동물에 투여될 때 그 동물에 의해 초기 또는 연속된 질병 반응을 예방하는데 충분한 양상으로 주요세포 면역성을 자극할 수 있다.

유효한 투여 프로토콜 (즉, 유효한 양상으로 부형제 조성물을 투여)은 동물의 치료 결과를 낳는 적합한 투여 용량 파라미터 및 투여 방식 및 시간을 포함한다. 유효한 투여 용량 파라미터 및 투여 방식은 특정 부형제 조성물에 대한 본 분야의 표준 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 방법으로는 예를 들면 부형제 조성물의 부작용 (즉, 독성)의 측정, 부형제 조성물을 투여했을 때 질병의 경감, 부형제 조성물에 함유된 면역원에 대한 동물의 항체반응의 정도 및/또는 지속시간, 부형제 조성물에 대한 동물의 세포 중재된 면역반응의 정도 및/또는 지속시간, 동물의 상이한 종에서의 부형제 조성물에 대한 면역반응의 유사성 및/또는 부형제 조성물에 대한 반응성에 사육(비-사람 동물의 경우) 또는 혈통(사람의 경우)이 미치는 영향이 포함된다. 특히, 본 발명에 부형제 조성물의 투여 용량 파라미터 및 투여 방식의 유효성은 생체내 항체형성, 생체내 피부 시험 민감성, 시험관내 사이토킨 생성, 시험관내 항원-특이성 증식, 시험관내 세포독성 T 세포활성, 생체내 종양 부담의 감소 및/또는 생체내 감염균 부담의 감소를 평가함으로써 결정할 수 있다. 본 분야의 표준 시험을 사용하여 항체 생성 (예, 효소-연결된 면역검정), 피부 시험 민감성 (예, 백신펙종된 동물에 면역원을 피하투여한 후 월 형성, 경화 및 흉반의 평가), 사이토킨 생성 (예, 사이토킨-특이성 항체를 사용한 면역검정 또는 사이토킨-의존성 세포주를 사용한 생검정), 항원-특이성 증식 (예, ³H-티미딘 혼입), 세포독성 T 세포 활성화 (예, 표적 세포로부터 ⁵¹Cr의 방출을 측정), 종양 부담의 감소 (예, 종양의 크기 측정) 및/또는 감염균 부담의 감소 (예, 예를 들면 바이러스 역가, 세균 군락 계수 또는 기생충 계수의 수득)를 측정할 수 있다.

유효 용량은 면역원에 대하여 동물을 면역화할 수 있는 용량을 지칭한다. 유효 용량은 예를 들면 사용된 부형제, 투여된 면역원 및 수용 동물의 크기 및 종류에 따라 다양할 수 있다. 동물을 치료하기 위한 면역원에 대한 유효 용량은 병원체 또는 알레르겐에 대하여 동물의 질병을 예방하거나 경감시켜 줄 수 있는 시간에 걸쳐 투여된 용량을 포함한다. 예를 들면, 일차 치료 용량은 과민성 동물에 투여됐을 때 최소 과민성 반응을 야기하는 양의 본 발명의 부형제 조성물을 포함할 수 있다. 이차 치료 용량은 일차 용량보다 더 많은 용량의 동일한 부형제 조성물을 포함할 수 있다. 유효 치료 용량은 동물이 질병의 징조를 나타내지 않고서 동물을 치료하는데 필요한 증가 농도의 부형제 조성물을 포함할 수 있다.

본 발명에 따르면, 적합한 단일 용량은 적합한 기간에 걸쳐 일회 이상 투여되었을 때 외래균에 대하여 동물을 면역화할 수 있는 용량이다. 예를 들면, 본 발명에 따른 부형제 조성물의 바람직한 단일 용량은

동물의 체중 Kg당 부형제 조성물 약 100 g 내지 약 1 mg이다. 최초 투여후 약 1주 내지 약 1년 경과하여 부형제 조성물을 추가로 투여할 수 있다. 부형제 조성물의 추가 투여는 동물이 더 이상 치료원인이었던 면역원으로부터 방어적이지 못할 때 실행한다. 특정 투여 용량 및 일정은 상기된 파라미터를 기초로 하여 본 분야의 전문가에 의해 개발될 수 있다.

동물에 투여되는 용량수는 면역원 및 개개환자의 부형제 조성물에 대한 반응에 의해 좌우된다. 예를 들면, 한 바이러스 스트레인을 치료하는 경우는 더욱 면역원성인 바이러스 스트레인을 치료할 때 보다 더 많은 용량을 필요로 할 수 있다. 따라서, 적합한 용량수는 동물을 치료하는데 필요한 모든 수를 포함한다는 것은 본 발명의 범위내에 속한다. 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및/또는 사이토킨-암호화 재조합 분자 및/또는 케모킨-암호화 재조합 분자를 포함한 부형제 조성물의 바람직한 용량수는 1년에 환자당 약 2 내지 약 20 회 투여이고, 더욱 바람직하게는 약 3 내지 약 10회 투여, 더 더욱 바람직하게는 약 3 내지 약 5회 투여이다. 바람직하게는, 그러한 투여는 부형제 조성물이 치료요법으로서 투여될 때 예를 들면 면역원에 대한 항체 생성이 증가 또는 감소하고/하거나, 세포 중재된 면역성이 증가하고/하거나 임상 반응이 관찰될 때 까지 2주마다 한번 받는다.

슈퍼항원-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 근육세포, 피부조직, 폐세포 또는 기타 적합한 세

포부위내로 형질감염되었을 때 형질감염된 세포마다 약 10 fg 내지 약 0.01 g, 더 바람직하게는 약 100 fg 내지 약 1 pg, 더 더욱 바람직하게는 약 1 pg 내지 약 5 pg의 슈퍼항원의 생성을 유도하는 양이다. 사이토킨-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 표적 세포군내로 형질감염되었을 때 형질감염된 세포

마다 약 10 pg 내지 약 0.01 g, 더 바람직하게는 약 100 fg 내지 약 2 pg, 더 더욱 바람직하게는 약 1 pg의 슈퍼항원의 생성을 유도하는 양이다. 케모킨-암호화 재조합 분자의 바람직한 단일 용량은 표적 세포

군내로 형질감염되었을 때 형질감염된 세포마다 약 1 pg 내지 약 0.01 g, 더 바람직하게는 약 0.1 pg 내지 약 10 pg, 더 더욱 바람직하게는 약 1 pg의 슈퍼항원의 생성을 유도하는 양이다.

한가지 양태로서, 본 발명의 부형제 조성물은 약 50% 이하의 면역원-암호화 재조합 분자 및 약 50% 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 부형제 조성물은 약 1.5 mg 이하의 면역원-암호화 재조합 분자 및 약 1.5 mg 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 포함하고, 더욱 바람직하게는 약 1 mg 이하의 면역원-암호화 재조합 분자 및 약 1 mg 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를, 더 더욱 바람직하게는 약 0.5 mg 이하의 면역원-암호화 재조합 분자 및 약 0.5 mg 이하의 슈퍼항원-암호

화 재조합 분자를 포함한다.

다른 양태로서, 본 발명의 부형제 조성물은 조성물의 약 66 중량% 이하의 양으로 면역원-암호화 재조합 분자와 조성물의 약 33 중량% 이하의 양으로 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 포함한다. 바람직하게는, 본

발명의 보형제 조성물은 동물당 약 2000 g 이하의 면역원-암호화 재조합 분자와 약 1000 g 이하의 슈퍼

항원-암호화 재조합 분자를 포함하고, 더욱 바람직하게는 약 1400 g 이하의 면역원-암호화 재조합 분자

와 약 660 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를, 더 더욱 바람직하게는 약 670 g 이하의 면역원-암

호화 재조합 분자와 약 330 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자를 포함한다.

다른 양태로서, 본 발명의 부형제 조성물은 조성물의 약 50% 이하의 양으로 면역원-암호화 재조합 분자, 조성물의 약 25% 이하의 양으로 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 조성물의 약 25% 이하의 양으로 사이토 킨-암호화 재조합 분자 또는 케모킨-암호화 재조합 분자 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 본 발명의 양태 에 따르면, 사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 케모킨-암호화 재조합 분자는 단독으로 또는 서로 배합하 여 사용할 수 있다. 배합하여 사용할때 사이토킨-암호화 재조합 분자 대 케모킨-암호화 재조합 분자의 비 율은 필요에 따라 다양할 수 있다. 이 비율은 본원에 기술된 방법 및 파라미터를 사용하여 외래균에 대항 하여 동물을 예방접종할때 부형제 조성물의 유효성을 기초로 하여 결정할 수 있다.

한가지 양태로서, 본 발명의 부형제 조성물은 동물당 약 2000 g 이하의 면역원-암호화 재조합 분자, 약

500 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 약 500 g 이하의 사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 약

500 g 이하의 케모킨-암호화 재조합 분자를 포함하고, 더욱 바람직하게는 약 1400 g 이하의 면역원-암

호화 재조합 분자, 약 300 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 약 300 g 이하의 사이토킨-암호화

재조합 분자 또는 약 500 g 이하의 케모킨-암호화 재조합 분자를, 더 더욱 바람직하게는 약 660 g 이

하의 면역원-암호화 재조합 분자, 약 160 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 약 160 g 이하의

사이토킨-암호화 재조합 분자 또는 약 160 g 이하의 케모킨-암호화 재조합 분자를 포함한다.

다른 양태로서, 본 발명의 부형제 조성물은 동물당 약 2000 g 이하의 면역원-암호화 재조합 분자, 약

500 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 250 g 이하의 사이토킨-암호화 재조합 분자 및 250 g

이하의 케모킨-암호화 재조합 분자를 포함하고, 더욱 바람직하게는 약 1000 g 이하의 면역원-암호화 재

조합 분자, 약 250 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 약 125 g 이하의 사이토킨-암호화 재조합

분자 및 약 125 g 이하의 케모킨-암호화 재조합 분자를, 더 더욱 바람직하게는 약 660 g 이하의 면역

원-암호화 재조합 분자, 약 160 g 이하의 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 80 g 이하의 사이토킨-암호

화 재조합 분자 및 80 g 이하의 케모킨-암호화 재조합 분자를 포함한다.

부형제 조성물은 바람직하게는 본원에 기술된 바와 같이 나상 DNA 분자의 형태로 근육내 투여에 의해 전달된다. 바람직하게는, 본 발명의 부형제 조성물은 특정 세포 부위내로 (예, 종양내로) 직접 주사에 의해 서거나 근육내, 정맥내, 복강내 및/또는 동맥내 주사에 의해 전달된다. 근육내 주사의 바람직한 부위는 미측의 허벅다리 근육, 후부 근육 및 사람의 엉덩이내이다.

바람직하게는, 본 발명의 부형제 조성물은 조성물을 근육내로 전달하는데 적합한 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 부형제와 사용하기에 바람직한 담체로는 포스페이트 완충염수, 물, 링겔 용액, 덱스트로즈 용액, 헥스염용액 및 일반염수가 포함된다. 더욱 바람직한 담체로서는 포스페이트 완충염수 및 일반염수가 포함되며 가장 바람직한 것은 포스페이트 완충염수이다.

바람직하게는, 본 발명의 부형제 조성물은 본 발명의 SEA-암호화 재조합 분자, SEB-암호화 재조합 분자 또는 이들의 혼합물을 포함한 슈퍼항원-암호화 재조합 분자 및 면역원-암호화 재조합 분자; 본 발명의 SEA-암호화 재조합 분자, SEB-암호화 재조합 분자 또는 이들의 혼합물을 포함한 슈퍼항원-암호화 재조합 분자, GM-CSF-암호화 재조합 분자를 포함한 사이토킨 암호화 분자 및 면역원-암호화 재조합 분자; 또는 본 발명의 SEA-암호화 재조합 분자, SEB-암호화 재조합 분자 또는 이들의 혼합물을 포함한 슈퍼항원-암호

화 재조합 분자, MIP1, MIP1, IL-8 또는 RANTES 재조합 분자를 포함한 케모킨 암호화 분자 및 면역원-암호화 재조합 분자를 포함한 혼합물을 포함한다.

바람직한 양태로서, 본 발명의 부형제는 포스페이트 완충염수중에 함유된 다음의 재조합 분자를 포함한다: (1) PCR₃-SEA, PCR₃-SEA.S, PCR₃-SEB, PCR₃-SEB.S, PCR₃-TSST 및 이들의 혼합물; (2) 약 50% 이하의 PCR₃-SEA, PCR₃-SEA.S, PCR₃-SEB, PCR₃-SEB.S 및/또는 PCR₃-TSST와 약 50% 이하의 PCR₃-GM₃ 혼합물; (3)

약 50% 이하의 PCR₃-SEA, PCR₃-SEA.S, PCR₃-SEB, PCR₃-SEB.S 및/또는 PCR₃-TSST와 50% 이하의 PCR₃-MIP1의 혼합물; (4) 약 50% 이하의 PCR₃-SEA, PCR₃-SEA.S, PCR₃-SEB, PCR₃-SEB.S 및/또는 PCR₃-TSST와 50% 이하의

PCR₃-MIP1의 혼합물; (5) 약 50% 이하의 PCR₃-SEA, PCR₃-SEA.S, PCR₃-SEB, PCR₃-SEB.S 및/또는 PCR₃-TSST와 50% 이하의 PCR₃-RANTES의 혼합물; (6) 약 50% 이하의 PCR₃-SEA, PCR₃-SEA.S, PCR₃-SEB, PCR₃-SEB.S

및/또는 PCR₃-TSST와 약 25% 이하의 PCR₃-GM₃, 25% 이하의 PCR₃-MIP1, PCR₃-MIP1 및/또는 PCR₃-RANTES의 혼합물.

본 발명에 따르면, 본 발명의 부형제 조성물의 바람직한 양태는 (1) 본 발명의 면역원-암호화 재조합 분자를 조성물의 약 50% 이하의 양 및 바람직한 양태의 본 발명 부형제를 조성물의 약 50% 이하의 양으로 포함하거나 (2) 포스페이트 완충염수중에 면역원-암호화 재조합 분자를 조성물의 약 66% 이하의 양 및 바람직한 양태의 본 발명 부형제를 조성물의 약 33% 이하의 양으로 포함한다.

하기 실시예를 통해 본 발명을 예시하고자 한다. 그러나 이들 실시예가 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 이해되어서는 안된다.

