

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷

A61K 39/12

A61K 39/39

C07K 14/16

(11) 공개번호

10-2005-0115913

(43) 공개일자

2005년12월08일

(21) 출원번호 10-2005-7017197

(22) 출원일자 2005년09월14일

번역문 제출일자 2005년09월14일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/003164

(87) 국제공개번호

WO 2004/085635

국제출원일자 2004년03월25일

국제공개일자

2004년10월07일

(30) 우선권주장

60/457,348

2003년03월26일

미국(US)

(71) 출원인

사이토스 바이오테크놀로지 아게
스위스 체하-8952 솔리렌 바기스트라세 25

(72) 발명자

바크만 마틴 에프.
스위스 체하-8472 수자크 골드에케르버그 8
마노로바 바니아
스위스 체하-8032 취리히 페스탈로찌스트라세 41
메이제링크 에드윈
스위스 체하-8049 취리히 랩베르그스트라세 50
프로바 카를 쥐.
스위스 체하-8050 취리히 트람스트라세 95
츠와르츠 카트린
스위스 체하-8952 솔리렌 알테르 취리히버그 31

(74) 대리인

최규팔
이은선

심사청구 : 없음

(54) MELAN-A 펩티드 유사체-바이러스-양-입자컨쥬게이트

요약

본 발명은 백신학, 면역학 및 의학 분야에 관한 것이다. 본 발명은 면역자극 물질, 특히 비메틸화된 C 및 G(CpGs)를 포함하는 DNA 올리고뉴클레오타이드, 및 MelanA로부터 유도된 특정 펩티드와 함께 로딩될 수 있는 VLP를 포함하는 변형된 바이러스-양 입자(VLP)를 제공한다. 상기 CpGVLPs는 그의 CpG가 없는(CpG-free) 카운터파트보다 더욱더 현저히 면역원성을 갖고 B 및 T 세포 반응의 증진을 유도한다. 바이러스양 입자와 커플링, 융합 또는 다르게는 그에 부착된 MelanA 펩티드 유사체에 대한 면역 반응은 VLP 그 자체에 대한 면역 반응과 유사하게 증진된다. 또한, MelanA 펩티드 유사체에 대한 T 세포 반응은 특별히 Th1 타입으로 진행된다(direct). 따라서, CpG-로딩된 VLPs에 부착된 항원이 알레르기, 종양 및 다른 자가-분자 및 만성 바이러스 질환에 대한 예방 또는 치료학적 백신화를 위한 이상적인 백신일 될 수 있다.

명세서

기술분야

관련 출원

본 출원은 그의 내용이 본 명세서에 참고로 인용되는 2003년 3월 26일 출원된 미국 가출원 제 60/457,348호에 대한 우선권의 이점을 청구한다.

본 발명은 백신학, 면역학 및 의학 분야에 관한 것이다. 본 발명은 바람직하게는 면역자극 물질, 특히 면역자극 핵산, 및 더욱더 특히 적어도 하나의 비-메틸화된 CpG 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 결합, 바람직하게는 상기를 VLPs내로 패키징하여 바이러스-양 입자(VLPs)와 커플링, 융합 또는 그에 부착하는 MelanA 펩티드 유사체에 대한 면역 반응을 증진시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명을 사용하여 특히 종양 치료에 유용한 강력하고 지속된 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

배경기술

관련 분야

면역계의 요소는 두개의 상이한 근거를 기초로 한다: 상대적으로 느린 반응-동역학 및 기억하는 능력을 특징으로 하는 특이적 또는 적응 면역이고; 나머지는 빠른 반응-동역학을 나타내지만 기억능은 부족한 비특이적 또는 선천면역이다.

정제된 단백질만을 투여하는 것은 강력한 면역 반응을 유도하기에는 충분치 않고, 통상 분리된 항원을 애주번트라 명명되는 헬퍼 물질과 함께 제공하여야 한다는 것은 입증된 바 있다. 이들 애주번트와 함께 투여된 항원은 빠른 분해로부터 보호되고 애주번트는 저수준의 항원을 장기간 방출한다.

분리된 단백질과는 달리, 바이러스는 애주번트의 부재하에 T-세포의 도움이 있거나 없이도 신속하고 효능이 있는 면역 반응을 유도한다(Bachmann & Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15: 235-270 (1997)). 다수의 바이러스는 B 세포상의 에피토프-특이성 이뮤노글로블린과 유효하게 가교결합하는 규칙적인 배열의 에피토프를 나타내는 유사(quasi)-결정질 표면을 나타낸다 (Bachmann and Zinkernagel, Immunol. Today 17 : 553-558 (1996)). 바이러스 구조는 자기면역 질환 및 병원체에 대하여 자연발생적 반응의 일부로서의 항-항체 발생과도 관련이 있다 (참조 Fehr, T., et al., J Exp. Med. 185 : 1785-1792 (1997)). 따라서, B 세포를 직접 활성화시키고, 면역계의 또다른 중요한 부분인 세포독성 T 세포 반응을 발생시킬 수 있기 때문에 정돈되고 반복적인 어레이에 조직화된 바이러스 입자상의 항원은 고도의 면역원성을 갖고, 이는 면역계의 또다른 중요한 목적이다.

항원으로서의 바이러스 입자는 그들의 분리된 성분에 비하여 하기와 두가지 잇점을 나타낸다: (1) 그의 고도로 반복적인 표면 구조에 기인하여 B 세포를 직접 활성화시킴으로써, 항체 역가를 고도로 하고 B 세포 메모리를 장기간-지속시키고; (2) 가용성 단백질을 제외한 바이러스 입자는, 바이러스가 비감염성이고 애주번트가 존재하지 않는 경우에도 세포독성 T 세포 반응을 유도하는 효능을 갖고 있다.

또한, 박테리아 및 주로 무척추동물에서 존재하는 바와 같이 비-메틸화된 CG 모티프 (CpG)에 풍부한 DNA는 시험관내 및 생체내 B 세포, 가지세포 및 다른 APC's에서 강력한 자극 활성을 나타낸다. 박테리아 DNA는 다수의 척추동물에 대하여 면역자극성이지만, 각개 CpG 모티프는 상이할 수 있다. 실제로, 마우스의 면역 세포를 자극하는 CpG 모티프가 반드시 인간 면역 세포를 자극시킬 수 있는 것은 아니며, 그 반대도 마찬가지이다. 추가로, 면역자극 CpG-올리고데옥시뉴클레오타이드는 마우스에서 지라비대 및 림프절병증을 동반하는 골수외조혈을 유발시켜 강력한 부작용을 유도한다(Sparwasser et al., J. Immunol. (1999), 162: 2368-74 및 실시예 18).

최근 백신화 전략법이 현저하게 진보되었으나 현 전략법에 대한 개선안이 여전히 요구되고 있다. 특히, 본 분야에서는 APCs 및 다른 세포의 활성화없이 자연발생된 병원체와 같이 효과적으로 강력한 CTL 면역 반응 및 항-병원성 보호를 증진시키는 신규하고 개선된 백신에 대하여 요구되고 있다.

악성흑색종은 멜라닌세포 또는 멜라닌세포 관련 신경 세포로부터 유래한 침습, 주로 전이 종양이다. 악성흑색종은 모든 피부암중 대략 3%를 차지하고 있고 전세계적으로 악성흑색종의 증가는 여성에게 있어 폐암을 제외하면 어느 다른 신생물을 능가한다. 악성흑색종이 외관상 피부에만 국한되어 있는 경우에도 30% 이하의 환자에서는 전신 전이가 발생할 것이고 대다수는 사망하게 될 것이다. 지난 10년간면역요법 및 유전자 유법이 신규하고 전도유망한 악성흑색종 치료법, 예로서, 애

주변트와 함께, 또는 그를 사용하지 않고 악성흑색종 환자를 Melan A/MART-1 펩티드로 치료하는 방법이 제시되었다(eterged)되었다. 이 전략법에 있어 성공은 제한적이다. 또한, 대부분의 연구는 MHC 부류 I 멀티머로 생체외 CTL 반응을 직접 측정하지 못하고, 궁극적으로 MelanA 특이 CTL 반응을 측정하기 전 수주동안 CTL 배양액을 사용하여 그를 자극시켰다. 일반적으로, 펩티드는 그 자체로서 면역원성이 아니고 매우 짧은 반감기를 갖는다.

또다른 방식의 면역요법은 가지세포에 MelanA/MART-1 펩티드를 로딩하거나, 가지세포를 MelanA/MART-1-RNA로 형질감염시키고 환자에 재주사하는 것이다. 이 방법의 단점은 각각의 각개 환자로부터 얻은 자가 가지세포를 수일동안 시험관내에서 정제하고 사이토카인과 함께 인큐베이션시킨다는 점이다. 가지세포는 종양에 대하여 더이상 반응하지 않고 T 세포를 일으킬 수 있는, 면역원성이지만 면역허용원성은 아닌 성숙 상태로 존재하여 하기 때문에 상기 방법은 매우 까다롭다.

Dudley, M. E. (Science, 2002 Oct 25; 298 (5594): 850-4)로부터의 또다른 방법은 환자의 자가 종양-물질로부터 MelanA-특이 T 세포의 분리, 시험관내 배양 및 확장 및 기증자내로의 재주입이다. 상기 언급한 접근법에서와 같이 특이 백신은 각각의 각개 환자에 대하여 개별적으로 생산되어야 하고 따라서, 가장 효율적인 요법은 아니다.

그러므로, 효능이 있는 악성흑색종 백신을 특징화하는 것이 암, 특히 악성흑색종에 대한 면역요법을 위한 신규한 전략법 개발에 중요하다.

발명의 요약

본 발명은 고유의 반복적인 체계의 구조를 갖는 코어 입자, 및 특히 각각의 바이러스-양 입자(VLPs) 및 VLPs 서브유닛에 결합하였을 때 특정의 인간 MelanA 펩티드 유사체가 특정 항체 유도에 대하여 효능이 있는 이뮤노젠을 나타낸다는 결과에 기초한다(여기에서, VLPs는 DNA 올리고뉴클레오타이드와 같은 면역자극 물질(ISSs)과 함께 패키징된다). 본 발명은 추가로 DNA 올리고뉴클레오타이드와 같은 면역자극 물질은 그를 더욱 면역원성이 되도록 하는 VLPs내로 패키징될 수 있다는 결과에 기초한다. 예상외로, VLPs에 제시된 각각의 핵산 및 올리고뉴클레오타이드는 각각 면역자극 물질 및 CpG 모티프를 함유하는 DNA-올리고뉴클레오타이드에 의해 특이적으로 대체될 수 있다. 놀랍게도, 이들 패키징된 면역자극 물질, 특히 면역자극 핵산, 예를 들면, 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드는 선천성 면역계를 광범위하게 활성화시키지 않고 그의 면역자극 능력을 유지하였다. 본 발명에 따른 VLP's 및 면역자극 물질을 포함하는 조성물, 및 특히 CpG-VLPs는 그의 CpG가 없는(CpG-free) 카운터파트보다 더욱더 현저히 면역원성을 갖고 B 및 T 세포 반응의 증진을 유도한다. 추가로, VLPs 및 MelanA 펩티드 유사체 둘 모두에 대한 T 세포의 반응은 특별히 Th1 타입으로 진행된다(direct). 따라서, CpG로딩된 VLPs에 부착된 인간 MelanA 펩티드 유사체가 종양에 대한 예방 또는 치료학적 백신화를 위한 이상적인 백신일 될 수 있다.

제 1면으로, 본 발명은 바이러스-양 입자, 면역자극 물질, 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드, 및 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 전형적이고 바람직하게 동물에서 면역 반응을 증진시키기 위한 조성물을 제공한다(여기에서, 면역자극 물질, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 바이러스-양 입자와 커플링, 융합 또는 다르게는 그에 부착되거나, 즉, 바이러스-양 입자에 결합하여 둘러싸이고(enclose), 항원 또는 항원 결정기는 상기 바이러스-양 입자에 결합하고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는, 본질적으로 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체로 구성되거나, 다르게는 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체로 구성된다).

본 발명의 바람직한 일면으로, 면역자극 핵산, 특히 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 백본의 포스포로티오에이트 변형에 의해 안정화된다. 또다른 바람직한 일면으로, VLPs내 RNA를 분해하고 정선된 CpGs를 포함하는 DNA 올리고뉴클레오타이드를 동시에 가하여 면역자극 핵산, 특히 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드를 VLPs내로 패키징한다. 동일하게 바람직한 일면으로, VLPs를 CpGs의 존재하에 리셈블(reassemble)하기 전에 디셈블(disassemble)시킬 수 있다.

추가 일면으로, 면역자극 핵산은 CpG 모티프를 포함하지 않지만, 그럼에도 불구하고 면역자극 활성을 나타낸다. 상기 핵산은 WO 01/22972에 기술되어 있다. 상기 문헌에 기술된 모든 서열은 참고하는 방식으로 인용된다.

추가 일면으로, 바이러스-양 입자는 재조합 바이러스-양 입자이다. 또한 바람직한 바이러스-양 입자에는 리포프로테인 인벨런이 결합되어 있다. 바람직하게, 재조합 바이러스-양 입자는 B형 간염 바이러스, BK 바이러스 또는 다른 인간 폴리오마 바이러스, 홍역 바이러스, 신드비스 바이러스, 로타바이러스, 구제질환 바이러스, 레트로바이러스, 노르워크 바이러스 또는 인간 유두종 바이러스, RNA-과지, Q β -과지, GA-과지, fr-과지 및 Ty의 재조합 바이러스를 포함하거나, 다르게

는 그로 구성된다. 특정 일면으로, 바이러스-양 입자는 하나 이상의 상이한 B형 간염 바이러스 코어(캡시드) 단백질(HBcAgs)을 포함하거나, 다르게는 그로 구성된다. 추가의 일면으로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지의 단백질 또는 그이 단편을 포함한다. 바람직한 RNA-파지는 Q β -파지, AP 205- 파지, GA-파지,fr-파지이다.

특정 일면으로, 항원은 세포 독성 T 세포 에피토프를 포함하거나, 다르게는 그로 구성된다. 관련 일례로, 바이러스-양 입자는 B형 간염 바이러스 코어 단백질을 포함하고 세포 독성 T 세포 에피토프는 상기 B형 간염 바이러스 코어 단백질의 C-말단에 융합된다. 일면으로, 류신 결합 서열에 의해 융합된다. 특히 바람직한 일면으로, 항원은 암 세포에 대한 면역 반응을 유도하도록 적합화된 폴리펩티드

본 발명의 또다른 일면으로, 바이러스-양 입자, 면역자극 물질, 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 조성물을 동물내로 도입하는 것을 포함하는 인간 또는 다른 동물 중에서 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다(여기에서, 면역자극 물질, 바람직하게 핵산, 및 더욱더 바람직하게 올리고뉴클레오티드는 바이러스-양 입자에 결합(즉, 커플링, 부착 또는 둘러싸임)되어 있고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성되고, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체는 상기 바이러스-양 입자에 결합되어 있다).

본 발명의 또다른 일면으로, 조성물을 동물의 피하, 근육내, 비강내, 진피내, 정맥내 또는 림프절로 직접 도입한다. 동일하게 바람직한 일면으로, 면역 증진 조성물을 국소적으로, 종양에 근접하게 또는 백신화시키고자 하는 국소 바이러스 저장소에 적용시킨다.

본 발명의 바람직한 일면으로, 면역 반응은 T 세포 반응이고, 항원에 대한 T 세포 반응은 증진된다. 특정 일면으로, T 세포 반응은 세포 독성 T 세포 반응이고, MelanA에 대한 세포 독성 T 세포 반응은 증진된다.

본 발명은 또한 면역학적 유효량의 본 발명의 면역 증진 조성물을 약제학적으로 허용가능한, 담체 또는 부형제와 함께 포함하는 백신에 관한 것이다. 바람직한 일면으로, 백신은 추가로 적어도 하나의 애주번트를 포함한다. 본 발명은 또한 면역학적 유효량의 기술한 백신을 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물을 면역화 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 바람직한 일면으로, 면역자극 물질-함유 VLPs, 바람직하게 면역자극 핵산-함유 VLP's, 더욱더 바람직하게 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오티드 VLPs는 각각 악성흑색종, 또는 MelanA 펩티드에 대하여 동물, 전형적이고 바람직하게 인간을 백신화시키기 위하여 사용된다. 종양에 대하여 백신화시키기 위하여 변형된 VLPs를 전형적이고 바람직하게 사용할 수 있다. 백신화는 예방 또는 치료적 목적, 또는 둘 모두를 위할 수 있다.