도면의 간단한 설명

도1은 포유동물 세포에서 슈퍼항원-암호화 DNA 플라스미드의 발현을 도시한 도면.

도2는 슈퍼항원-암호화 DNA 플라스미드로 형질감염된 개 흑색종 세포에 대한 개 PBMC의 증식 반응을 도시한 도면.

도3a 및 3b는 슈퍼항원-암호화 DNA 플라스미드로 형질감염된 CHO 세포에 의한 슈퍼항원 단백질의 분비를 도시킨 도면.

도4는 슈퍼항원-암호화 DNA 플라스미드로 형질감염된 흑색종 세포에 대한 V 3+ T 세포 클론 AD10의 증식 반응을 도시킨 도면.

도5는 GM-CSF-암호화 DNA 플라스미드로 형질감염된 CHO 세포에 의한 개 GM-CSF의 방출을 도시킨 도면.

도6a 및 6b는 슈퍼항원-암호화 DNA 플라스미드로 형질감염된 자지 종양 세포로 마우스의 예방접종을 도시킨 도면.

도7은 세포독성 T 세포의 용해에 미치는 종양 표적 형질감염의 영향을 도시킨 도면.

도8은 슈퍼항원-암호화 DNA 플라스미드의 근육내 주사에 대한 V 3+ T 세포의 반응을 도시킨 도면.

도9는 부형제 암호화 DNA 및 난알부민 암호화 DNA의 동시투여로 인한 항체반응을 도시킨 도면.

도10은 부형제 암호화 DNA 및 난알부민 암호화 DNA의 동시투여가 난알부민 단백질에 의해 시험관내에서 재자극된 T 세포로부터 인터페론-감마 분비를 증가시킴을 도시킨 도면.

도11은 부형제 암호화 DNA 및 난알부민 암호화 DNA의 동시투여가 난알부민에 대한 T 세포 증식 반응을 증가시킴을 도시킨 도면.

도12는 부형제 암호화 DNA 및 난알부민 암호화 DNA의 동시투여가 난알부민에 대한 CTL 반응을 증가시킴을 도시킨 도면.

실시에

실시에1

본 실시예는 슈퍼항원 및 사이토킨을 암호화한 재조합 분자의 제조를 예시한다.

스타필로코커스 엔테로톡신 B를 암호화한 완전한 cDNA (서열분석번호1) 및 스타필로코커스 엔테로톡신 A를 암호화한 완전한 cDNA (서열분석번호3)를 닥터 존 카플러 (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Disease, Denver, CO)로 부터 입수한 주형을 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭에 의해 제조하였다. 염기쌍 46 내지 773 (SEB.S로 지칭)에 해당하는 리더서열이 없는 SEB의 평삭형태를 프라이머 5' GGGAATTCCATGGAGAGTCAACCAG 3' (서열분석번호7) 및 3' GCGGATCCTCACTTTTCTTTGT 5' (서열분석번호8)를 사용하여 PCR 증폭에 의해 제조하였다. 염기쌍 46 내지 751 (SEA.S로 지칭)에 해당하는 시그널 서열이 없는 SEA의 평삭형태를 프라이머 5' GGGAATTCCATGGAGAGTCAACCAG 3' (서열분석번호9) 및 5' GCAAGCTTAACCTGTATATAAATAG 3' (서열분석번호10)를 사용하여 PCR 증폭에 의해 제조하였다. 독식 쇼크 단백질 독신을 암호화한 완전한 cDNA (TSST; 서열분석번호5)를 닥터 브라이언 코친 (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Disease, Denver, CO)로 부터 입수한 주형 및 아래의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭에 의해 제조하였다:

5' CGGGGTACCCCGAAGGAGGAAAAAATGTCTACAACGATAATATAAAG 3' (서열분석번호11); 및

3' TGCTCTAGAGCATTAAATATTTCTGCTTCTATAGTTTTAT 5' (서열분석번호12).

각각의 cDNA 클론을 표준 클로닝 방법을 사용하여 진핵 발현 벡터 PCR₃ (In Vitrogen, San Diego, CA)내로 연결하였다. PCR₃ 내로 클로닝된 완전한 SEB cDNA는 PCR₃-SEB라 지칭한다; PCR₃ 내로 클로닝된 완전한 SEA cDNA는 PCR₃-SEA라 지칭한다; PCR₃ 내로 클로닝된 완전한 TSST cDNA는 PCR₃-TSST라 지칭한다; PCR₃ 내로 클로닝된 평삭된 SEB cDNA는 PCR₃-SEB.S라 지칭한다; PCR₃ 내로 클로닝된 평삭된 SEA cDNA는 PCR₃-SEA.S라 지칭한다.

공지된 개 GM-CSF cDNA (상기 Nash)를 기초로 디자인된 개 GM-CSF 프라이머를 사용하여 콘카나발린 A-자극된 정상 개 말초혈액 단핵세포 (PBMC)로부터 추출된 전체 RNA를 PCR 증폭하여 개 GM-CSF의 cDNA를 제조하였다. 역전사효소 및 올리고T 프라이머를 사용하여 전체 RNA를 역전사시켰다. 그런다음, PCR 및 특정 5' 및 3' 프라이머를 사용하여 개 GM-CSF cDNA를 증폭시켰다. PCR 산물을 PCR₃ 벡터내로 클로닝하여 재조합 분자를 수득하였으며, 이 분자는 본원에서 PCR₃-GM₃이라 명칭된다.

실시에 2

본 실시예는 형질감염후 포유동물 CHO 세포에서의 슈퍼항원 암호화 DNA의 발현을 예시한다.

분리된 PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 이. 콜라이를 형질전환시키고 암피실린-내성 세균 콜로니를 플라스미드의 존재에 대한 확인으로서 스크리닝하였다. 그런다음 선별된 콜로니를 대규모로 배양 (리터 용량)하였다. 표준 방법을 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 전형적인 플라스미드 수득량은 1 리터의 세균-함유 배양 배지로부터 20 mg의 플라스미드였다. 제조업체 (Lipofectamine, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에 의해 제공된 방법을 사용하여 리포렉선에 의해 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)내

로 플라스미드 DNA를 형질감염시켰다. 약 10^6 CHO 세포내로 약 2.0 g의 각 플라스미드 DNA를 별도로 형질감염시켰다.

형질감염된 CHO 세포를 48 시간동안 배양하였다. 그런다음 상등물 및 세포 용균물을 분리하여 형질감염 세포에 의해 생성된 세포내 및 분비된 SAg 단백질의 양을 측정하였다. 형질감염 세포를 분리하고 음파분쇄하여 세포 용균물을 수득한 후 이의 활성을 측정하였다. 다음의 방법을 사용하여 PBMC 군에 함유된 림프구를 자극하는 SAg 단백질의 능력을 정량함으로써 각 샘플내의 SAg 단백질 활성을 측정하였다. 시험법

상등물 및 용균물을 5×10^5 PBMC를 함유한 96-웰 평판의 삼중 웰에 웰당 200 l의 총 부피로 일련의 희석으로 첨가하였다. 3일후 웰을 ^3H 티미딘으로 펄스하고 18 시간동안 배양하였다. PBMC내로 혼입된 방사능을 베타 카운터로 정량하였다. 음성 대조군은 삽입된 유전자 (모의)가 없는 DNA 벡터로 형질감염된 CHO 세포를 포함하였고 양성 대조군은 정제된 재조합 SAg 단백질이었다.

이의 결과는 분당 계수된 평균 혼입된 티미딘으로서 정적하였으며 도1에 나타나 있다. 그 결과는 PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 형질감염된 CHO 세포의 상등물 및 용균물이 모의 형질감염 배양물에 비하여 PBMC의 강한 증식을 자극하였음을 가리킨다. 일부 경우 상등물의 활성은 세포 용균물의 활성을 능가하였다. 따라서, 세균성 SAg 단백질의 암호화 DNA는 생물학적으로 활성인 형태로 포유동물 세포내에서 전사 및 해독될 수 있다. 이 결과는 또한 형질감염된 세포에 의해 생성된 생물학적으로 활성인 SAg 단백질의 양은 T 세포 증식을 자극하기에 충분한 양임을 가리킨다.

실시예 3

본 실시예는 형질감염후 개 흑색종 세포에서 슈퍼항원 암호화 DNA의 발현을 예시한다.

개를 부검하여 흑색종양의 일부분을 분리하고 이를 콜라게나제를 분해한 다음 방출된 세포를 10% 태송아 지혈청 함유 Iscove Modified Dulbecco 배지 (IMDM)를 사용한 24 웰 평판에 플레이팅함으로써 얻은 구강 악성 종양으로부터 흑색종 세포주를 설정하였다. 흑색종 세포를 PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 실시예 2에 기술된 리포펙션에 의해 형질감염시켰다. 그런다음 세포를 조사하였다(15,000 Rads). 점차 적은 수의 형질감염 세포를 정상적인 개 PBMC (5×10^5 /웰)에 첨가하여 형질감염된 흑색종 세포 샘플을 4개 준비하였다. 각각의 샘플은 96 웰 평판에서 삼중으로 준비하였다. 3일후 증식을 실시예 2에 기술된 바와 같이 정량하였다. 비-형질감염된 흑색종 세포를 음성 대조 샘플로서 사용하였다. 이의 결과는 분당 계수된 평균 혼입된 티미딘으로서 정적하였으며 도2에 나타나 있다. 이 결과는 개 PBMC가 PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 형질감염된 개 흑색종 세포와 배양되었을 때 증식하였음을 가리키며 조사된 종양 세포의 수를 높임으로써 증식도 용량-의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서, 흑색종 종양 세포는 형질감염될 수 있으며 생물학적으로 활성인 SAg 단백질을 발현할 수 있다. 이 결과는 또한 형질감염된 흑색종 세포가 조사후 생물학적으로 활성인 SAg 단백질을 계속 방출함을 보여주며 이것은 형질감염된 종양 세포가 또한 본원에 상세히 기술된 바와 같이 자가 종양 백신으로서 유용할 수 있음을 나타낸다.

실시예 4

본 실시예는 안정하게 형질감염된 CHO 세포에서 SEB.S 및 SEA.S 암호화 DNA의 장기간 발현을 예시한다.

실시예 2에 기술된 형질감염된 CHO 세포의 상등물에서 검출된 SAg 단백질 활성이 죽어 가는 세포로부터의 실질적인 분비를 나타내는 것인지 아니면 단순한 방출을 나타내는 것인지를 결정하기 위하여 PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 또는 cDNA 삽입체(대조군)가 없는 벡터를 사용하여 안정하게 형질감염된 CHO 주를 제조하였다.

약 2×10^6 CHO 세포를 리포펙션에 의해 약 2 g의 플라스미드로 형질감염시켰다. 그런다음 형질전환 세포를 G418 (1 mg/ml)에서 3주 동안 배양하여 안정한 형질감염체를 얻었다. G418 선택된 CHO 세포를 9개 개개의 조직 배양 웰내로 접종하고 4시간 흡착되도록 한다음 새로운 조직 배양 배지를 첨가하였다. 상등물을 0 시간에서 36 시간에 이르기까지 연속적으로 수거하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같이 상등물을 PBMC에 첨가하여 SAg 단백질 활성에 대해 검정하였다.

이 결과는 각 시간대에서 상등물에 함유된 평균 증식 자극 활성으로서 정적하였으며 도 3a 및 3b에 나타나 있다. 이 결과는 PCR₃-SEB.S 및 PCR₃-SEA.S로 안정하게 형질감염된 CHO 세포로부터의 상등물에서 PBMC 자극 활성의 지속적인 시간-의존성 증가가 관찰되었음을 가리킨다. 따라서, PCR₃-SEB.S 및 PCR₃-SEA.S로 포유동물 세포의 형질감염은 생물학적으로 활성인 SAg 단백질의 장기간 발현 결과를 얻는다. 이 데이터는 형질감염된 포유동물 세포가 SAg 단백질 생성의 지속된 공급원으로서 역할을 할 수 있음을 가리킨다.

실시예 5

본 실시예는 흑색종 세포에 PCR₃-SEA₃.S DNA의 형질감염은 생물학적으로 활성인 SEA.S 단백질의 발현 결과를 낳음을 예시한다.

상등물은 T 세포 수용체 (TCR)에 특정 V 도메인을 가진 T 세포의 증식을 자극할 수 있다. SEA는 마우스

에서 V 3+ TCR을 가진 T 세포를 자극하는 것으로 알려져 있다. SEB는 V 3+ T 세포를 자극하지 않는다. 그

러므로, PCR₃-SEA₃.S DNA로 형질감염된 흑색종 세포에 의해 발현된 SEA.S 단백질이 V 3+ TCR을 발현하는 T 세포 클론 (AD10)의 증식을 자극하는 능력을 평가하기 위한 실험을 실시하였다.

B16 흑색종 세포를 PCR₃-SEA₃.S DNA, PCR₃-SEB₃.S DNA 또는 삽입체가 없는 PCR₃ 벡터 DNA(모의)로 형질감염시켰다. 그런다음 세포를 조사(18,000 Rads)하고 웰당 약 1×10^4 의 농도로 96 웰 평판에 삼중으로 플레이팅하였다. 각각의 웰에 약 1×10^5 AD10 세포를 첨가하였다. 그런후, 조사된 선천적 비장 세포를 슈퍼항원 및 T 세포 상호작용을 위한 항원 제공 세포의 공급원으로서 각각의 웰에 첨가하였다. 음성 대조군은 모의 형질감염된 세포를 포함하며 양성 대조군은 재조합 SEA (10 ng/ml)를 포함하였다. 세포를 48시간동안 배양하였다. 그런다음 ³H 티미딘을 각 웰에 첨가하고 증식반응을 정량하였다.

이 결과는 분당 평균 혼입된 티미딘의 계수로서 정적하였으며 도4에 나타나 있다. AD10 세포는 B16 세포 내로 형질감염된 PCR₃-SEA.S DNA에 의해 생성된 SEA.S 단백질에 반응하여 강하게 증식하였으며 증식반응은 재조합 단백질의 증식반응과 거의 대등하였다. 따라서, 흑색종 세포를 PCR₃-SEA.S DNA로 형질감염시켜 발현된 T 세포 반응은 정확한 TCR에 대해 특이적이다. PCR₃-SEB.S DNA로 형질감염된 세포는 AD10 세포의 증식을 자극하지 않았으며 SEA 및 SEB의 예측된 TCR 특이성과 일치하였다.