주사 경로는 바람직하게 피하 또는 근육내이지만, 진피내, 비강내, 정맥내 또는 림프절로 직접 CpG-함유 VLPs를 적용시킬 수 있다. 동일하게 바람직한 일면으로, CpG-함유 MelanA 펩티드 유사체-커플링하거나 유리(free) VLPs를 국소적으로, 종양에 근접하게 또는 백신화시키고자 하는 국소 바이러스 저장소에 적용시킨다.

상기 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명 모두는 예시적이고 설명적인 것이고 청구하는 본 발명을 추가로 설명하기 위한 것으로 이해되어야 한다.

도면/도의 간단한 설명

도 1은 Q β -MelanA VLPs의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다. 실시예 20에 기술한 바와 같이 MelanA-펩티드를 Q β VLPs와 커플링시켰다. 최종 산물을 샘플 완충액과 혼합하고 1.5시간동안 125V에서 감압 조건하에 16% Novex^R Tris-글리신 겔상에서 분리하였다. Coomassie 블루 용액에 겔을 침시시켜 분리된 단백질을 염색시켰다. 50 % 메탄올, 8% 아세트산에서 겔을 세척하여 배경 염색을 제거하였다. Q β -MelanA 이동 속도에 대한 참고로서 분자량 마커 (P 77085, New England BioLabs, Beverly, USA)(라인 1)를 사용하였다. 8 μ g의 각각의 최종 산물: Q β -MelanA16-35 (라인 4), Q β -MelanA 16-35 A/L (라인 5), Q β -MelanA 26-35 (라인 6) and Q β -MelanA 26-35 A/L (라인7)과 비교하기 위하여 14 μ g의 Q β 단독(라인 2) 또는 SMPH로 유도화된 Q β (라인 3)를 로딩하였다

도 2 A는 ISS-처리된 인간 PBMC의 상등액에 방출된 IFN 알파를 나타낸다. PBMC를 백혈구연층(buffy coat)로부터 수득하고 18시간동안 지정된 ISS의 5배 희석액과 함께 인큐베이션시켰다. 올리고뉴클레오티드 G10-PO에 대하여 용어 G10를 사용하고, 올리고뉴클레오티드 G3-6에 대하여 용어 G3를 사용한다. 상등액을 수거하고 PBL Biomedical Laboratories에 의해 제공받은 항체 세트를 사용하여 ELISA에 의해 IFN 알파를 측정하였다.

도 2B는 ISS로 처리된 인간 CD8+ PBMC에 대한 CD69의 상향조절을 나타낸다. PBMC를 백혈구연층로부터 수득하고 18 시간동안 지정된 ISS의 5배 희석액과 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 세척하고 얼음상에서 20분동안 항-CD8-FITC, 항-CD19-PE 및 항-CD69-APC(모두 BD PharMingen로부터 입수)와 함께 인큐베이션시켰다. 세척한 후, CellQuest 소프트웨어를 사용하여 FACS Calibur상에서 세포를 분석하였다.

도 3은 폴리(I: C), G3-6, 또는 G6과 함께 패키징된 Qbx33으로 마우스를 면역화시킨 후의 바이러스 역가를 나타낸다. 100 μ g의 Qbx33, 폴리(I: C)와 패키징되고 p33과 커플링된 100 μ g의 Q β VLPs(Q β -pIC-33, 또는 QbxZnx폴리ICxp33GGC로 명명됨), G3-6와 패키징된 90 μ g의 Qbx33(Qbx33/G3-6), 또는 G6과 패키징된 90 μ g의 Qbx33(Qbx33/G6)을 주사하여 C57B16 마우스를 면역화시켰다. 8일후 LCMV-p33 에피토프를 소지하는(carry), 플라크 형성 단위가 1.5x10⁶인 백시나 바이러스로 마우스를 시험감염시켰다. 5일후, 마우스를 희생시키고 난소를 수거하였다. 난소로부터 단세포 현탁액을 제조하고 일련의 희석액으로 BCS40 세포에 가하였다. 1일 후, 50% 에탄올, 2% 포름알데히드, 0.8% NaCl 및 0.5% 크리스탈 바이오텐을 포함하는 용액으로 세포층을 염색시키고 바이러스 플라크를 계수하였다.

발명의 상세한 설명

달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 동일하거나 일치하는 어느 방법 및 재료를 본 발명의 실시 또는 교시에 사용할 수 있지만, 이하 바람직한 방법 및 재료를 기술한다.

1. 정의:

아미노산 링커: 본 명세서에서 사용되는 "아미노산 링커" 또는 그냥 "링커"는 항원 또는 항원 결정기를 제 2 결합부와 결합시키거나, 더욱 바람직하게는 반드시 그런 것은 아니지만, 전형적으로는 하나의 아미노산 잔기와 같은 제 2 결합부를 사전에 포함하거나 함유한다. 그러나, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "아미노산 링커"는 아미노산 잔기들로 구성된 아미노산 링커가 본 발명의 바람직한 일례이지만, 상기 아미노산 링커는 아미노산 잔기들만으로 구성되는 것을 의미하는 것은 아니다. 아미노산 링커의 아미노산 잔기는 바람직하게, 본 분야에 공지되어 있는 자연발생 아미노산 또는 비자연발생 아미노산, all-L 또는 all-D 또는 그의 혼합물로 구성된다. 그러나, 한 분자와 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 링커도 본 발명에 포함된다. 상기 분자는 바람직하게 C₁-C₆ 알킬-, 사이클로알킬(C₅, C₆), 아릴 또는 헤테로아릴 부위를 포함한다. 그러나, 바람직하게 아미노산 링커외에도, C₁-C₆ 알킬-, 사이클로알킬(C₅, C₆), 아릴 또는 헤테로아릴 부위를 포함하고 아미노산(들)이 결합된 링커가 본 발명의 범위내 포함되어야 한다. 항원 또는 항원 결정기 또는 임의로 제 2 결합부와 아미노산 링커의 결합은 바람직하게 적어도 하나의 공유 결합, 더욱 바람직하게 적어도 하나의 펩티드 결합에 의한다.

동물: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "동물"은 예를 들면, 인간, 양, 고라니, 사슴, 검은 사슴(mule deer), 밍크, 포유동물, 원숭이, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 래트, 마우스, 새, 닭, 파충류, 어류 및 거미류를 포함한다.

항체: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 에피토프 또는 항원 결정기에 결합할 수 있는 분자를 언급한다. 이 용어는 전체 항원 및 그의 항원-결합 단편을 포함하며, 단쇄 항체를 포함하는 것을 의미한다. 항체는 인간 항원 결합 항체 단편을 포함하고 제한하는 것은 아니지만 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, 디설파이드-결합 Fvs(sdFv) 및 VL 또는 VH 영역을 포함하는 단편을 포함한다. 항체는 가금 및 포유동물을 포함하는 동물로부터 기원하는 것일 수 있다. 바람직하게, 항체는 포유동물 예로서, 인간, 쥐, 래빗, 염소, 기니 피그, 낙타, 말 등, 또는 다른 적절한 동물, 예로서 닭이다. 본 명세서에서 사용되는 바, "인간" 항체는 인간 이뮤노글로블린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 인간 이뮤노글로블린 라이브러리 또는 하나 이상의 인간 이뮤노글로블린이 도입되었지만, 내인성 이뮤노글로블린은 발현시키지 않는 동물로부터 분리된 항체를 포함한다[U. S. Patent No. 5,939, 598에 기재되어 있고, 이는 전체적으로 참고문헌으로서 인용된다].

항원: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원"은 항체 또는 MHC 분자에 의해 제시(present)되는 경우 T 세포 수용체(TCR)에 의해 결합할 수 있는 분자를 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원"은 또한 T-세포 에피토프를 포함한다. T-세포 에피토프는 적혈구를 제외한 신체 모든상에 존재하는 MHC I 부류, 또는 면역세포 및 특히 항원제시세포상에 존재하는 II 부류와 관련하여 T-세포 수용체에 의해 인식된다. 인식 이벤트에 의해 T-세포는 활성화되고 연속하여 T-세포 증식, 시토카인 분비, 퍼포린 분비 등과 같은 효과기(effector) 메카니즘을 일으킨다. 항원은 또한 면역계에 의해 인식될 수 있고/거나 B- 및/또는 T- 림프구를 활성화시키는 체액면역반응 및/또는 세포면역반응을 유도할 수 있다. 그러나,

적어도 특별한 경우에는 항원은 T_H 세포 에피토프를 포함하거나 이에 결합되어 있고 어췌번트중에 제공된다. 항원은 하나 이상의 에피토프(B- 및 T-에피토프)를 포함할 수 있다. 상기 언급한 특이적 반응은 항원은 바람직하게는 전형적으로 고도로 특이적인 방식으로 그에 상응하는 항체 또는 TCR과 반응하지만 다른 항원에 의해 유발될 수 있는 다수의 다른 항체 또는 TCR과 반응하지 않는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 항원은 또한 여러 개체 항원의 혼합물일 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 바 "중양 항원"은 중양 또는 중양과 관련되는 펩티드와 같은 화합물로서, 면역 반응을 유발할 수 있다. 특히, 화합물은 MCH와 관련하여 존재할 때 면역 반응을 유발할 수 있다. 예를 들면, Cohen, et al., [암 Research, 54: 1055 (1994)]에 기술된 바와 같이 항원을 부분적으로 정제하거나, 재조합 기술에 의하거나, 공지 항원을 새로(de novo) 합성하여 암 세포로부터 중양 항원을 제조할 수 있다. 중양 항원은 전체 중양 또는 중양 폴리펩티드이거나 그 항원 부분인 항원을 포함한다. 상기 항원은 재조합적으로 또는 본 분야에 공지된 다른 수단에 의해 분리하거나 정제할 수 있다. 암 또는 중양은 제한하는 것은 아니지만, 담도 암; 대뇌암; 유방 암; 자궁 암; 용모막암종; 결장 암; 자궁내막 암; 식도암; 위암; 상피내 신생물; 림프종; 간암; 폐암 (예: 소세포 및 비소세포); 악성흑색종; 신경모세포종; 경구 암; 난소 암; 췌장 암; 전립샘 암; 직장 암; 육종; 피부 암; 고환 암; 갑상샘암; 및 신장암, 및 다른 암종 및 육종을 포함한다.

항원 결정기: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원 결정기"는 B- 또는 T-림프구에 의해 특이적으로 인식되는 항원의 일부분을 언급한다. B-림프구는 항체 생산을 통해 외부 항원 결정기에 반응하는 반면, T-림프구는 세포 면역의 중간체이다. 따라서, 항원 결정기 또는 에피토프는 항체, 또는 MHC와 관련하여, T-세포 수용체에 의해 인식되는 항원의 일부분이다.

항원 제시 세포: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원 제시 세포"는 면역자극성을 갖는 백혈구 또는 골수 유도 세포의 이질성 군집을 언급하는 것을 의미한다. 예를 들면, 이들 세포는 T 세포에 의해 인식될 수 있는 MHC 분자에 결합하는 펩티드를 생산할 수 있다. 용어는 용어 "보조 세포"와 동일한 의미를 갖고, 예를 들면, 랑게르한스' 세포, 손가락가지모양 세포, B 세포, 대식세포 및 가지세포를 포함한다. 몇몇 조건하에서 상피 세포, 내피 세포 및 다른 비골수 유도 세포 또한 항원 항원 제시 세포로서 작용할 수 있다.

결합(Association): 본 명세서에서 사용되는 바, 제 1 및 제 2 결합부에 적용되는 바 용어 "결합"은 바람직하게 적어도 하나의 비펩티드성 결합인 제 1 및 제 2 결합부의 결합을 언급한다. 결합성은 공유, 이온, 소수성, 극성 결합 또는 그의 조합일 수 있고, 바람직하게 결합성은 공유 결합이고, 다시 더욱 바람직하게 결합은 적어도 하나의, 바람직하게 하나의 비펩티드 결합이다. 본 명세서에서 사용되는 바, 제 1 및 제 2 결합부에 적용되는 바 용어 "결합"은 본 발명의 조성물을 형성하는 제 1 및 제 2 결합부의 직접 결합 또는 결합(association)을 포함하고, 다르게는 바람직하게, 전형적이고 바람직하게 헤테로이작용기성 가교제를 사용하여 본 발명의 조성물을 형성하는 간접 결합(association) 또는 결합을 포함한다.

제 1 결합부: 본 명세서에서 사용되는 바, 어구 "제 1 결합부"는 전형적이고 바람직하게 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체로 구성된 제 2 결합부에 결합할 수 있는, 전형적이고 바람직하게 바이러스-양 입자로 구성된 비자연발생 또는 자연발생된 오리진(origin) 요소를 언급한다. 제 1 결합부는 단백질, 폴리펩티드, 아미노산, 펩티드, 당, 폴리뉴클레오타이드, 천연 또는 합성 폴리머, 2차 대사물질 또는 화합물(바이오틴, 형광물질, 레티놀, 디곡시게닌, 금속 이온, 페닐메틸설포닐플루오라이드), 또는 그의 배합물, 또는 그의 화학적 반응 그룹일 수 있다. 제 1 결합부는 전형적이며 바람직하게 코어 입자, 예를 들면, 바람직하게 바이러스-양 입자와 같은 코어 입자의 표면에 위치한다. 다중 제 1 결합부는 전형적으로 반복적 배열로 코어 및 바이러스-양 입자 각각의 표면에 존재한다. 바람직하게, 제 1 결합부는 아미노산 또는 그의 화학적 반응 그룹이다.

제 2 결합부: 본 명세서에서 사용되는 바, 어구 "제 2 결합부"는 바이러스-양 입자 표면에 위치하는 제 1 결합부에 결합할 수 있는, 전형적이고 바람직하게 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체로 구성되고, 그에 결합하는 요소를 언급한다. 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체의 제 2 결합부는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 당, 폴리뉴클레오타이드, 천연 또는 합성 폴리머, 2차 대사물질 또는 화합물(바이오틴, 형광물질, 레티놀, 디곡시게닌, 금속 이온, 페닐메틸설포닐플루오라이드), 또는 그의 배합물, 또는 그의 화학적 반응 그룹일 수 있다. 적어도 하나의 제 2 결합부는 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체상에 존재한다. 따라서, 용어 "적어도 하나의 제 2 결합부를 포함하는 펩티드 유사체"는 적어도 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체 및 제 2 결합부를 포함하는 항원 또는 항원 구성체(construct)를 언급한다. 그러나, 특히 비자연발생 기원, 즉 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체내에서 자연적으로 발생된 것이 아닌 제 2 결합부의 경우 이들 항원 또는 항원 구성체는 "아미노산 링커"를 포함한다.

결합(Bound): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "결합"은 예를 들면 화학적 커플링에 의한 공유결합 또는 예를 들면, 이온간 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합 등의 비공유결합을 언급한다. 공유 결합은 예를 들면, 에스테르, 에테르, 포스포에스테르, 아마이드, 펩티드, 이미드, 탄소-황 결합, 탄소-인 결합 등일 수 있다. 용어 "결합"은 예로서 용어 "커플링," "융합

(fused)", "결합"(associate)" 및 "부착(attached)"를 포함하고 이보다 광범위하다. 또한, 바이러스-양 입자와 결합하는 면역자극 물질과 관련하여 용어 "결합"은 또한 면역자극 물질의 둘러싸임(enclosurement), 또는 부분적인 둘러싸임을 포함한다. 따라서, 바이러스-양 입자에 결합하는 면역자극 물질과 관련하여 용어 "결합"은 예로서 용어 "커플링", "융합", "둘러싸임(enclosing)", "패킹(패킹된)", 및 "부착(attached)"를 포함하고 이보다 광범위하다. 예를 들면, 면역자극 물질 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드는 공유, 또는 비공유에 의한 실제 결합없이도 VLP에 의해 둘러싸일 수 있다.

코트 단백질(들): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "코트 단백질(들)"은 박테리오파지 또는 RNA-파지의 캡시드 어셈블리 내 혼입될 수 있는 박테리오파지 또는 RNA-파지의 단백질을 언급한다. 그러나, RNA-파지의 코트 단백질 유전자중 특정 유전자 산물을 언급하는 경우 용어 "CP"를 사용한다. 예를 들면, RNA-파지 Q β 의 코트 단백질 유전자중 특정 유전자 산물은 "Q β CP"로 언급되고, 박테리오파지 Q β 의 "코트 단백질"은 "Q β CP" 및 A1 단백질을 포함한다. 박테리오파지 Q β 의 캡시드는 주로 Q β CP와 소수의 A1 단백질로 구성된다. 유사하게, VLP Q β 코트 단백질은 주로 Q β CP와 소수의 A1 단백질을 포함한다.