실시예 6

본 실시예는 CHO 세포에서의 PCR₃-GM DNA의 발현을 예시한다.

실시예 1 및 2에 기술된 방법을 사용하여 PCR₃-GM DNA를 제조하고, 분리하고 CHO 세포내로 형질감염시켰다. CHO 세포에서의 GM-CSF 단백질의 발현을 다음의 방법으로 측정하였다. 상등물을 형질감염된 세포 및 비-형질감염된 CHO 세포의 배양물로부터 분리하였다. 상등물을 정상적인 개 PBMC로 부터 수득된 단핵세포의 배양물에 첨가하고 상등물이 단핵세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있는 능력을 측정하였다. 시험 또는 대조 CHO 상등물과의 4일간 배양후 살아있는 세포에서 환원되는 메틸테트라졸륨 염료 (MTT)를 첨가하여 단핵세포 생존을 정량하였다. 570 nm에서의 흡광도(ELISA 판독기를 이용하여 측정)는 세포 생존을 나타낸다.

이 결과는 도5에 나타나 있으며 PCR₃-GM DNA로 형질감염된 CHO로부터의 상등물은 대조 상등물을 사용하여 얻은 결과와 비교하였을때 배양중에 개 단핵세포의 생존을 자극하였음을 가리킨다. 활성 수준은 1×10^5 단위의 개 재조합 GM-CSF의 활성 수준에 상당하였다. 따라서, PCR₃-GM DNA로 형질감염된 CHO 세포에 의해 생성된 GM-CSF 단백질은 생물학적으로 활성을 나타낸다.

실시예 7

본 실시예는 PCR₃-SEA.S DNA 또는 PCR₃-SEB.S DNA로 형질감염된 자가 종양 세포로 마우스를 예방접종하였을때 강한 세포독성 T 세포 (CTL) 활성이 유도됨을 증명한다.

하기 실험은 PCR₃-SEA.S DNA 또는 PCR₃-SEB.S DNA를 발현하는 비-면역원성 쥐 흑색종 세포 (B16 흑색종 세포, F10 클론)가 마우스에서 CTL 반응을 유도하는 능력을 연구하기 위해 실시된 것이다. B16 세포는 C57B16/J 마우스내로 주사됐을때 비-면역원성인 것으로 알려져 있다. 유도될 수 있는 CTL 반응의 수준은 예방접종된 동물이 종양을 거부하는 능력과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다.

B16 세포를 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여 PCR₃-SEA.S DNA, PCR₃-SEB.S 또는 삽입체가 없는 PCR₃ DNA(모의)로 형질감염시켰다. 그런다음 세포를 12,000 Rads에서 조사하고 약 10^6 조사세포를 C57B16/J 마우스내로 피하 주사하였다. 3주후, 마우스를 처사시키고 그의 비장 단핵 세포를 수거하였다. 그런다음 비장 세포로부터 분리된 단핵 세포를 조사되고 비-형질감염된 야생형 B16 세포로 인터루킨-2 (IL-2) 함유 배지에서 6일 동안 재자극하였다. 이어서, CRL 활성에 대한 표준 크로뮴 방출 검정에서 비장 세포를 점차 감소하는 숫자로 약 5×10^3 의 Cr-표시된 야생형 (비-형질감염된) B16 세포에 첨가하였다. 4시간후 상등물을 수거하고 표적 B16 흑색종 세포의 특정 용해율을 정량하였다.

그 결과는 도 6A 및 6B에 나타나 있으며 동물에 조사된 형질감염 흑색종 세포를 주사했을때 비-형질감염된 세포로 주사했을때 보다 더 큰 CTL 활성을 유도함을 가리킨다. 이 결과는 B16 세포의 비-면역원성 성질과 일치한다. 따라서, 형질감염된 종양 세포에서 발현된 세균 SAg 단백질을 암호화한 DNA는 비-형질감염된 모 세포에 대하여 강한 CTL-중재된 면역성을 나타낼 수 있다. 이들 결과는 슈퍼항원을 암호화한 DNA로 형질감염된 자가 종양 세포가 전이성 질병의 치료 또는 예방에 유효한 종양 백신의 구성요소가 됨을 제시해 준다.

실시예 8

본 실시예에는 PCR₃-SEB.S DNA로 형질감염된 종양 세포가 인접한 T 세포에서 세포독성 활성을 유도할 수 있음을 증명한다.

실시에 7에 기술된 방법을 사용하여 비-형질감염된 B16 세포로 면역화된 마우스로부터 T 세포를 제조하였다. 이들 분리된 세포는 비-형질감염된 B16 표적 세포에 대하여 최소 CTL 활성을 나타냈다. B16 세포를 실시예 2에 일반적으로 기술된 방법을 사용하여 PCR₃-SEB.S로 형질감염시켰다. 실시예 7에 사용된 표준 4 시간 크롬 방출 검정으로 형질감염된 B16 표적 세포에 의한 CTL 활성의 유도를 평가하였다.

이 결과는 도7에 나타나 있으며 PCR₃-SEB.S로 형질감염된 B16 세포가 비-형질감염된 표적 B16 세포에 대해 비교적 비반응적인 T 세포에서 CTL 활성의 4배 증가를 급속히 유도한 단백질을 생성하였다. 따라서, B16 세포에 의해 분리된 T 세포 인군에서 생성된 SEB는 그러한 T 세포를 자극할 수 있다. 이 데이터는 PCR₃-SEB.S로 생체내 형질감염된 종양 세포가 이들의 인군에서 T 림프구를 급속히 활성화할 수 있고 그럼으로써 그들 자체 또는 이웃하는 종양 세포에 대하여 세포독성을 유도할 수 있는 생물학적으로 활성인 SEB.S를 생성할 수 있음을 가리킨다.

실시에 9

본 실시예에는 개 흑색종을 슈퍼항원 또는 GM-CSF의 암호화 DNA로 치료함을 예시한다.

A. 시험인가 및 설계의 기준

본 연구를 위해 선정된 동물은 별도의 다른 유효한 치료법이 없는 고도의 악성 개 신생물인 본 출원인이 소유하고 있는 특발성 구강 악성 흑색종을 가진 동물이다. 연구이전에 출원인은 고시된 동의서에 서명할 것을 요구받았다. 본 연구는 2주 마다 6회 주사되는 초기 12주 시험 반응 단계에 이어서 이 초기 12주 유도 단계동안에 반응한 동물을 위한 매달 1회 주사의 장기간 요법으로 구성되었다. 잠재적 독성을 (1) 주사후 7일동안 매일 측정된 체온; (2) 주사 부위의 물리검사; (3) 개의 행동 및 식욕의 자체 평가; (4) 매달 1회의 완전한 혈구계산 및 생화학측정에 의해 평가하였다. 치료반응은 (1) 종양 크기의 물리적 측정; (2) 종양 사진; (3) 전이 평가를 위한 흉부의 방사선사진에 의해 평가하였다.

B. 슈퍼항원 + GM-CSF 치료 프로토콜

리포솜과 복합된 DNA 샘플을 다음과 같이 제조하였다. 알카리 용해 방법의해 세균 배양물로부터 제조되고 CsCl 처리에의해 정제된 PCR₃-SEB.S 및 PCR₃-GM 플라스미드 DNA를 멸균 PBS중에 1.0 mg/ml 농도로 재현탁시켰다. 등몰량의 N-[1-(33-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리에틸암모늄 (DOTMA; 미국 캘리포니아 팔로알토 소재의 Syntex, Corp.으로부터 입수)과 디올레오일 포스파티딜에탄올아민 (DOPE; AL 버밍햄 소재의 Avanti Polar Lipids로부터 입수)를 혼합하여 리포솜을 제조하였다. 지질을 건조기에서 말리다음 pH 7.0의 멸균 포스페이트 완충 염수 (PBS)중에 1.0 mg/ml의 농도로 재구성하였다. 재구성된 지질을 5분 동안 음파처리하여 평균크기가 약 200 nm 내지 약 400 nm인 리포솜을 생성하였다.

환자에게 주사하기 30분전에 PCR₃-SEB.S 및 PCR₃-GM DNA를 리포솜과 1.0 g DNA 대 4 nmol 리포솜의 비율로 1.0 ml 멸균 PBS중에서 혼합하였다. 용액이 실온에서 혼합되도록 하였다. 종양 용량에 따라 2 용량의

DNA를 투여하였다. 직경이 3 cm미만인 종양의 경우는 각 종양에 총 400 g DNA (각각 200 g 씩의 PCR₃-

SEB.S 및 PCR₃-GM DNA)를 주사하였다. 직경이 3 cm이상인 종양의 경우는 각 종양에 총 800 g DNA (각각

400 g 씩의 PCR₃-SEB.S 및 PCR₃-GM DNA)를 주사하였다.

매 치료시 3 ml 주사기 및 25 게이지 침으로 DNA:리포솜 혼합물을 종양 부위내로 주사하였다. 좀더 큰 종양의 경우엔 대부분의 주사를 종양 기저의 주변에 있는 조직내로 실시하였다. 좀더 작은 종양의 경우도 또한 주사를 종양 조직내로 직접 실시하였다. 종양 전이의 증거를 나타내는 임파선 조직도 또한 주사하였다. 주사는 처음 12주 동안에는 2주에 1회 실시한 다음 이후로는 완전한 종양 경감이 일어날때까지 초기 치료 반응이 발생한 동물에 1개월 2회씩 계속 주사하였다. 이 시점에서는 주사 횟수를 한달에 한번으로 줄였다. 치료독성은 상기 단락A에 기술된 파라미터를 기초로 평가하였다. 이 결과는 하기 표1에 나타나 있다.

표1. 개 흑색종의 SEB.S 및 PCR₃-GM DNA 치료에 대한 환자 로그

환자	단계	TN	종양크기	개시일	반응	주석
조막스	I기	T1bNOMO	직경1.5 cm	94. 5. 16	CR 51주	SEB.S+GM-CSF
샤도우	III기	T2bN1bMO	직경3 cm	94. 5. 23	CR 50주	SEB.S+GM-CSF
엔지	I기	T1NOMO	직경1.2 cm	94. 12. 9	CR 34주	SEB.S+GM-CSF
매기	III기	T2aNOMO	직경2 cm	94. 8. 24	PR 33주	SEB.S+GM-CSF

케. 씨.	III기	T3aNOMO	직경4 cm미만	94. 10. 13	SD 12주	SEB.S+GM-CSF
벨베더어	III기	T2N1bMO	직경4 cm	94. 10. 13	CR 30주	SEB.S+GM-CSF
니콜라스	III기	T3bNOMO	직경4 cm미만	95. 2. 15	SD 12주	SEB.S+GM-CSF
하이드	III기	TON1bMO	LN:직경2 cm	95. 2. 27	PR 10주	SEB.S+GM-CSF
베어	III기	TON1bMO	LN:2.5 cm	95. 4. 11	SD 4주	SEB.S+GM-CSF

환자의 데이터와 관련된 용어정의:

단계: I는 가장 적은 전이 크기를, III는 가장 많은 전이 크기를 나타낸다

TNM: 세계보건기구의 단계 체계

SD = 안정한 질병 (종양 성장 없음)

PR = 부분적인 경감 (종양 크기의 50% 미만 감소)

CR = 종양의 완전한 경감

PD = 급진적인 질병 (치료에 대한 반응 없음)

MCT = 비만 세포 종양

유방 CA = 유선암 (악성 유방암)

갑상선 CA = 갑상선암

SCC = 편평세포암

표1에 나타난 결과는 치료 반응이 12주 시험기간동안 치료받은 6 내지 9마리 개에서 관찰되었다. 이 중에는 4마리의 완전한 경감 (남은 종양 없음) 및 2마리의 부분적인 경감 (종양 크기가 50% 이상 감소)이 포함되어 있다. 나머지 2마리 개의 종양은 경감이 없었으나 12주 시험기간내내 크지는 않았다. 평균적으로 종양 반응은 명백하게 드러나는 데에는 6 내지 10주가 걸렸다. 이러한 주사는 주사부위에 어떠한 염증이 나 괴사도 일으키지 않았다. 독성도 국소적이든 전신적이든 치료받은 10 마리 환자 모두에서 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 이중변식된 종에서 특발성 악성 흑색종을 치료하기 위해서 슈퍼항원(SEB) 및 사이토킨(GM-CSF)의 암호화 DNA를 사용했을때의 직접적인 DNA 주사의 효능에 대한 증거가 된다.

개 흑색종은 고도로 악성이며 급속히 성장하는 개의 종양이며 사람 흑색종의 치료연구에 유용한 모델을 제공한다. 치료없이 III기 질병 동물 (5마리)의 50% 생존 시간은 약 3개월이며 모든 동물은 폐전이 때문에 5개월내에 사망할 것이다. 표1에서 볼 수 있듯이 일부 장기간 생존자(다른 것들은 평가하기에 충분히 오랫동안 치료받지 못했다)가 관찰되는 것은 병합된 DNA 면역요법이 또한 전이질병을 억제하는데 전신적으로 영향을 미침을 시사한다.

이 방법의 또 다른 주요 장점은 개에 독성이 뚜렷하게 전혀 나타나지 않는다는 점이다. 개가 사람과 유사한 SAg 단백질에 반응하기 때문에, 사람에게도 독성이 미미할 듯하다. 형질감염에 의한 종양세포내로 슈퍼항원 암호화 DNA의 전달 및 이에 따른 국소 발현은 독성을 유발함이 없이 강한 면역 반응을 유도하기에 충분하다. 따라서, 종양의 면역요법에 대한 이와 같은 유전적 방안은 통상의 화학요법 및 방사요법에 비해 환자의 치사율을 낮춘다는 측면에서 많은 이점을 제공한다. 또한, DNA 형질감염에 의한 SAg 단백질의 전달은 또한 전신 투여와 연관된 잠복적인 독성을 예방한다.

C. 단일 유전자 치료 프로토콜

슈퍼항원 또는 사이토킨을 암호화한 DNA 주사의 효용성을 병합된 유전자 요법 (SAg-암호화 DNA 및 사이토킨-암호화 DNA)와 비교하여 평가하기 위하여 두 그룹의 개를 PCR₃-SEB.S DNA 단독 (3마리) 또는 PCR₃-GM DNA 단독 (3마리; 2마리는 등록되었고 1마리는 평가중)으로 처리하였다. 등록 및 시험 디자인에 대한 기준은 본 실시예의 상기 A 단락에서 기술된 바와 유사하게 적용되었다. 형식상 무작위로 된 것은 아니지만, 처음 10마리 개를 두 유전자 배합물로 처리한후, 다음 3마리는 PCR₃-SEB.S DNA 단독 그룹으로, 그 다음 3마리는 PCR₃-GM DNA 단독 그룹으로 지정하였다. 본 연구에는 상기의 단락B에 기술된 바와 유사한 치료 프로토콜이 적용되었다. 요약하면, DNA를 리포솜과 복합화하고 처음 12주 동안 2주 마다 한번씩 주사하였고, 그후 초기 치료반응이 일어난 동물에 완전한 종양 경감이 일어날때까지 매월 2회씩 계속 주사하였다. 치료의 독성은 상기 단락 A에 기재된 파라미터를 기준으로하여 평가하였다. 이 결과는 하기 표 2에 나타나 있다.

표2. 개 흑색종의 SEB.S 또는 PCR₃-GM DNA 단독 치료에 대한 환자 로그

환자	단계	TN	종양크기	개시일	반응	주석
제시	II기	T2bNOMO	2 cm 직경	95. 1. 11	PD 17주	SEB.S 단독
미스터티	III기	TON1bMO	LN:2 cm 직경	95. 2. 1	PD 14주	SEB.S 단독
두피	II기	T2aNOMO	2 cm 직경	95. 2. 3	PD 12주	SEB.S 단독
스쿠터	I기	T2aNOMO	2 cm 직경	95. 3. 24	PD 7주	GM-CSF 단독

이 결과는 종양 반응이 PCR₃-SEB.S DNA만을 투여받은 어떠한 개에서도 일어나지 않았으며 종양이 점차적으로 성장하였음을 가리킨다. 또한, PCR₃-GM DNA만으로 치료된 한 개(스쿠터)도 점차적인 성장을 나타냈다. 이러한 데이터는 PCR₃-SEB.S DNA 단독 또는 PCR₃-GM DNA 단독만으로는 치료는 종양 경감을 유도하지 않음

을 가리킨다. 이 데이터는 직접적인 DNA 주사의 뚜렷한 항-종양 효능은 종양 및 인접한 조직에서 PCR₃-SEB.S DNA 및 PCR₃-GM DNA의 병합된 발현으로부터 기인함을 가리킨다.

실시예 10

본 실시예는 슈퍼항원 또는 GM-CSF 암호화 DNA로 여러가지 종양 유형의 치료를 예시한다. 사람암과 유사한 생물학적 및 조직학적 특징의 악성을 가진 개의 치료를 위한 PCR₃-SEB.S DNA 및 PCR₃-GM DNA의 효능 및 독성 결여를 측정하였다. 다섯 종류의 다른 암 (중증의 선암, 비만세포암, 갑상선암, 비-구강 흑색종 및 편평세포암)을 가진 개를 본 연구에서 치료하였다. 본 연구를 위해 선정된 동물에는 다른 치료(예, 화학요법 및/또는 수술)를 받았으나 반응하지 않았거나 오히려 악화된 특발성 악성을 가진 개가 포함되었다.

상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 치료 샘플을 준비하고 이의 종양내로 PCR₃-SEB.S DNA 및 PCR₃-GM DNA를 주사하였다. 처음 12주 동안은 2주마다 1회씩 개를 치료하였고 그런다음엔 초기의 치료 반응이 일어난 개는 한달에 2회씩 계속 치료하였다. 상기 실시예 9의 단락 A에 기술된 파라미터를 기준으로하여 치료의 독성을 평가하였다. 이 결과는 하기 표3에 나타나 있다.

표3. 여러가지 암의 PCR₃-SEB.S DNA 및 PCR₃-GM DNA 치료에 대한 환자로그

환자	종양유형	단계	TN	종양크기	개시일	반응	주석
엠마	선암	III기	T4N1bNM0	1.8 cm 직경	94.8.11	PR 22주	SEB.S+GM-CSF
베이비	선암	II기	T1aN1bM0	2.6 cm 직경	94.9.12	PR 8주	SEB.S+GM-CSF
크리스타	비만세포암	IIIa기	적용불능	2 cm 미만 직경	94.7.27	SD 39주	SEB.S+GM-CSF
잭	비만세포암	IIIa기	적용불능	3 cm 미만 직경	95.3.28	PD 4주	SEB.S+GM-CSF
브리트	갑상선암	III	T3bNOM0	7 cm 미만 직경	94.10.14	SD 16주	SEB.S+GM-CSF
던칸	흑색종발	적용불능 (전이)	T2N1M0	4 cm 미만 직경	94.8.11	SD 20주	SEB.S+GM-CSF
빌리	흑색종발	적용불능 (전이)	T0N1bM0	LN 3.5 cm	95.1.10	CR 17주	SEB.S+GM-CSF
스코체	편평세포암편도선	적용불능	T3NOM0	4 cm 직경	95.3.27	SD	SEB.S+GM-CSF

본 연구에 의하면 독성은 어떠한 동물에서도 관찰되지 않았다. 선암을 가진 동물에서 종양 반응 (1기 종양의 부분적인 경감)이 관찰되지 않았으며 어느 동물도 본 연구의 기간내에 추가의 전이 질병이 형성되지 않았다. 크고 전이성이며 (임파선 전이), 비-구강 흑색종을 가진 한 마리 개(빌리)의 치료는 암의 완전한 경감 결과를 낳았다. 크고 전이성이며 (임파선 전이), 비-구강 흑색종을 가진 다른 한 마리 개(던칸)의 치료는 암의 지속된 안정화 결과를 낳았다. 갑상선 암을 가진 개(브리트)도 또한 한달에 한번의 주사로 암이 지속적으로 안정하였다. 비만세포 종양을 가진 개의 경우 반응율은 낮았다. 편평세포암에 대한 치료 효능은 평가의 초기단계에 있다. 병합한 경우의 결과는 PCR₃-SEB.S DNA 및 PCR₃-GM DNA가 실시예 9에서 이미 보고된 흑색종이외에 다수의 종양 유형을 효과적으로 치료할 수 있음을 가리킨다.

실시예 11

본 실시예는 효능적이고 장기간 지속적인 T 세포 결실을 유도하는 근육세포내로의 PCR₃-SEA.S DNA의 주사를 예시한다.

4 그룹의 마우스 B10.BR (그룹당 2 내지 3마리)를 다음과 같이 준비하였다. 미치료된 마우스(대조 마우스)로 이루어진 그룹(1); 100 ng의 재조합 SEA (rSEA) 단백질로 복강내로 주사된 마우스로 이루어진

그룹(2); 100 g의 PCR₃-SEA.S DNA (다리당 50 g, 총 100 g/마우스)로 근육내 주사된 마우스로 이루어

진 그룹(3); 100 g의 PCR₃ (삽입체 없음; 모의) DNA (다리당 50 g, 총 100 g/마우스)로 근육내 주사된

마우스로 이루어진 그룹(4). 주사하기전에 멸균 PBS중에 100 g의 DNA 50:50 (v:v)를 함유한 용액 100 l

로 희석시켜 DNA 샘플을 준비하였다. 리더서열이 없는 평삭된 SEA.S 단백질을 암호화한 재조합 분자 PKK223 (존 카플러 박사로부터 입수)으로 형질전환된 이. 콜라이 세포의 배양물로부터 rSEA 단백질을 정제하였다.

주사후 처음 72시간에 마우스의 꼬리에 출혈을 내고 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석을 위해 PBMC를 준비하였다. 세포를 모노클로날 항체 FITC 결합된-GK1.5 항체, 바이오틴닐화된-KJ25 항체 및 바이오틴닐화

된-F23.1로 이중 표지하여 각각 CD4, TCR V 3 및 TCR V 8 발현에 대해 분석하였다. EPICS-C 유동 세포계측기로 표지된 세포를 분석하였다.

CD4를 발현하고 또한 V 3 또는 V 8를 발현한 실험 마우스로부터 분리된 세포비율을 계산하고 대조 마우스

로부터 분리된 세포에의해 발현된 비율과 비교하였다. PBMC중의 CD4+ 및 V 3+ T 세포의 평균 비율을 주사

후 시간경과에 따라 점적하였다. 이 결과는 도8에 나타나 있으며 CD4+ 및 V 3+ T 세포의 비율이 PCR₃-SEA.S DNA가 근육내 주사된 마우스의 PBMC에서 급속히 감소하였으나 모의 DNA가 주사된 모의 마우스에서

는 감소하지 않았음을 가리킨다. V 8+ 세포의 비율은 영향을 받지않았다. 이 결과는 SEA 단백질이 마우스

V 8+ T 세포에 결합하지 않기때문에 예측된 것이다. CD4+ 및 V 3+ T 세포의 비율감소는 재조합 SEA 단백질(rSEA)로 주사된 마우스에서 만큼 급속히 일어났다. 그러나, PCR₃-SEA.S DNA로 주사된 마우스에서 그후 2개월에 걸쳐 관찰된 제거는 더 이상 지속되지 않았으며 SEA.S 단백질의 주사에 의해 유도된 제거보다 더

현저하였다. 또한, 2 g에 못미치는 PCR₃-SEA.S DNA의 주사는 또한 V 3+ T 세포의 제거를 유도하였다. 따라서, 슈퍼항원을 암호화한 DNA의 근육내 주사는 잠재적으로 해로운 T 세포(예, 자가반응성 T 세포)의 제거 또는 억제를 위한 효능적이고 무독성적인 방법이 된다.

실시에 12

본 실시예는 면역원 및 케모킨 암호화 재조합 분자의 제조를 예시한다.

난알부민(OVA)의 암호화 cDNA를 진핵성 발현벡터 PCR₃내로 연결시켜 OVA 암호화 재조합 분자를 제조하였으며 PCR₃-OVA로 명명하였다. 본 분야의 표준방법을 사용하여 LPS-자극된 정상적인 쥐 골수 대식세포로부터

분리된 RNA로부터 쥐 RANTES, 쥐 대식세포 염증성 단백질-1 알파 (MIP-1) 및 쥐 대식세포 염증성 단백질

-베타(MIP-1)를 암호화한 cDNA를 제조하였다. cDNA를 발현벡터 PCR₃ 내로 연결하였으며 생성물을 각각

PCR₃-RANTES, PCR₃-MIP-1 및 PCR₃-MIP-1 로 명명하였다. 모든 플라스미드 DNA를 염화세슘 구배 원심분리에 의해 정제하고 멸균 PBS중에 1.0 mg/ml로 재현탁하였다.

실시에 13

본 실시예는 부형제 DNA 및 면역원 DNA의 동시투여가 면역원 단백질에 대하여 항체생성을 자극한다는 것을 증명한다.

그룹당 4마리 CB6 F1 마우스의 별도 그룹들에 다음의 DNA 혼합물로 2회 주사하였다: (1) 약 100 g PCR₃-

OVA+약 100 g PCR₃-MIP-1 ; (2) 약 100 g PCR₃-OVA+약 50 g PCR₃-SEB (실시예1에 기술됨)+PCR₃-GM-CSF

(실시예1에 기술됨); (3) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g PCR₃-RANTES; (4) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g

PCR₃-SEB; (5) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g PCR₃-GM-CSF; 또는 (6) 약 100 g PCR₃-OVA 단독. 6 마리 미-주사된 선천성 마우스를 포함한 대조 샘플을 또한 준비하였다. 주사전에 DNA를 멸균 포스페이트 완충 염수(PBS)중에 0.5 mg/ml의 최종 농도로 희석하였다. 마우스를 이의 사두 근육에 근육내 양측에서 주사하였

다 (사두당 약 100 g의 DNA).

단계 B의 면역화후 약 20일 지나, 각각의 마우스로부터 혈청을 수거하고 본 분야에 표준 방법을 사용한 OVA-특이적 효소 연결된 면역검정(ELISA)을 사용하여 OVA 단백질과 특정적으로 결합하는 항체에 대해 검정하였다. 요약하면, OVA 단백질을 ELISA 평판에 결합시켰다. 평판을 세척한 다음 혈청의 존재하에 배양하였다. 다시 평판을 세척하고 이어서 HRP-결합된 항-마우스 IgG 항체의 존재하에 배양하였다. OVA에 결합된 항체의 양을 ELISA 판독기에서 검출하고 흡광단위로 표시되었다.

ELISA의 결과는 도9에 나타나 있으며 OVA 암호화 DNA를 RANTES 또는 MIP-1 암호화 DNA와 함께 또는 SEB와 GM-CSF 암호화 DNA와 함께 동시 투여했을때 OVA 단독, OVA+SEB 단독 또는 대조 샘플의 투여로 관찰된

것에 비하여 OVA에 대한 항체반응이 증가됨을 가리킨다. 따라서, RANTES, MIP-1 또는 SEB와 GM-CSF의 발현은 DNA 백신으로서 투여됐을때 OVA에 대한 항체반응을 증가시킨다.

실시예 14

본 실시예는 DNA 부형제와 면역원 DNA의 동시투여는 인터페론 감마의 생성 결과를 낳는다는 사실을 증명한다.

그룹당 4마리의 CB6 F1 마우스의 별도 그룹에 다음의 DNA 혼합물을 근육내로 1일 및 21일째에 2회 주사하

였다: (1) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g PCR₃-MIP-1 ; (2) 약 100 g PCR₃-OVA+약 50 g PCR₃-SEB +PCR₃-

GM-CSF; (3) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g PCR₃-RANTES; (4) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g PCR₃-SEB;

(5) 약 100 g PCR₃-OVA+약 100 g PCR₃-GM-CSF; 또는 (6) 약 100 g PCR₃-OVA 단독. 또한 대조 샘플을 상기된 바와 같이 준비하였다.

마우스를 27일째에 치사시켰다. 비장 세포를 각각의 마우스로부터 수거하고 4중 웰에서 조사된 OVA-형질 감염된 세포 (EG7-OVA)로 시험관내에서 재자극하였다. 조사된 EG7-OVA 세포로의 재자극 4일째 상등물을 배양물로부터 수거하고 인터페론-특이적 ELISA 검정을 사용하여 인터페론 감마 활성화에 대해 검정하였다. 결과는 유닛/ml의 인터페론 활성으로서 표시하고 재조합 쥐 인터페론-감마로 발생된 표준곡선과 비교하여 측정하였다.