커플링: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "커플링"은 공유 결합 또는 비공유결합 상호작용에 의한 부착을 언급한다. 항원과 바이러스-양 입자의 커플링과 관련하여 용어 "커플링"은 바람직하게 공유 결합에 의한 부착을 언급한다. 또한, 항원과 바이러스-양 입자의 커플링과 관련하여 용어 "커플링"은 바람직하게 각각 적어도 하나의 비펩티드 결합에 의한 결합(association) 및 부착을 언급한다. 본 분야의 기술자에 의해 생물학적 활성인 재료를 커플링하기 위해 통상 사용되는 방법을 본 방법에 사용할 수 있다.

융합: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "융합"은 코딩 뉴클레오타이드 서열의 인프레임(in-frame) 조합에 의한 하나의 폴리펩티드중 상이한 기원의 아미노산 서열의 조합을 언급한다. 용어 "융합"은 명확하게 하나의 말단으로의 융합외에도 내부 융합, 즉 폴리펩티드 쇄내의 상이한 기원의 서열의 삽입을 포함한다.

CpG: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "CpG"는 적어도 하나의 비메틸화 시토신, 구아닌 디뉴클레오타이드 서열 (예: "CpG-올리고뉴클레오타이드" 또는 시토신에 이어서 구아노신을 포함하는 이는 인산 결합에 의해 연결된 DNA)을 포함하고 척추동물의 골수 유래 세포에 의해 사이토카인의 발현에 대하여 분열촉진 작용을 갖거나 이를 유도하거나 증가시키는 것과 같이 자극/활성화시키는 올리고뉴클레오타이드를 언급한다. 예를 들면, CpGs는 B 세포, NK 세포 및 항원 제시 세포, 예로서 가지 돌기 세포, 단핵구 및 마크로파지를 활성화시키는데 유용할 수 있다. CpGs는 포스포로티오에스테르 결합을 포함하는 유사체와 같은 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있고 더블-스트랜드 또는 싱글-스트랜드일 수 있다. 통상, 더블-스트랜드 분자가 생체내에서 더욱 안정적인 반면, 싱글-스트랜드는 증가된 면역 활성을 갖는다.

에피토프: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 동물, 바람직하게 포유동물, 및 가장 바람직하게 인간에서 항원 또는 면역원성 활성을 갖는 폴리펩티드의 연속 또는 불연속 부위를 언급한다. 에피토프는 MHC 분자와 관련하여 T 세포 수용체를 통해 T 세포 또는 항체에 의해 인식된다. 본 명세서에서 사용되는 바 "면역원성 에피토프"는 본 분야의 공지된 방법에 의해 결정된 바와 같은, 동물에서 T-세포 반응을 유도하거나 항체 반응을 유도하는 폴리펩티드 부위로서 정의된다 (참조, 예: Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3998-4002 (1983)). 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원 에피토프"는 본 분야의 공지된 방법에 의해 결정된 바와 같은 항체가 면역특이적으로 그의 항원을 결합시킬 수 있는 단백질 부위로서 정의된다. 면역특이성 결합은 비특이적 결합을 제외하고 있지만, 필수적으로 다른 항원과의 가교-반응을 제외시키는 것은 아니다. 항원 에피토프가 필수적으로 면역원성일 필요는 없다. MHC 분자와 관련하여 T-세포 수용체에 의해 면역특이적으로 결합할 수 있는 경우 항원 에피토프는 또한 T-세포 에피토프일 수 있다.

에피토프는 에피토프에 특이적인 공간 구조내 3개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일반적으로 에피토프는 적어도 약 5개의 상기 아미노산으로 구성되고, 더욱 통상적으로 적어도 약 8-10개의 상기 아미노산으로 구성된다. 에피토프가 유기분자인 경우 이는 니트로페닐과 같이 작용할 수 있다. 바람직한 에피토프는 본 발명의 MelanA-펩티드 유사체이다.

면역반응: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "면역반응"은 항원과 같은 분자 또는 화합물에 대하여 지시되는 개체의 면역계에 의한 어느 작용을 언급한다. 포유동물에서 면역반응은 세포의 활성화 및 시토카인 및 항체와 같은 가용성 분자의 생산을 포함한다. 따라서, 이 용어는 B-및/또는 T-림프구의 활성화 및/또는 증식을 일으키는 체액 면역반응 및/또는 세포 면역반응을 포함한다. 그러나, 일부에서는 면역반응의 강도가 낮아 본 발명에 따른 적어도 하나의 물질을 사용하는 경우에만 면역반응을 검출할 수 있다. "이뮤노젠"은 생체 생물의 면역계를 자극하여 하나 이상의 면역계 기능을 증가시키고 면역원성 인자(agent)로 향하게 하기 위하여 사용되는 인자를 언급한다. "면역원성 폴리펩티드"는 애주버트 존재 여하에 상관없이 단독으로 또는 캐리어에 결합하여 세포 및/또는 체액 면역반응을 유도하는 폴리펩티드이다.

면역화: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "면역시키다" 또는 "면역화" 또는 관련 용어는 표적 항원 또는 에피토프에 대한 실질적인 면역 반응(항체 및/또는 효과기 CTL과 같은 세포 면역 포함)을 일으키는 능력을 제공하는 것을 언급한다. 이 용어는 형성되는 면역이 완전한 것일 필요는 없지만, 형성되는 면역 반응은 실질적으로 기준보다는 월등하여야 한다. 예를 들면, 본 발명의 방법을 적용시킨 후 표적 항원에 대한 세포 및/또는 체액 면역 반응이 발생하는 경우 포유 동물이 표적 항원에 대하여 면역화되었다고 볼 수 있다.

면역자극 핵산: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 면역자극 핵산은 면역 반응을 유도하고/거나 증진시킬 수 있는 핵산을 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 면역자극 핵산은 리보핵산 및 특히 데옥시리보핵산을 포함한다. 바람직하게, 면역자극 핵산은 적어도 하나의 CpG 모티프, 예로서, C가 비메틸화된 CG 디뉴클레오타이드를 포함한다. CG 디뉴클레오타이드는 앞뒤순상동 서열의 부부일 수 있고 비-앞뒤순상동 서열내 포함될 수 있다. 상기 기술한 바와 같은 CpG 모티프를 포함하지 않는 면역자극 핵산은 CpG 디뉴클레오타이드이 결여된 핵산, 및 메틸화된 CG 디뉴클레오타이드를 갖는 CG 모티프를 포함하는 핵산을 경유하여 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바 용어 "면역자극 핵산"은 또한 4-브로모-시토신과 같은 변형된 염기를 포함하는 핵산을 언급하여야 한다.

면역자극 물질: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "면역자극 물질"은 물질 면역 반응을 유도하고/거나 증진시킬 수 있는 물질을 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바 면역자극 물질은 제한하는 것은 아니지만, 톨-양(toll-like) 수용체 활성화 물질 및 사이토카인 분비를 유도하는 물질을 포함한다. 톨-양 수용체 활성화 물질은 제한하는 것은 아니지만 면역자극 핵산, 펩티도글리칸, 리포폴리사카라이드, 리포테이콘산산, 이미다조퀴놀린 화합물, 플라젤린, 리포프로테인, 및 면역자극 유기 물질 예로서 탁솔을 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자연발생된 인간 Melan A 펩티드" 또는 "정상 인간 Melan A 펩티드"는 정상 인간 MelanA 단백질 서열의 아미노산 위치 26-35번으로 표시되는 아미노산 서열 EAAGIGILTV (서열번호: 78) 또는 정상 인간 MelanA 단백질 서열의 아미노산 위치 27-35번으로 표시되는 AAGIGILTV (서열번호: 79)를 포함하거나, 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된 펩티드를 언급하여야 한다.