이 결과는 도10에 나타나 있으며 RANTES 또는 GM-CSF가 인터페론-감마 생성을 유도하는데 효과적인 화합

물이었음을 가리킨다. 비록 적을 지라도 SEB 및 MIP-1 도 또한 인터페론-감마 생성을 유도하였다. 추가의 실험 본 실험에서 평가된 부형제중 어떠한 것도 상당한 양의 IL-4 분비를 유도하지 않았음을 보여주었다. 또한, 이들 데이터는 본 발명의 부형제에 의해 유도된 면역반응이 대식세포 활성화, 강화된 T 세포 CTL 활성 및 증가된 MHC 발현을 포함하여 주로 세포-중재된 면역성을 유도하는 Th1 반응임을 가리킨다.

실시예 15

본 실시예는 부형제 DNA 및 면역원 DNA의 동시투여가 면역원에 대한 T 세포 증식 반응을 유도함을 증명한다.

그룹당 4마리 CB6 F1 마우스의 별도 그룹을 실시예 14에 기술된 프로토콜을 사용하여 면역화하였다. 동물을 27일째에 처사시키고 실시예 14에 기술된 방법을 사용하여 재자극된 비장 세포를 수거하였다. 약 4일

간의 재자극후, 각각의 웰로부터 100 I 분취량의 세포를 수거하고 18시간동안 ³H-티미딘으로 펄스하였다. 그런다음, 티미딘 혼입을 형질감염된 EG7-OVA 세포주에 의해 발현된 OVA에 대한 증식반응치로서 정량(cpm)하였다.

이 결과는 도11에 나타나 있으며 MIP-1, RANTES, SEB+GM-CSF 및 SEB 단독을 OVA DNA와 함께 동시투여했을 때 OVA에 대한 증식반응의 실질적인 증가를 유도함을 가리킨다. 따라서, 이들 데이타는 케모킨 및 SAg의 암호화 DNA가 세포-중재된 면역 반응을 강화하는데 유용하며 그럼으로써 DNA 백신 부형제로서 유용하다는 증거를 제공한다.

실시예 16

본 실시예는 부형제 DNA의 동시투여가 면역원 알부민에 대한 CTL 반응을 증가시킴을 증명한다.

마우스를 실시예 14에 기술된 프로토콜을 사용하여 면역화하였다. 최종 면역접종후 7일 경과하여 면역화된 마우스로부터 비장 세포를 수거하였다. 그런다음 세포를 조사된 EG7-OVA 세포로 6일동안 시험관내에서 재자극하였다. 이어서 T 세포를 재자극된 세포군으로부터 수거하고 CTL 활성화에 대한 표준 4시간 크롬 방출 검정을 위해 점차 숫자를 줄여가면서 ⁵¹Cr-표지된 EG7-OVA 또는 EL-4 표적 세포에 첨가하였다. 세포 용해율을 특정한 다음 표지된 표적 세포의 특정 세포 용해율의 값으로서 정량(cpm)하였다. 특정 용해율이 높은면 높을 수록 CTL 활성화는 T 세포에 의해 더욱 더 나타난다.

이 결과는 도12에 나타나 있으며 평가된 모든 부형제 DNA는 OVA 단독과 비교하여 증가된 CTL 활성을 유도하였음을 가리킨다. RANTES, GM-CSF 및 SEB 단독의 사용은 CTL 활성을 유도하는데 효과적이었다. 이들 데이타는 케모킨 DNA의 동시투여가 형질감염된 세포주에서 발현된 OVA에 의해 예시된 바와 같이 세포내 면역원에 대한 CTL-중재된 면역성을 증강시킬 수 있음을 가리키며 이점은 이러한 방법이 세포내 병원체에 대한 백신을 위해 유용함을 시사한다.

실시예 12 내지 16의 전체적인 결과는 모든 피검 DNA 부형제 (GM-CSF, SEB, SEB+GM-CSF, RANTES 및 MIP-

1)가 면역원 알부민에 대하여 세포 중재된 면역성을 증진시켰음을 시사한다. 특히, SEB 또는 GM-CSF 단독의 사용 뿐만아니라 SEB+GM-CSF 배합물의 사용은 세포 중재된 면역성을 유도하는데 효과적이었다.

서열 리스트

다음의 서열 리스트를 37 CFR § 1.821.에 의거 제출한다. 또한 컴퓨터 판독형의 사본도 본원에 첨부한다.

37 CFR § 1.821(f)에 의거 주장되는 서열1 내지 13은 다음과 같다.

(1) 일반정보:

(i) 출원인: 스티브 더블유. 다우

로빈 이. 엘름슬리

테런스 에이. 포터

(ii) 발명의 명칭: 주효세포 조절을 위한 유전자요법

(iii) 서열 수: 13개

(iv) 연락 주소:

(A) 수신인: 세리단 로스 앤드 맥킨토시

(B) 스트리트: 1700 링컨 스트리트, 스위트 3500

(C) 시: 덴버

(D) 주: 콜로라도

(E) 국가: 미국

(F) 우편번호: 80203

(v) 컴퓨터 판독형태:

(A) 매개체: 플로피 디스크

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환형

- (C) 작동시스템: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어: PatentIn Release #1.0, 버전 #1.25
- (vi) 현재 출원 데이터:
- (A) 출원번호:
- (B) 출원일:
- (C) 분류:
- (viii) 변리사/대리인 정보:
- (A) 성명: 개리 제이. 코널
- (B) 등록번호: 32,020
- (C) 사건번호: 2879-29-C1-PCT
- (xi) 연락방법:
- (A) 전화: (303) 863-9700
- (B) 팩스: (303) 863-0223
- (2) 서열1에 대한 정보:
- (i) 서열특징:
- (A) 길이: 773 염기쌍
- (B) 종류: 핵산
- (C) 가닥: 일본쇄
- (D) 형상: 직선형
- (ii) 분자종류: 단백질
- (ix) 특징:
- (A) 이름/기호: CDS
- (B) 위치: 1..768
- (xi) 서열기술: 서열1

(서열 1)

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AAT TCC ATG Met Thr Met Ile Thr Asn Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Asn Ser Met 1 5 10 15	48
GAG AGT CAA CCA GAT OCT AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA Glu Ser Gln Pro Asp Pro Lys Pro Asp Glu Leu His Lys Ser Ser Lys 20 25 30	96
TTC ACT GGT TTG ATG GAA AAT ATG AAA GTT TTG TAT GAT GAT AAT CAT Phe Thr Gly Leu Met Glu Asn Met Lys Val Leu Tyr Asp Asp Asn His 35 40 45	144
GTA TCA GCA ATA AAC GTT AAA TCT ATA GAT CAA TTT CTA TAC TTT GAC Val Ser Ala Ile Asn Val Lys Ser Ile Asp Gln Phe Leu Tyr Phe Asp 50 55 60	192
TTA ATA TAT TCT ATT AAG GAC ACT AAG TTA GGG AAT TAT GAT AAT GTT Leu Ile Tyr Ser Ile Lys Asp Thr Lys Leu Gly Asn Tyr Asp Asn Val 65 70 75 80	240
CGA GTC GAA TTT AAA AAC AAA GAT TTA GCT GAT AAA TAC AAA GAT AAA Arg Val Glu Phe Lys Asn Lys Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Lys Asp Lys 85 90 95	288
TAC GTA GAT GTG TTT GGA GCT AAT TAT TAT TAT CAA TGT TAT TTT TCT Tyr Val Asp Val Phe Gly Ala Asn Ser Tyr Tyr Gln Cys Tyr Phe Ser 100 105 110	336
AAA AAA ACG AAT GAT ATT AAT TCG CAT CAA ACT GAC AAA CGA AAA ACT Lys Lys Thr Asn Asp Ile Asn Ser His Gln Thr Asp Lys Arg Lys Thr 115 120 125	384
TGT ATG TAT GGT GGT GTA ACT GAG CAT AAT GGA AAC CAA TTA GAT AAA Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Glu His Asn Gly Asn Gln Leu Asp Lys 130 135 140	432
TAT AGA AGT ATT ACT GTT CGG GTA TTT GAA GAT GGT AAA AAT TTA TTA Tyr Arg Ser Ile Thr Val Arg Val Phe Glu Asp Gly Lys Asn Leu Leu 145 150 155 160	480
TCT TTT GAC GTA CAA ACT AAT AAG AAA AAG GTG ACT OCT CAA GAA TTA Ser Phe Asp Val Gln Thr Asn Lys Lys Lys Val Thr Ala Gln Glu Leu 165 170 175	528
GAT TAC CTA ACT CGT CAC TAT TTG GTG AAA AAT AAA AAA CTC TAT GAA Asp Tyr Leu Thr Arg His Tyr Leu Val Lys Asn Lys Lys Leu Tyr Glu 180 185 190	576
TTT AAC AAC TCG CCT TAT GAA ACG GGA TAT ATT AAA TTT ATA GAA AAT Phe Asn Asn Ser Pro Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Glu Asn 195 200 205	624
GAG AAT AGC TTT TGG TAT GAC ATG ATG CCT GCA CCA GGA GAT AAA TTT Glu Asn Ser Phe Trp Tyr Asp Met Met Pro Ala Pro Gly Asp Lys Phe 210 215 220	672
GAC CAA TCT AAA TAT TTA ATG ATG TAC AAT GAC AAT AAA ATG GTT GAT Asp Gln Ser Lys Tyr Leu Met Met Tyr Asn Asp Asn Lys Met Val Asp 225 230 235 240	720
TCT AAA GAT GTG AAG ATT GAA GTT TAT CTT ACG ACA AAG AAA AAG Ser Lys Asp Val Lys Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys Lys Lys 245 250 255	765

(2) 서열2에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 255개 아미노산

(B) 종류: 아미노산

(C) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: 단백질

(xi) 서열기술: 서열2

(서열 2)

```

Met Thr Met Ile Thr Asn Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Asn Ser Met
 1          5          10          15
Glu Ser Gln Pro Asp Pro Lys Pro Asp Glu Leu His Lys Ser Ser Lys
          20          25          30
Phe Thr Gly Leu Met Glu Asn Met Lys Val Leu Tyr Asp Asp Asn His
          35          40          45
Val Ser Ala Ile Asn Val Lys Ser Ile Asp Gln Phe Leu Tyr Phe Asp
          50          55          60
Leu Ile Tyr Ser Ile Lys Asp Thr Lys Leu Gly Asn Tyr Asp Asn Val
          65          70          75          80
Arg Val Glu Phe Lys Asn Lys Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Lys Asp Lys
          85          90          95
Tyr Val Asp Val Phe Gly Ala Asn Tyr Tyr Tyr Gln Cys Tyr Phe Ser
          100          105          110
Lys Lys Thr Asn Asp Ile Asn Ser His Gln Thr Asp Lys Arg Lys Thr
          115          120          125
Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Glu His Asn Gly Asn Gln Leu Asp Lys
          130          135          140
Tyr Arg Ser Ile Thr Val Arg Val Phe Glu Asp Gly Lys Asn Leu Leu
          145          150          155          160
Ser Phe Asp Val Gln Thr Asn Lys Lys Lys Val Thr Ala Gln Glu Leu
          165          170          175
Asp Tyr Leu Thr Arg His Tyr Leu Val Lys Asn Lys Lys Leu Tyr Glu
          180          185          190
Phe Asn Asn Ser Pro Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Glu Asn
          195          200          205
Glu Asn Ser Phe Trp Tyr Asp Met Met Pro Ala Pro Gly Asp Lys Phe
          210          215          220
Asp Gln Ser Lys Tyr Leu Met Met Tyr Asn Asp Asn Lys Met Val Asp
          225          230          235          240
Ser Lys Asp Val Lys Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys Lys Lys
          245          250          255

```

(2) 서열3에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 751 염기쌍

(B) 종류: 핵산

(C) 가닥: 일본쇄

(D) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: 단백질

(ix) 특징:

(A) 이름/기호: CDS

(B) 위치: 46..747

(xi) 서열기술: 서열3

(서열 3)

ATGACCATGA TTACGAATTT AATACGACTC ACTATAGGGA ATTCC ATG GAG AAA Met Glu Lys 1	54
AGC GAA GAA ATA AAT GAG AAA GAT CTG CGC AAG AAG TCC GAA TTG CAG Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser Glu Leu Gln 5 10 15	102
GGA ACA GCC CTA GGC AAT CTT AAA CAA ATC TAT TAT TAC AAT GAA AAA Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr Asn Glu Lys 20 25 30 35	150
GCG AAG ACT GAG AAT AAA GAG AGT CAC GAT CAA TTT CTG CAG CAT ACT Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu Gln His Thr 40 45 50	198
ATA TTG TTT AAA GGC TTT TTT ACT GAT CAT TCG TGG TAT AAC GAT TTA Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr Asn Asp Leu 55 60 65	246
CTA GTA GAT TTT GAT TCG AAG GAC ATC GTT GAT AAA TAT AAA GCG AAG Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr Lys Gly Lys 70 75 80	294
AAG GTC GAC TTG TAT GGT GCT TAT TAT GGG TAC CAA TGT GCT GGT GGT Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys Ala Gly Gly 85 90 95	342
ACA CCA AAC AAA ACA GCA TGC ATG TAT GGT GGG GTA ACC TTA CAT GAC Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Leu His Asp 100 105 110 115	390
AAT AAT CGA TTG ACC GAA GAG AAA AAG GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn Leu Trp Leu 120 125 130	438
GAC GGT AAA CAA AAT ACA GTA CCT CTA GAA ACG GTT AAA ACG AAT AAG Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys Thr Asn Lys 135 140 145	486
AAA AAT GTA ACT GTC CAA GAG CTG GAT CTT CAA GCG CGC CGA TAC CTA Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg Arg Tyr Leu 150 155 160	534
CAG GAA AAA TAT AAT TTG TAC AAC TCT GAC GTC TTT GAT GGG AAG GTT Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp Gly Lys Val 165 170 175	582
CAG AGA GGC CTA ATC GTG TTT CAT ACT TCT ACA GAA CCT TCG GTT AAC Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro Ser Val Asn 180 185 190 195	630
TAC GAT TTA TTT GGA GCT CAA GGA CAG TAT TCA AAT ACA CTC TTA AGA Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr Leu Leu Arg 200 205 210	678
ATA TAT CGC GAC AAC AAG ACG ATT AAC TCT GAA AAC ATG CAC ATT GAT Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met His Ile Asp 215 220 225	726
ATC TAT TTA TAT ACA AGT TAAGCTT Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser 230	754

(2) 서열4에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 233개 아미노산

(B) 종류: 아미노산

(C) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: 단백질

(xi) 서열기술: 서열4

(서열 4)

```

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

```

(2) 서열5에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 582 염기쌍

(B) 종류: 핵산

(C) 가닥: 일본쇄

(D) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: 단백질

(ix) 특징:

(A) 이름/기호: CDS

(B) 위치: 1..582

(xi) 서열기술: 서열5

(서열 5)

```

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

```

(2) 서열6에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 194개 아미노산

(B) 종류: 아미노산

(C) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: 단백질

(xi) 서열기술: 서열6

(서열 6)

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

(2) 서열7에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 25 염기쌍

(B) 종류: 핵산

(C) 가닥: 일본쇄

(D) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: DNA (게놈성)

(xi) 서열기술: 서열5

(서열 7)

GGGAATTCCA TGGAGAGTCA ACCAG**25**

(2) 서열8에 대한 정보:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 23 염기쌍

(B) 종류: 핵산

(C) 가닥: 일본쇄

(D) 형상: 직선형

(ii) 분자종류: DNA (게놈성)

(xi) 서열기술: 서열8

(서열 8)

GCGGATCCTC ACTTTTCTT TGT**23**

(2) 서열9:

(i) 서열특징:

(A) 길이: 22 염기쌍

(B) 종류: 핵산

- (C) 가닥: 일본쇄
 (D) 형상: 직선형
 (ii) 분자종류: DNA (게놈성)
 (xi) 서열기술: 서열9
 (서열 9)

GGGAATTCCA TGGAGAAAAG CG

22

- (2) 서열10에 대한 정보:
 (i) 서열특징:
 (A) 길이: 25 염기쌍
 (B) 종류: 핵산
 (C) 가닥: 일본쇄
 (D) 형상: 직선형
 (ii) 분자종류: DNA (게놈성)
 (xi) 서열기술: 서열10
 (서열 10)

GCAAGCTTAA CTTGTATATA AATAG

25

- (2) 서열11에 대한 정보:
 (i) 서열특징:
 (A) 길이: 51 염기쌍
 (B) 종류: 핵산
 (C) 가닥: 일본쇄
 (D) 형상: 직선형
 (ii) 분자종류: DNA (게놈성)
 (xi) 서열기술: 서열11
 (서열 11)

CGGGGTACCC CGAAGGAGGA AAAAAAATG TCTACAAACG ATAATATAAA G

51

- (2) 서열12에 대한 정보:
 (i) 서열특징:
 (A) 길이: 42 염기쌍
 (B) 종류: 핵산
 (C) 가닥: 일본쇄
 (D) 형상: 직선형
 (ii) 분자종류: DNA (게놈성)
 (xi) 서열기술: 서열12
 (서열 12)

TGCTCTAGAG CATTAAATTA TTTCTGCTTC TATAGTTTTT AT

42

- (2) 서열13에 대한 정보:
 (i) 서열특징:
 (A) 길이: 279 염기쌍
 (B) 종류: 핵산
 (C) 가닥: 일본쇄
 (D) 형상: 직선형
 (ii) 분자종류: DNA (게놈성)

(xi) 서열기술: 서열 13

(서열 13)

ACCATGAAGA TCTCTGCAAC TGCCCTCACC ATCATCCTCA CTGCAGCCGC CCTCTGGGCG 60
CCCGCGCCTG CCTCACCATA TGGCTCGGAC ACCACTCCCT GCTGCTTTGC CTACCTCTCC 120
CTCGCGCTGC CTCGTGCCCCA CGTCAAGGAG TATTTCTACA CCAGCAGCAA GTGCTCCAAT 180
CTTGCACTCG TGTTTGTCAC TCGAAGGAAC CGCCAAGTGT GTCCAACCC AGAGAAGAAG 240
TGGGTTCAAG AATACATCAA CTATTGCGAG ATGAGCTAG 279

본 발명의 여러 가지 양태가 상세하게 기술되었다. 이를 기초로 본 분야 전문가는 본 발명의 양태를 변형 및 개조할 수 있음은 자명하다. 따라서, 그러한 변형 및 개조는 이하의 청구범위에 기재된 바와 같은 본 발명의 범위내에 속하는 것으로 이해되어야 할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 핵산분자, 케모킨을 암호화한 핵산분자 및 이들 둘의 혼합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 분리된 핵산분자를 포함하고 상기 분리된 핵산분자가 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 치료조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 스타필로코커스 내독소, 레트로바이러스 항원, 스트렙토코커스 항원, 마이코플라스마 항원, 마이코박테리아 항원, 바이러스 항원 및 원생생물 항원으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 스타필로코커스 내독소를 포함하는 치료조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 마우스 선종양 바이러스, 레비즈 바이러스 및 헤르페스 바이러스로 이루어진 그룹중에서 선택된 바이러스로부터 유도되는 치료조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 사이토킨이 조혈세포 성장인자, 인터루킨, 인터페론, 면역글로불린 과부류 분자, 종양괴사인자 부류 분자 및 케모킨으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자, 대식세포 콜로니 자극인자, 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-2, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 인터루킨-12 및 인터루킨-15로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자 및 종양괴사인자 로 이루어진 그룹중에서 선택되는

치료조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자를 포함하는 치료조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 케모킨이 C5a, IL-8, (xi), MIP1, MIP1, MCP-1, MCP-3, PAFR, FMLPR, LTB₄R, GRP, RANTES, 에오탁신, 림포탁신, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 및 MGSA/gro로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 케모킨이 IL-8, MIP1, MIP1, MCP-1, MCP-3, RANTES 및 NAP-2로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 케모킨이 IL-8, RANTES, MIP1 및 MIP1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 분리된 핵산분자가 포유동물 세포에서 발현될 수 있도록 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 치료조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 전사 조절 서열이 RSV 조절 서열, CMV 조절 서열, 레트로 바이러스 LTR 서열, SV-40 조절 서열 및

-액틴 조절 서열로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

슈퍼항원을 암호화한 상기 분리된 핵산분자가 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 재조합 분자를 포함하는 치료조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

사이토킨을 암호화한 상기 분리된 핵산분자가 PCR₃-GM₃을 포함하는 치료조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

케모킨을 암호화한 상기 분리된 핵산분자가 PCR₃-RANTES, PCR₃-MIP1 및 PCR₃-MIP1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 18

제1항에 있어서,

생리수용액, 합성 지질-함유 기질, 천연 지질-함유 기질, 오일, 에스테르, 글라이콜, 바이러스 및 금속입자로 이루어진 그룹중에서 선택된 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 치료조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜 및 생리수용액으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 20

제1항에 있어서,

병원체, 알레르겐, 종양항원 및 자가항원으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역원을 추가로 포함하는 치료조성물.

청구항 21

제1항에 있어서,

마이코박테리움 튜버쿨로시스로부터 유도된 펩타이드를 포함한 면역원을 추가로 포함하는 치료조성물.

청구항 22

(a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 제1 핵산 분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 핵산분자 및 케모킨을 암호화한 핵산분자로 이루어진 그룹중에서 선택된 분리된 제2 핵산분자를 포함하고 상기 분리된 핵산분자가 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 재조합 분자.

청구항 23

제22항에 있어서,

RSV 조절서열, CMV 조절서열, 레트로바이러스 LTR 조절서열, SV-40 조절서열 및 -액틴 조절서열로 이루어진 그룹중에서 선택된 전사조절서열을 함유하는 재조합 분자.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 재조합 분자가 디시스트론성이고 IRES를 포함하는 분자.

청구항 25

제22항에 있어서,

상기 제1 핵산분자 및 상기 제2 핵산분자가 IRES에 의해 분리되어 있는 분자.

청구항 26

제22항에 있어서,

상기 제1 핵산분자가 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 슈퍼항원을 암호화하는 분자.

청구항 27

제22항에 있어서,

상기 핵산분자가 대식세포 콜로니 자극인자, 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-2, 인터루킨-4, 인터

루킨-6, 인터루킨-12, 인터루킨-15, C5a, IL-8, MIP1, MIP1, MCP-1, MCP-3, PAFR, FMLPR, LTB₄R, GRP, RANTES, 에오타신, 림포타신, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 및 MGSA/gro로 이루어진 그룹중에서 선택된 단백질을 암호화하는 분자.

청구항 28

(a) 제1 슈퍼항원을 암호화한 분리된 제1 핵산 분자 및 (b) 제2 슈퍼항원을 암호화한 분리된 제2 핵산분자를 포함하고 상기 분리된 핵산분자가 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 재조합 분자.

청구항 29

제28항에 있어서,

RSV 조절서열, CMV 조절서열, 레트로바이러스 LTR 조절서열, SV-40 조절서열 및 -액틴 조절서열로 이루어진 그룹중에서 선택된 전사조절서열을 함유하는 재조합 분자.

청구항 30

제28항에 있어서,

상기 재조합 분자가 디시스트론성이고 IRES를 포함하는 분자.

청구항 31

제28항에 있어서,

상기 제1 핵산분자 및 상기 제2 핵산분자가 IRES에 의해 분리되어 있는 분자.

청구항 32

제28항에 있어서,

상기 제1 핵산분자가 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 슈퍼항원을 암호화하는 분자.

청구항 33

(a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 제1 핵산 분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 핵산분자, 케모킨을 암호화한 핵산분자 및 이들 둘의 혼합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 분리된 제2 핵산분자 (여기서, 상기 분리된 모든 핵산분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있다)를 함유한 전달 비히클을 포함한 치료조성물.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 전달 비히클이 리포솜을 포함하는 치료조성물.

청구항 35

제33항에 있어서,

상기 제1 핵산분자가 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 슈퍼항원을 암호화하는 치료조성물.

청구항 36

제33항에 있어서,

상기 제2 핵산분자가 대식세포 콜로니 자극인자, 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-2, 인터루킨-4,

인터루킨-6, 인터루킨-12, 인터루킨-15, C5a, IL-8, MIP1, MIP1, MCP-1, MCP-3, PAFR, FMLPR, LTB₄R, GRP, RANTES, 에오타신, 림포타신, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 및 MGSA/gro로 이루어진 그룹중에서 선택된 단백질을 암호화하는 치료조성물.

청구항 37

제33항에 있어서,

상기 전달 비히클이 면역원을 암호화한 핵산분자를 추가로 함유하는 치료조성물.

청구항 38

제33항에 있어서,

상기 전달 비히클이 마이코박테리움 튜버쿨로시스로부터 유도된 펩타이드를 추가로 함유하는 치료조성물.

청구항 39

하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 분리된 슈퍼항원 암호화 핵산분자를 함유한 전달 비히클을 포함하는 치료조성물.

청구항 40

제39항에 있어서,
상기 전달 비히클이 리포솜을 포함하는 치료조성물.

청구항 41

제39항에 있어서,
상기 핵산분자가 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 슈퍼항원을 암호화하는 치료조성물.

청구항 42

제39항에 있어서,
상기 전달 비히클이 사이토킨, 케모킨 및 면역원으로 이루어진 그룹중에서 선택된 단백질을 암호화한 핵산분자를 추가로 함유하는 치료조성물.

청구항 43

제39항에 있어서,

상기 전달 비히클이 대식세포 콜로니 자극인자, 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-2, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 인터루킨-12, 인터루킨-15, C5a, IL-8, MIP1, MIP1, MCP-1, MCP-3, PAFR, FMLPR, LTB₄R, GRP, RANTES, 에오타신, 림포타신, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 및 MGSA/gro로 이루어진 그룹중에서 선택된 단백질을 암호화하는 핵산분자를 추가로 함유하는 치료조성물.

청구항 44

제39항에 있어서,
상기 전달 비히클이 마이코박테리움 튜버쿨로시스로부터 유도된 펩타이드를 추가로 함유하는 치료조성물.

청구항 45

하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 분리된 슈퍼항원 암호화 핵산분자 및 면역원을 함유한 전달 비히클을 포함하는 부형제 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서,
사이토킨, 케모킨 및 이들 둘의 혼합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 단백질을 암호화한 핵산분자를 추가로 포함하는 부형제 조성물.

청구항 47

제45항에 있어서,
상기 면역원이 핵산분자 및 펩타이드로 이루어진 그룹중에서 선택된 화합물을 포함하는 부형제 조성물.

청구항 48

제45항에 있어서,
면역원을 암호화한 핵산분자 약 50% 이하 및 슈퍼항원을 암호화한 핵산분자 약 50% 이하를 포함하는 부형제 조성물.

청구항 49

제45항에 있어서,
면역원을 암호화한 핵산분자 약 66% 이하 및 슈퍼항원을 암호화한 핵산분자 약 33% 이하를 포함하는 부형제 조성물.

청구항 50

제45항에 있어서,
면역원을 암호화한 핵산분자 약 50% 이하, 슈퍼항원을 암호화한 핵산분자 약 25% 이하 및 사이토킨을 암호화한 핵산분자, 케모킨을 암호화한 핵산분자 및 이들 둘의 혼합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 핵산분자 약 25%를 포함하는 부형제 조성물.

청구항 51

제45항에 있어서,
상기 핵산분자가 나상 DNA를 포함하는 부형제 조성물.

청구항 52

제45항에 있어서,
마이코박테리움 튜버쿨로시스로부터 유도된 펩타이드를 추가로 포함하는 부형제 조성물.

청구항 53

슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산분자 및 면역원을 포함한 유효량의 부형제 조성물을 동물에 투여하여 동물체내에 주효세포 면역성을 증가시키는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서,
상기 부형제 조성물이 사이토킨, 케모킨 및 이들 둘의 혼합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 단백질을 암호화한 핵산분자를 추가로 포함하는 방법.

청구항 55

제53항에 있어서,
상기 부형제 조성물이 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 56

제53항에 있어서,
상기 투여단계가 부형제 조성물을 특정 조직부위내로 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내 또는 직접 주사함을 포함하는 방법.

청구항 57

제53항에 있어서,
상기 동물이 포유동물인 방법.

청구항 58

제53항에 있어서,
상기 동물이 사람, 말, 개, 고양이 및 소로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 59

(a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 핵산분자, 케모킨을 암호화한 핵산분자 및 이들 둘의 혼합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 분리된 핵산분자 (여기서, 상기 모든 분리된 핵산분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있다)를 포함하는 유효량의 치료조성물을 동물에 투여하여 암을 가진 동물을 치료하는 방법.