본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "MelanA 펩티드 유사체" 또는 "인간 MelanA 펩티드 유사체" 또는 "인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체"는 상응하는 정상 MelanA 펩티드의 아미노산 서열이 적어도 하나의 아미노산 또는 아미노산 유도체에 의해 변형된 펩티드로서 정의되며, 상기 변형은 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 일면으로, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "MelanA 펩티드 유사체"는 상응하는 정상 MelanA 펩티드(서열번호:91)의 아미노산 서열이 3개, 바람직하게 2개, 및 더욱더 바람직하게 1개의 아미노산 또는 아미노산 유도체에 의해 변형된 펩티드로서 정의되며, 상기 변형은 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 추가의 일면으로 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "MelanA 펩티드 유사체"는 상응하는 정상 MelanA 펩티드의 아미노산 서열이 3개, 바람직하게 2개, 및 더욱더 바람직하게 1개의 아미노산 또는 아미노산 유도체에 의해 변형된 펩티드로서 정의되며, 상기 변형은 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입 또는 그의 조합을 포함할 수 있고, 상기 변형의 위치는 정상 인간 MelanA 단백질 서열 (서열번호:91)의 26, 27, 28, 35번이고, 상기 변형은 바람직하게 아미노산 치환이다. 용어 "MelanA 펩티드 유사체", "인간 MelanA 펩티드 유사체", "인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체", 및 "인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체"는 호환적으로 사용된다.

자연발생 기원(origin): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자연발생 기원"은 전체 또는 그의 일부가 합성된 것이 아니고 자연적으로 존재하거나 생산된 것을 의미한다.

비자연발생: 본 명세서에서 사용되는 바, 이 용어는 통상 자연으로부터의 것이 아닌 것, 더욱 특히, 인공을 의미한다.

비자연발생 기원: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "비자연발생 기원"은 통상 합성 또는 자연으로부터의 것이 아닌 것, 더욱 특히, 인공을 의미한다.

정돈되고 반복적인 항원 또는 항원 결정기 어레이: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "정돈되고 반복적인 항원 또는 항원 결정기 어레이"는 전형적이고, 바람직하게는 각각 코어 입자 및 바이러스-양 입자에 관하여 항원 또는 항원 결정기의 균일한 공간 배열을 특징으로 하는 통상의 항원 또는 항원 결정기의 반복적 패턴을 언급한다. 본 발명의 일면으로, 반복적 패턴은 기하학적 패턴일 수 있다. 적절하게 정돈되고 반복적인 항원 또는 항원 결정기 어레이의 전형적이고 바람직한 예는 0.5 내지 30 나노미터, 더욱 바람직하게 3 내지 15 나노미터, 더욱더 바람직하게 3 내지 8 나노미터 간격으로 항원 또는 항원 결정기가 엄격하게 반복적이고 거의 결정과 같은(paracrystalline) 구조를 갖는 것이다.

올리고뉴클레오타이드: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "올리고머"는 2개 이상의 뉴클레오타이드, 일반적으로 적어도 약 6개 뉴클레오타이드 내지 약 100, 000개의 뉴클레오타이드, 바람직하게 약 6개 내지 약 2000개의 뉴클레오타이드, 및 더욱 바람직하게 약 6개 내지 약 300개의 뉴클레오타이드, 더욱더 바람직하게 약 20개 내지 약 300개의 뉴클레오타이드, 및 더욱더 바람직하게 약 20개 내지 약 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열을 언급한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "올리고머"는 또한 100개 이상 내지 약 2000개의 뉴클레오타이드, 바람직하게 100개 이상 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드, 더욱더 바람직하게 100개 이상 내지 약 500개의 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열을 언급한다. "올리고뉴클레오타이드"는 또한 일반적으로 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드를 언급하고, 변형 RNA 또는 DNA, 또는 변형 RNA 또는 DNA일 수 있다. 변형은 백본 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. "올리고뉴클레오타이드"는 제한하지 않고 싱글- 및 더블-스트랜드 DNA, 싱글- 및 더블-스트랜드 부위의 혼합물인 DNA, 싱글- 및 더블-스트랜드 RNA, 및 싱글- 및 더블-스트랜드 부위의 혼합물인 RNA, 싱글- 스트랜드 또는, 더욱 통상적으로, 더블-스트랜드 또는 싱글- 및 더블-스트랜드 부위의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이드리브 분자를 포함한다. 추가로, "올리고뉴클레오타이드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA 둘 모두를 포함하는 트리플-스트랜드 부위를 언급한다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 합성, 유전자 또는 재조합, λ -DNA, 코스미드 DNA, 인공 세균 염색체, 효모 인공 염색체 및 선형 파지 예로서 M13일 수 있다.

용어 "올리고뉴클레오타이드"는 또한 하나 이상의 변형된 염기를 포함하는 DNAs 또는 RNAs 및 안정성 또는 다른 이유를 위해 변형된 백본을 갖는 DNAs 또는 RNAs를 포함한다. 예를 들면, 적절한 뉴클레오타이드 변형/유사체는 펩티드 핵산, 이노신, 트리틸화된 염기, 포스포로티오에이트, 알킬포스포로티오에이트, 5- 니트로인돌데옥시리보푸라노실, 5-메틸테옥시시토신 및 5, 6-디하이드로-5, 6- 디하이드록시테옥시티미딘을 포함한다. DNA 및 RNA에 대하여 다양한 변형이 형성된다; 따라서, "올리고뉴클레오타이드"는 자연상태에서 통상 발견되는 것과 같은 폴리뉴클레오타이드의 화학적, 효소적 또는 대사적으로 변형된 형태, 및 바이러스 및 세포의 DNA 및 RNA 특성의 화학적 형태를 포함한다. 다른 뉴클레오타이드 유사체/변형은 본 분야의 기술자에게 자명할 것이다.

패킹(패킹된): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "패킹"은 VLP와 관련하여면역자극 물질, 특히 면역자극 핵산의 상태를 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "패킹"은 화학적 커플링에 의한 공유결합 또는 비공유결합 예를 들면, 이온간 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합 등 일 수 있는 결합을 포함한다. 공유 결합은 예를 들면, 에스테르, 에테르, 포스포에스테르, 아마이드, 펩티드, 이미드, 탄소-황 결합, 탄소-인 결합 등일 수 있다. 용어 "패킹"은 예로서 용어 "커플링", "둘러싸임" 및 "부착(attached)"을 포함한다. 예를 들면, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드와 같은 면역자극 물질은 실제적인 결합, 공유결합 또는 비공유결합없이도 VLP에 의해 둘러싸일 수 있다. 바람직한 일례로 특히 면역자극 핵산이 면역자극 물질인 경우, 용어 "패킹"은 패킹 상태의 핵산은 DNase 또는 RNase에 의해 가수분해되기 어렵다는 것을 언급한다. 바람직한 일면으로, 면역자극 핵산은 가장 바람직하게 비공유 결합 방식으로 VLP 캡시드내에서 패킹된다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 임월 배합될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 하나 이상의 적합한 고체 또는 액상 충전제, 희석제 또는 인간 또는 다른 동물에 투여하기 적절한 캡슐화 물질을 의미한다. 용어 "담체"는 적용을 촉진화시키기 위하여 활성 성분과 배합되는 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분을 언급한다.

폴리펩티드: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "폴리펩티드"는 아마이드 결합(또는 펩티드 결합으로 공지됨)에 의해 선형으로 연결된 모노머(아미노산)으로 구성된 분자를 언급한다. 이는 아미노산 분자쇄를 지시하고 산물의 특정 길이를 언급하는 것은 아니다.

유기 분자: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "유기 분자"는 자연발생 또는 합성 기원의 화학적 엔터티를 언급한다. 특히, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "유기 분자"는 예로서, 자연발생 또는 합성 기원의 뉴클레오타이드, 리피드, 카보하이드레이트, 폴리사카라이드, 리포폴리사카라이드, 스테로이드, 알칼로이드, 테르펜 및 지방산으로 구성된 그룹으로부터의 구성원인 어느 분자를 포함한다. 특히, 용어 "유기 분자"는 예로서, 니코틴, 코카인, 헤로인 또는 남용 약물에 함유되어 있는 다른 약물학적 활성 분자를 포함한다. 일반적으로 유기 분자는 본 발명에 따라 바이러스-양 입자와 커플링, 결합 또는 다른 부착법을 허용케하는 화학적 작용기를 포함하거나 포함하도록 변형된다.