청구항 60

제59항에 있어서,
상기 치료조성물이 생리수용액, 합성 지질-함유 기질, 천연 지질-함유 기질, 오일, 에스테르, 글라이콜, 바이러스 및 금속입자로 이루어진 그룹중에서 선택된 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 61

제59항에 있어서,
약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜, 미셀, 세포 및 세포막으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 62

제59항에 있어서,
약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜을 포함하는 방법.

청구항 63

제59항에 있어서,
약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜을 종양세포에 특정적으로 겨냥할 수 있는 화합물을 포함하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서,
상기 화합물이 종양세포 리간드인 방법.

청구항 65

제59항에 있어서,
상기 치료조성물이 이를 동물의 암세포 부위내에 국소투여함으로써 그 암부위로 겨냥되는 방법.

청구항 66

제59항에 있어서,
상기 암이 흑색종, 편평세포암, 유방암, 두개암 및 구개암, 갑상선암, 연조직육종, 골육종, 고환암, 전립선암, 난소암, 방광암, 피부암, 뇌암, 혈관육종, 혈관성유종, 비만세포 종양, 1기간암, 폐암, 췌장암, 위장암, 신장세포암, 조혈세포 신형성, 백혈병 및 임파종로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 67

하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산분자를 포함한 유효량의 치료조성물을 생체내 종양세포내로 도입하여 암을 가진 동물을 치료하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서,
슈퍼항원을 암호화한 분리된 상기 핵산분자가 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 재조합 분자를 포함하는 방법.

청구항 69

제67항에 있어서,
상기 치료조성물이 리포솜을 포함한 약제학적으로 허용되는담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 70

제67항에 있어서,
상기 치료조성물이 리포솜을 종양세포로 특정적으로 겨냥할 수 있는 화합물 포함된 리포솜을 포함한 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 71

제70항에 있어서,
상기 화합물이 종양세포 지질인 방법.

청구항 72

제67항에 있어서,
상기 치료조성물이 이를 암세포 부위내에 국소투여함으로써 동물의 암부위로 겨냥되는 방법.

청구항 73

제67항에 있어서,
상기 치료조성물을 임파선을 포함한 부위로 동물에 투여하는 방법.

청구항 74

하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산분자를 포함한 유효량의 치료조성물을 비-종양 세포내로 도입하여 암을 가진 동물을 치료하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서,
상기 투여단계를 생체내에서 실행하는 방법.

청구항 76

제74항에 있어서,
슈퍼항원을 암호화한 분리된 상기 핵산분자가 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 재조합 분자를 포함하는 방법.

청구항 77

제74항에 있어서,

상기 치료조성물이 리포솜을 포함한 약제학적으로 허용되는담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 78

제74항에 있어서,

상기 치료조성물이 이를 암세포 부위내에 국소투여함으로써 동물의 암부위로 겨냥되는 방법.

청구항 79

제74항에 있어서,

상기 치료조성물을 임파선을 포함한 부위로 동물에 투여하는 방법.

청구항 80

(a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산분자-하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있다-를 포함한 유효량의 치료조성물을 동물에 투여하여 치료할 암 부위로 겨냥하여 암을 가진 동물을 치료하는 방법.

청구항 81

제80항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 스타필로코커스 내독소, 레트로바이러스 항원, 스트렙토코커스 항원, 마이코플라스마 항원, 마이코박테리아 항원, 바이러스 항원 및 원생생물 항원으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 82

제80항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 스타필로코커스 내독소를 포함하는 방법.

청구항 83

제80항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 84

제80항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 마우스 선종양 바이러스, 레비즈 바이러스 및 헤르페스 바이러스로 이루어진 그룹중에서 선택된 바이러스로부터 유도되는 방법.

청구항 85

제80항에 있어서,

상기 사이토킨이 조혈세포 성장인자, 인터루킨, 인터페론, 면역글로불린 과부류 분자, 종양괴사인자 부류 분자 및 케모킨으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 86

제80항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자, 대식세포 콜로니 자극인자, 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-6 및 인터루킨-12로 이루어진 그룹중에서 선택되는 치료조성물.

청구항 87

제80항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자 및 종양괴사인자 로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 88

제80항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자를 포함하는 방법.

청구항 89

제80항에 있어서,

상기 분리된 핵산분자가 포유동물 세포에서 발현될 수 있도록 하나 이상의 전사조절서열에 작동적으로 연결되어 있는 방법.

청구항 90

제80항에 있어서,

상기 전사조절서열이 RSV 조절서열, CMV 조절서열, 레트로바이러스 LTR 조절서열, SV-40 조절서열 및 -액틴 조절서열로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 91

제80항에 있어서,

상기 분리된 핵산분자가 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 재조합 분자를 포함하는 방법.

청구항 92

제80항에 있어서,

상기 치료조성물이 생리수용액, 합성 지질-함유 기질, 천연 지질-함유 기질, 오일, 에스테르, 글라이콜, 바이러스 및 금속입자로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜, 미셀, 세포 및 세포막으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 94

제92항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜을 포함하는 방법.

청구항 95

제92항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체가 리포솜을 종양세포에 특정적으로 겨냥할 수 있는 화합물을 포함하는 방법.

청구항 96

제95항에 있어서,

상기 화합물이 종양세포 리간드인 방법.

청구항 97

제80항에 있어서,

상기 치료조성물이 이를 동물의 암세포 부위내에 국소투여함으로써 그 암부위로 겨냥되는 방법.

청구항 98

제80항에 있어서,

상기 암이 흑색종, 편평세포암, 유방암, 두개암 및 구개암, 갑상선암, 연조직육종, 골육종, 고환암, 전립선암, 난소암, 방광암, 피부암, 뇌암, 혈관육종, 혈관섬유종, 비만세포 종양, 1기간암, 폐암, 췌장암, 위장암, 신장세포암, 조혈세포 신형성, 백혈병 및 임파종로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 99

제80항에 있어서,

상기 암이 흑색종, 폐암, 갑상선암, 유방암, 신장세포암, 편평세포암, 뇌종양 및 피부암으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 100

제80항에 있어서,

상기 동물이 포유동물 및 조류로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 101

제80항에 있어서,

상기 동물이 사람, 애완동물, 경제적 생산 동물 및 동물원 동물로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 102

제80항에 있어서,

상기 동물이 사람, 개, 고양이, 양, 소, 말 및 돼지로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 103

슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산분자 및 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산분자 (여기서, 모든 분리된 핵산분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있다)를 포함한 치료조성물.

청구항 104

제103항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 105

제104항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체가 생리수용액, 합성 지질-항유 기질, 천연 지질-항유 기질, 오일, 에스테르, 글라이콜, 바이러스 및 금속입자로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 106

제104항에 있어서,

약제학적으로 허용되는 상기 담체가 동물의 체내에 겨냥된 부위로 핵산분자를 전달할 수 있는 전달 비히클을 포함하는 조성물.

청구항 107

제106항에 있어서,

상기 전달 비히클이 리포좀, 미셀, 세포 및 세포막으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 108

제106항에 있어서,

상기 전달 비히클이 리포좀을 포함하는 조성물.

청구항 109

제106항에 있어서,

상기 전달 비히클이 종양세포 리간드인 조성물.

청구항 110

103항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 스타필로코커스 내독소, 레트로바이러스 항원, 스트렙토코커스 항원, 마이코플라스마 항원, 마이코박테리아 항원, 바이러스 항원 및 원생생물 항원으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 111

제103항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 스타필로코커스 내독소를 포함하는 조성물.

청구항 112

제103항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 113

제103항에 있어서,

상기 슈퍼항원이 마우스 선종양 바이러스, 레비즈 바이러스 및 헤르페스 바이러스로 이루어진 그룹중에서 선택된 바이러스로부터 유도되는 조성물.

청구항 114

제103항에 있어서,

상기 사이토킨이 조혈세포 성장인자, 인터루킨, 인터페론, 면역글로불린 과부류 분자, 종양괴사인자 부류

분자 및 케모킨으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 115

제103항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자, 대식세포 콜로니 자극인자, 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-6 및 인터루킨-12로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 116

제103항에 있어서,

상기 사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니 자극인자 및 종양괴사인자 로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 117

제103항에 있어서,

상기 분리된 핵산분자가 포유동물에서 발현될 수 있도록 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되는 조성물.

청구항 118

제103항에 있어서,

상기 전사조절서열이 RSV 조절서열, CMV 조절서열, 레트로바이러스 LTR 조절서열, SV-40 조절서열 및 -액틴 조절서열로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 119

제103항에 있어서,

상기 핵산분자가 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S 및 PCR₃-TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 재조합 분자를 포함하는 조성물.

청구항 120

제103항에 있어서,

상기 흑색종, 편평세포암, 유방암, 두개암 및 구개암, 갑상선암, 연조직육종, 골육종, 고환암, 전립선암, 난소암, 방광암, 피부암, 뇌암, 혈관육종, 혈관성유종, 비만세포 종양, 1기간암, 폐암, 췌장암, 위장암, 신장세포암, 조혈세포 신형성, 백혈병 및 임파종로 이루어진 그룹중에서 선택된 암을 치료하는데 유용한 조성물.

청구항 121

제103항에 있어서,

상기 암이 흑색종, 폐암, 갑상선암, 유방암, 신장세포암, 편평세포암, 뇌종양 및 피부암으로 이루어진 그룹중에서 선택된 암을 치료하는데 유용한 조성물.

청구항 122

슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 및 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산분자를 포함하고 상기 분리된 핵산분자가 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있는 재조합 분자.

청구항 123

제 122항에 있어서,

상기 재조합 분자가 포유동물 세포에서 발현될 수 있는 분자.

청구항 124

제122항에 있어서,

상기 재조합 분자가 RSV 조절서열, CMV 조절서열, 레트로바이러스 LTR 조절서열, SV-40 조절서열 및 -액

틴 조절서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 전사조절서열을 함유하는 분자.

청구항 125

122항에 있어서,

상기 슈퍼항원-암호화 핵산분자가 스타필로코커스 내독소, 레트로바이러스 항원, 스트렙토코커스 항원, 마이코플라스마 항원, 마이코박테리아 항원, 바이러스 항원 및 원생생물 항원으로 이루어진 그룹중에서 선택된 독소를 암호화하는 분자.

청구항 126

제122항에 있어서,

상기 슈퍼항원-암호화 핵산분자가 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE 및 TSST로 이루어진 그룹중에서 선택된 독소를 암호화하는 분자.

청구항 127

제122항에 있어서,

상기 슈퍼항원-암호화 핵산분자가 세균성 리더 서열을 함유하지 않는 분자.

청구항 128

제122항에 있어서,

상기 재조합 분자가 PCR₃-SEB, PCR₃-SEA, PCR₃-SEB.S, PCR₃-SEA.S, PCR₃-TSST 및 PCR₃-GM₃로 이루어진 그룹중에서 선택되는 분자.

청구항 129

슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산분자 (여기서, 상기 모든 분리된 핵산분자는 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있다)를 함유한 전달 비히클을 포함한 치료 조성물.

청구항 130

제129항에 있어서,

상기 전달 비히클이 리포좀, 미셀, 세포 및 세포막으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 조성물.

청구항 131

제129항에 있어서,

상기 전달 비히클이 리포좀을 포함하는 조성물.

청구항 132

제129항에 있어서,

상기 전달 비히클이 DOTMA 및 DOPE를 포함하는 조성물.

청구항 133

제132항에 있어서,

상기 언급된 화합물이 종양세포 리간드인 조성물.

청구항 134

(a) 슈퍼항원을 암호화한 분리된 핵산 분자 및 (b) 사이토킨을 암호화한 분리된 핵산분자-하나 이상의 전사 조절 서열에 작동적으로 연결되어 있다-를 포함하는 유효량의 치료조성물을 동물에 투여하여 비정상적인 세포를 함유한 동물의 부위에 겨냥되도록하여 동물체내에 주효세포 면역성을 증가시키는 방법.

청구항 135

제134항에 있어서,

상기 비정상 세포가 암세포, 병원체로 감염된 세포 및 비정상적인 증식 성장을 갖는 비암성 세포로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

청구항 136

제134항에 있어서,

상기 비정상적인 세포가 암세포인 방법.

청구항 137

제134항에 있어서,

상기 부위가 종양인 방법.

청구항 138

(a) 전사조절서열에 작동적으로 연결되어 있는 슈퍼항원을 암호화한 나상의 분리된 핵산분자 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함한 유효량의 치료조성물을 동물에 투여하여 과다한 T 세포 활성을 함유한 동물의 부위로 겨냥되도록하여 동물체내에서 T 세포 활성을 억제하는 방법.

청구항 139

제138항에 있어서,

상기 조성물이 동물체내에서 약 6주 이상동안 T 세포 활성을 억제할 수 있는 방법.

청구항 140

제138항에 있어서,

상기 조성물이 동물체내에서 약 8주 이상동안 T 세포 활성을 억제할 수 있는 방법.

청구항 141

제138항에 있어서,

상기 조성물이 동물체내에서 약 10주 이상동안 T 세포 활성을 억제할 수 있는 방법.

청구항 142

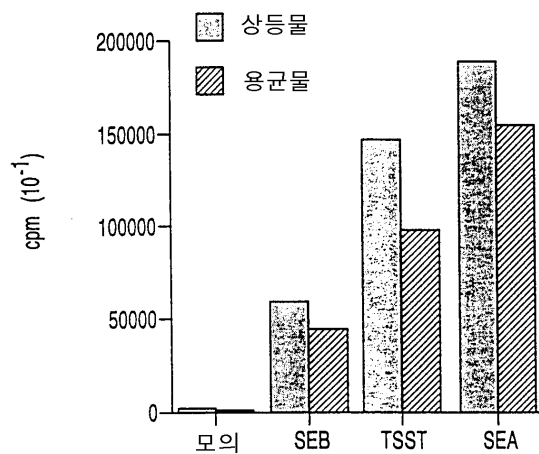
제138항에 있어서,

상기 담체가 생리수용액을 포함하는 방법.

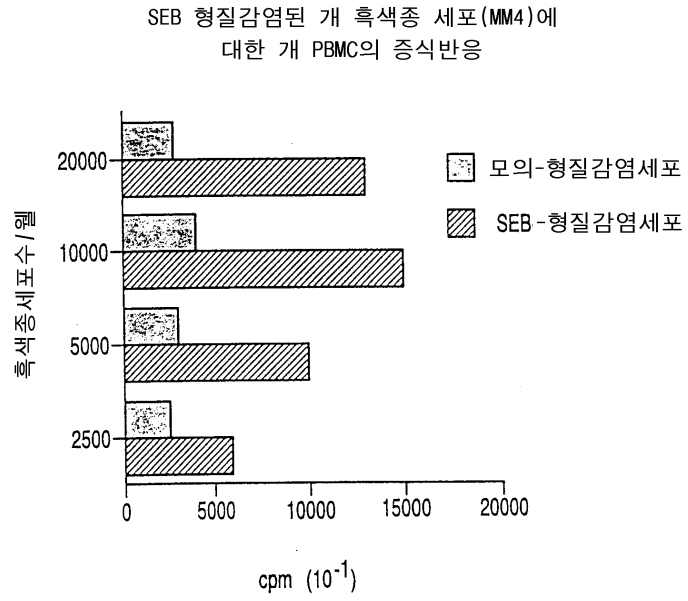
도면

도면1

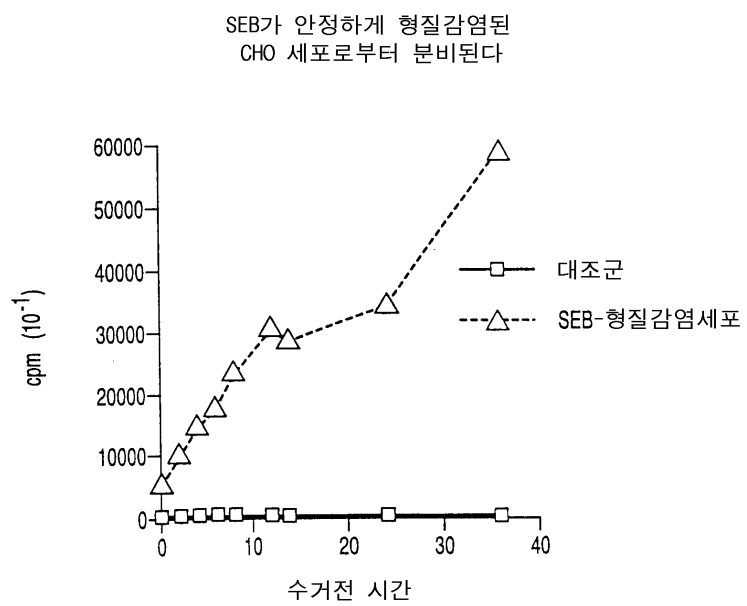
3개의 상이한 세균 상등물(SEB, SEA, TSST)가
진핵세포에서 발현될 수 있다



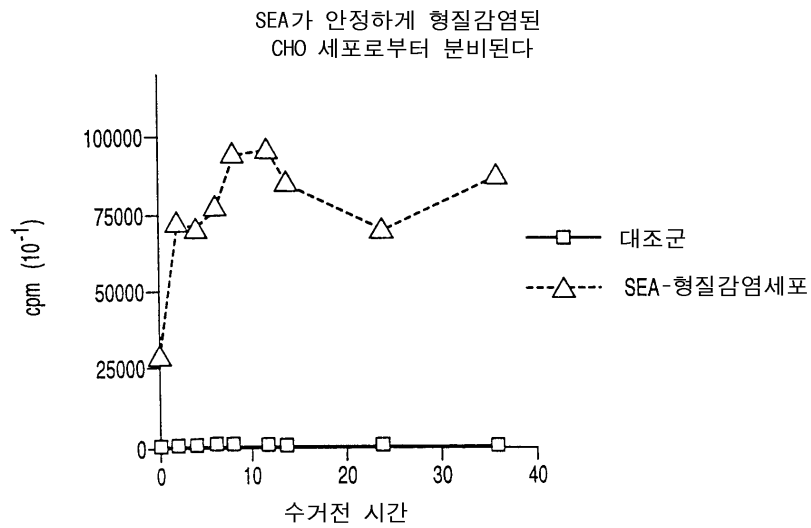
도면2



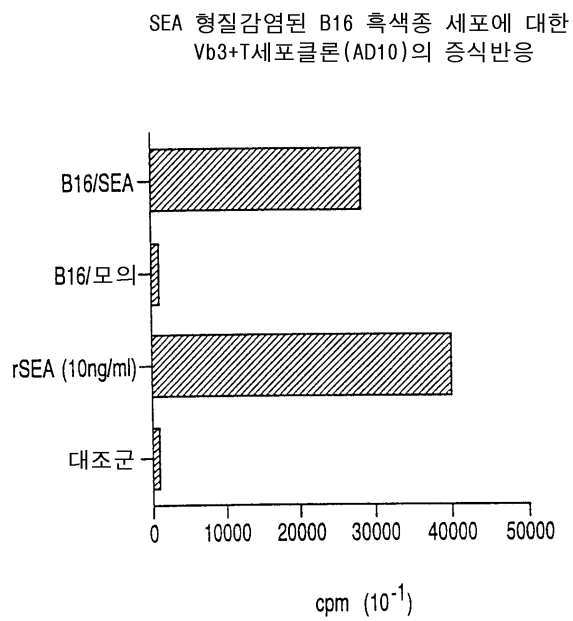
도면3a



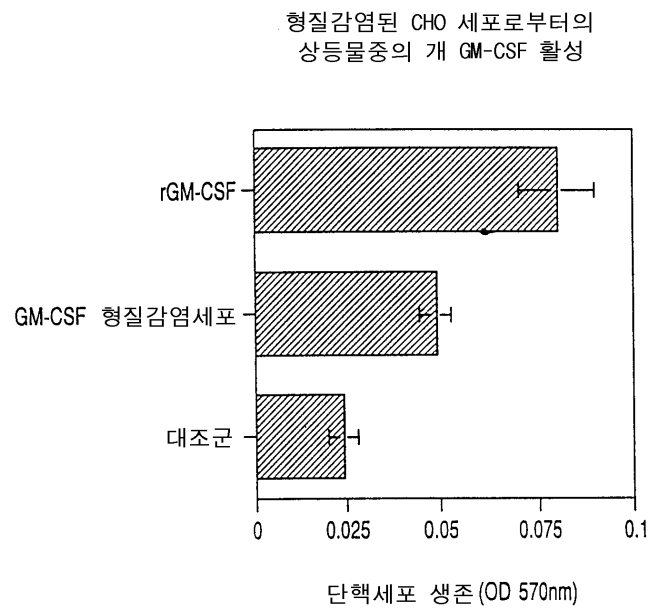
도면3b



도면4

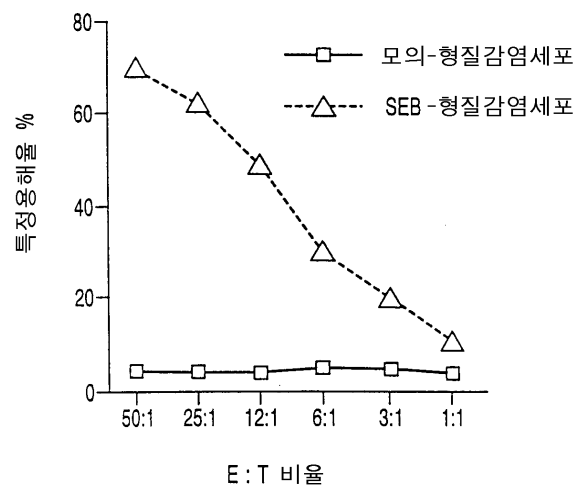


도면5



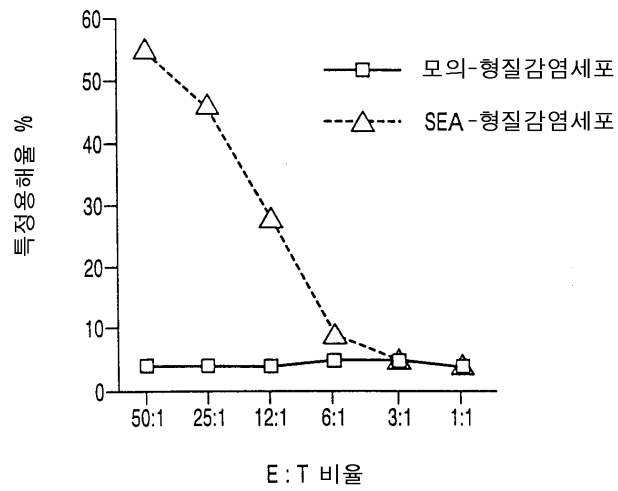
도면6a

SEB 형질감염된 종양세포로 예방접종한 결과
효능적인 CTL 활성이 발생된다



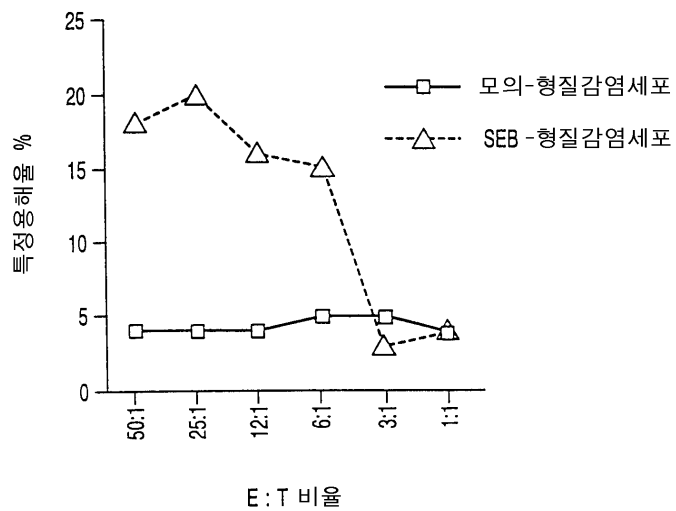
도면6b

SEA 형질감염된 종양세포로 예방접종한 결과
효능적인 CTL 활성이 발생된다

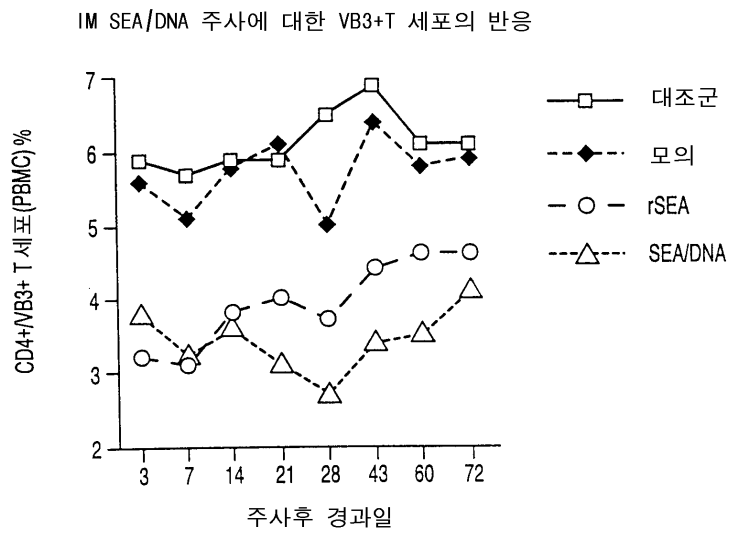


도면7

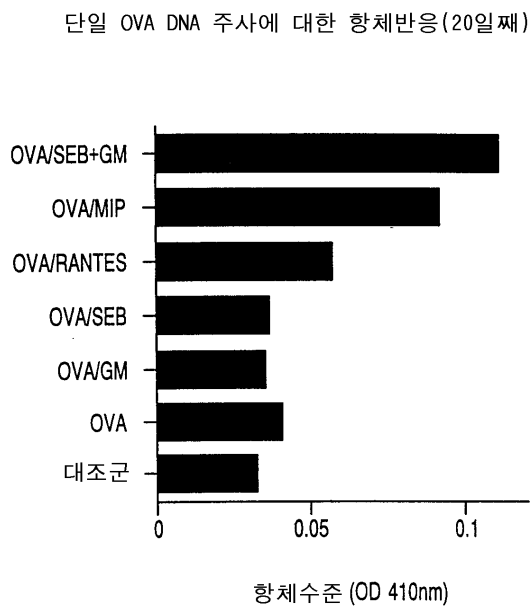
CTL 용해에 미치는 종양표적 형질감염의 영향



도면8

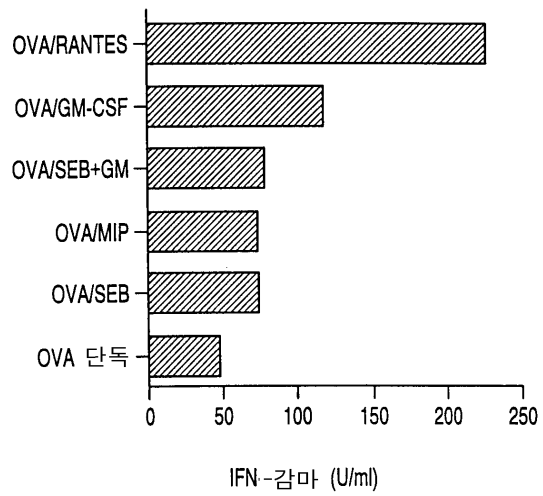


도면9



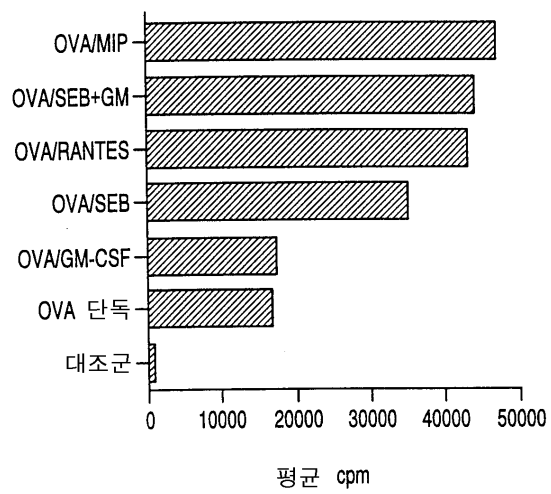
도면10

EG7-OVA로 자극후 인터페론 감마의 분비



도면11

EG7-OVA에 대한 증식반응



도면 12