폴리펩티드: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "폴리펩티드"는 아마이드 결합(또는 펩티드 결합으로 공지됨)에 의해 선형으로 연결된 모노머(아미노산)으로 구성된 분자를 언급한다. 이는 아미노산 분자쇄를 지시하고 산물의 특정 길이를 언급하는 것은 아니다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드 및 단백질 이 폴리펩티드 정의에 포함된다. 이 용어는

또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들면, 당화, 아세틸화, 인산화 등은 언급하고자 한다. 필수적으로 재조합 또는 유래된 폴리펩티드가 지정된 핵산 서열로부터 해독되는 것은 아니다. 화학적 합성방법을 포함하는 어느 방식으로 형성될 수 있다.

면역 반응을 "증진"시키는 물질은 물질을 첨가하지 않고 측정된 동일한 면역 반응과 비교할 때 물질을 첨가하여 어느 방식으로든 면역 반응이 더욱 크거나 증대되거나 일탈하는(deviate) 것으로 관찰되는 물질을 언급한다.

바람직하게, 본 명세서에서 면역 반응을 "증진"시키는 물질은 (i) 어떤 물질도 첨가하지 않고 측정된 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이 T 세포의 빈도와 비교할 때, MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이 T 세포의 빈도를 증가시키는 물질 또는 (ii) 어떤 물질도 첨가하지 않고 측정된 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이 T 세포의 작용성과 비교할 때, MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이 T 세포의 작용성을 일탈시키거나, 바람직하게 개선시키는 물질, 또는 (iii) 어떤 물질도 첨가하지 않고 측정된 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이 T 세포의 증식, 세포자멸 또는 종양 조직으로의 귀소(homing)과 비교할 때 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 or 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이의 표현형인 T 세포는 일탈하고, 예로서, 생성된 T 세포는 증식을 증가시킬 수 있는 물질을 언급한다.

MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 T 세포 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이의 빈도는 MHC-부류 I/펩티드 콤플렉스 예로서, 테트라머 또는 멀티머 염색, 바람직하게 [Speiser, DE. et al. Eur J Immunol. 2002, Vol. 32,731- 741]에 기술된 바와 같이 테트라머 염색에 의해 측정되는 반면 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이, T 세포의 작용성은 사이토카인 방출 예로서, 세포내 염색, 사이토카인 포획 에세이, Elispot, ELISA, 및 바람직하게 [Speiser, DE. et al. Eur J Immunol. 2002, Vol. 32,731-741]에 기술된 바와 같은 Elispot에 의해 측정된다. 또한, [Valmori, D. et al. J. Immunol. 1998,161, 6956-6962]에 기술된 바와 같은 Chromium 또는 Europium 방출 에세이에서 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이, 세포용해 CD8+ T 세포 반응을 측정하여 MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 또는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이, T 세포의 작용성을 측정할 수 있다. MelanA-특이, 바람직하게 자연발생된 인간 MelanA 펩티드-특이 or 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체-특이 T 세포의 표현형은 세포 표면 또는 세포내 단백질에 대한 항체 예로서, 세포 활성화 마커, 세포 분화 마커, 호밍 마커, 케모카인 및 사이토카인 수용체, 공자극 수용체, 사멸 수용체, 킬러 활성화 및 저해 수용체, 인테그린, 항-아포프토시스 단백질의 발현 및 노쇠 마커의 부재, 및 바람직하게 [Speiser, DE. et al. Eur J Immunol. 2002, Vol. 32,731-741]에 기술된 세포 활성화 마커를 사용하여 측정한다.

유효량: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "유효량"은 원하는 생물학적 효능을 얻기 위해 필요하거나 충분한 양을 언급한다. 조성물의 유효량은 이러한 선택된 결과를 초래하는 양일 것이며, 이는 본 분야의 기술자에 의해 일반적으로 측정될 수 있다. 예를 들면, 면역결핍 치료를 위한 유효량은 면역계를 활성화시켜 항원에 노출되었을 때 항원 특이성 면역 반응을 발생시키기에 필요한 양일 수 있다. 이 용어는 "충분량"과 유사한 의미를 갖는다.

특정 적용에 대한 유효량은 치료하고자 하는 질환 또는 이상, 투여되는 특정 조성물, 대상의 크기, 및/또는 질환 또는 이상의 경중도와 같은 인자에 의해 달라질 수 있다. 본 분야의 기술자는 부적절한 실험을 요하지 않으면서 본 발명의 특정 조성물의 유효량을 실험적으로 측정할 수 있다.

자기 항원: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자기 항원"은 숙주 게놈 또는 DNA에 의해 코딩된 단백질을 언급하고, 숙주 게놈 또는 DNA에 의해 코딩된 단백질 또는 RNA에 의해 생성된 생성물은 자기로서 정의된다. 바람직하게, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자기 항원"은 인간 게놈 또는 DNA에 의해 코딩된 단백질을 언급하고, 인간 게놈 또는 DNA에 의해 코딩된 단백질 또는 RNA에 의해 생성된 생성물은 자기로서 정의된다. 자기 항원을 포함하는 백신, 본 발명의 조성물 및 억제학적 조성물은 특히 숙주에 적용되었을 때 자기 항원에 대한 내성을 차단(breaking)할 수 있다. 이와 관련하여, "자기 항원에 대한 내성 차단"은 본 명세서에서 정의되는 바, 자기 항원을 포함하는 백신, 본 발명의 조성물 및 억제학적 조성물을 숙주에 적용시켰을 때 특히 자기 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 것, 바람직하게 B 또는 T 세포 반응을 증진시키는 것을 언급한다. 또한, 두개 또는 수개의 자기 분자의 조합으로부터 생성되거나 자기 분자의 분해를 나타내는 단백질 및 상기 정의된 바와 같이 고도로 상동성인(> 95%, 바람직하게 > 97%, 더욱 바람직하게 > 99%)이 두개의 자기 분자를 갖는 단백질이 자가의 것으로 인지된다.

치료: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "치료", "치료하다", "치료받은" 또는 "치료하는"은 예방법 및/또는 치료법을 언급한다. 감염성 질환과 관련하여 사용되는 경우, 예를 들면, 상기 용어는 병원균 감염에 대하여 대상자의 내성을 증가시키거나, 다시말해, 대상자가 병원균에 의해 감염되거나 감염에 의한 병의 징후를 나타낼 가능성을 감소시키는 예방적 치료법 및 대상자가 감염된 후 감염과 싸우기 위한, 예를 들면, 감염을 감소시키거나 제거하거나 악화되지 못하도록 하는 치료법을 언급한다.

백신: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "백신"은 본 발명의 조성물을 포함하는 동물에 투여될 수 있는 형태의 제제를 언급한다. 전형적으로, 백신은 본 발명의 조성물이 현탁되거나 용해되는 완충 수용액 또는 통상의 염수를 포함한다. 본 발명의 조성물은 이상을 통상적으로는 예방하고, 호전시키기 위해, 다르게는 치료하기 위하여 사용된다. 숙주에 도입될 때, 백신은 제한하는 것은 아니지만 항체 및/또는 사이토카인의 생산, 세포독성 T 세포, 항원 제시 세포, 헬퍼 T 세포, 수상 세포 및/또는 다른 세포 반응의 활성화를 포함하는 면역 반응을 일으킬 수 있다.

임의로, 본 발명의 백신은 본 발명의 화합물에 비례하여 최소 또는 최대로 존재할 수 있는 애주버트를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "애주버트"는 면역 반응의 비특이성 자극제 또는 본 발명의 백신과 함께 배합되었을 때 더욱 증강된 면역 반응을 제공하는 숙주내 데포 생산을 가능하게 하는 물질을 언급한다. 다양한 애주버트가 사용될 수 있는 있다. 예를 들면, 프로인트 완전 및 불완전 애주버트, 수산화알루미늄 및 변형된 무라아미데펩티드를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "애주버트"는 본 발명의 백신과 함께 배합되었을 때 더욱더 증강되고 전형적인 특이 면역 반응을 제공하는 면역 반응의 전형적으로 특이적인 자극제를 언급한다. 예를 들면 제한하는 것은 아니지만, GM-CSF, IL-2, IL-12, IFN α 를 포함한다. 추가의 예는 본 분야의 기술자의 지식내 있다.

바이러스-양 입자 (VLP): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "바이러스-양 입자"는 바이러스 입자와 유사하지만, 병원성이라고 확인된 바 없는 구조를 언급한다. 전형적으로 본 발명에 따른 바이러스-양 입자는 바이러스-양 입자 단백질을 코딩하는 유전 정보를 수반하지 않는다. 일반적으로 바이러스-양 입자는 바이러스 게놈이 없기 때문에 비감염성이다. 또한 바이러스-양 입자는 주로 이중 발현에 의해 대량으로 생산될 수 있고, 용이하게 정제될 수 있다. 본 발명에 따른 바이러스-양 입자중 일부는 그의 게놈과는 상이한 핵산을 포함할 수 있다. 기술한 바와 같이, 바이러스 게놈 전부, 또는 일부, 특히 바이러스 게놈중 복제성 및 감염성 성분이 없기 때문에 본 발명에 따른 바이러스-양 입자는 비복제성이고 비감염성이다. 본 발명에 따른 바이러스-양 입자중 일부는 그의 게놈과는 상이한 핵산을 포함할 수 있다. 전형적이고 바람직한 본 발명에 따른 바이러스-양 입자는 바이러스 캡시드, 예로서 바이러스, 박테리오파지, 또는 RNA-파지의 바이러스 캡시드이다. 본 명세서에서 호환적으로 사용되는 바, 용어 "바이러스 캡시드" 또는 "캡시드"는 바이러스 단백질 서브유닛으로 구성되는 고분자 어셈블리를 언급한다. 전형적이고 바람직하게, 바이러스 단백질 서브유닛은 각각 고유의 반복적 구조를 갖는 바이러스 캡시드 및 캡시드내로 어셈블링된다(여기에서, 구조는 전형적으로 구형 또는 튜브형이다). 예를 들면, RNA-파지 또는 HBcAg의 캡시드는 대칭된 정이십면체 구형을 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "캡시드양 구조"는 충분히 정돈 및 반복 정도를 유지하면서 정의된 의미의 캡시드 형태와 유사하지만, 전형적인 대칭적 어셈블리로부터 이탈된 바이러스 단백질 서브유닛으로 구성된 고분자 어셈블리를 언급한다.

박테리오파지의 바이러스-양 입자: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "박테리오파지의 바이러스-양 입자"는 비복제성이고 비감염성이고, 박테리오파지의 복제수단(machinery)을 코딩하는 적어도 하나의 유전자 및 유전자들이 결합되어 있고, 전형적으로는 바이러스가 숙주와 결합하거나 그 내로 들어가는 것과 관련된 단백질 또는 단백질들을 코딩하는 유전자 또는 유전자들이 결합되어 있는, 박테리오파지의 바이러스-양 입자를 언급한다. 그러나, 상기 유전자 또는 유전자들이 존재하지만 불활성화이기 때문에 박테리오파지의 바이러스-양 입자를 비복제성이고 비감염성이 되도록 하는 박테리오파지의 바이러스-양 입자를 포함하여야 한다.

RNA 파지 코트 단백질의 VLP: 임의로 숙주 RNA를 포함하고 RNA 파지 코트 단백질의 180개의 서브유닛의 자가-어셈블리로부터 형성된 캡시드 구조를 "RNA 파지 코트 단백질의 VLP"로 언급한다. 특정 일례는 Q β 코트 단백질의 VLP이다. 특히, Q β 코트 단백질의 VLP는 Q β CP 서브유닛(서열번호 10)로부터만 어셈블리하거나(억제를 통해 장쇄의 A1 단백질의 어느 발현을 저지하는 TAA 종결 코돈을 포함하는 Q β CP의 발현을 통해 형성, 참조 Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996)), 추가로 캡시드 어셈블리에 A1 단백질 서브유닛(서열번호 11)를 포함할 수 있다. 리드 트루 과정은 효율이 낮고 이는 VLPs에서 극소량의 A1 단백질을 유도한다. 패키징된 ISS 및 커플링된 항원의 상이한 배합물을 사용하여 다수의 실시예를 수행하였다. Q β CP 서브유닛으로부터만 어셈블리된 Q β 코트 단백질의 VLPs 또는 캡시드내 추가로 A1 단백질 서브유닛을 포함하는 Q β 코트 단백질의 VLPs를 사용하였을 때 커플링 효율 및 패키징에서의 차이는 관찰되지 않았다. 추가로, 이들 Q β VLP 제제사이의 면역 반응도 관찰되지 않았다. 따라서, 명확하게 하기 위하여 용어 "Q β VLP"는 예를 들면, Q β CP 서브유닛으로부터만 어셈블리된 Q β 코트 단백질의 VLPs 또는 캡시드내 추가로 A1 단백질 서브유닛을 포함하는 Q β 코트 단백질의 VLPs에 대한 실례의 설명에서 사용된다.

본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "바이러스 입자"는 바이러스의 형태학적 형태를 언급한다. 일부 바이러스 타입에서 이는 단백질 캡시드로 둘러싸인 게놈을 포함하고; 다른 것은 추가 구조(예: 인벨럽, 테일(tail) 등)을 갖는다.

비-인벨럽 바이러스 입자는 바이러스 게놈을 둘러싸고 보호하는 단백질 캡시드로 구성된다. 인벨럽 바이러스는 또한 바이러스의 유전자 물질을 둘러싸는 캡시드 구조를 갖고, 추가로 캡시드를 둘러싸는 지질 이중층 인벨럽을 갖는다. 본 발명의 바람직한 일면으로, VLP's에는 리포프로테인 인벨럽 또는 리포프로테인-포함 인벨럽이 결합되어 있다. 추가의 바람직한 일면으로, VLP's에는 인벨럽 모두가 결합되어 있다.

하나(One), 한개(a), 또는 한개(an): 본 명세서에서 하나(One), 한개(a), 또는 한개(an)가 사용되는 경우, 이는 달리 언급하지 않는 한 "적어도 하나의" 또는 "하나 이상"을 의미한다.

본 분야의 기술자는 이해하고 있는 바와 같이, 본 발명의 특정 일면은 클로닝, 중합효소연쇄반응, DNA 및 RNA 정제, 원핵 및 진핵 세포등에서 재조합 단백질의 발현과 같은 재조합 핵산 기술의 사용을 포함한다. 상기 방법론은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있는 공개된 실험용 방법 메뉴얼에서 통상 발견할 수 있다(예: Sambrook, J. et al., eds., Molecular cloning, A Laboratory Manual, 2nd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel, F. et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)). 조직 배양 세포주를 사용하는 실험에 대한 기초 실험 기술(Celis, J., ed., Cell Biology, Academic Press, 2nd edition, (1998)) 및 항체-기초 기술(Harlow, E. and Lane, D., 항체: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988); Deutscher, M. P., "Guide to Protein Purification," Meth. Enzymol. 128, Academic Press San Diego (1990); Scopes, R. K., Protein Purification Principles and Practice, 3rd ed., Springer-Verlag, New York (1994)) 또한 상기 문헌(이들 모두는 전체적으로 참고문헌으로서 본 명세서에서 인용된다)에 적절하게 기술된다.

2. 면역 반응 증진용 조성물 및 증진 방법

기술하는 방법은 동물에서 하나 이상의 항원에 대한 면역 반응을 증진시키기 위한 조성물 및 증진 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 바이러스-양 입자 및 면역자극 물질, 바람직하게 면역자극 핵산, 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드, 및 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다(여기에서, 면역자극 물질, 면역자극 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 바이러스-양 입자에 결합하고, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자에 결합하고 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다). 또한, 본 발명을 통해 실시자는 용이하게 암 예방 및/또는 치료를 포함하는, 다양한 치료 및/또는 예방 목적을 위한 조성물을 제작할 수 있다.

본 발명에서 바이러스-양 입자는 바이러스 입자와 유사하지만, 비병원성인 구조를 언급한다. 일반적으로 바이러스-양 입자는 바이러스 게놈이 없기 때문에 비감염성이다. 또한 바이러스-양 입자는 주로 이중 발현에 의해 대량으로 생산될 수 있고, 용이하게 정제될 수 있다.

바람직한 일면으로, 바이러스-양 입자는 재조합 바이러스-양 입자이다. 본 분야의 기술자는 대중이 용이하게 이용할 수 있는 바이러스 코딩 서열 및 재조합 DNA 기술을 사용하여 VLPs를 제조할 수 있다. 예를 들면, 조절 서열에 코딩 서열을 작용 결합(functional linkage)시키는 서열의 적절한 변형을 통해 상업적으로 이용가능한 바쿨로바이러스 벡터를 사용하여, 바이러스 프로모터의 조절 제어하에 바쿨로바이러스 발현 벡터에서 바이러스 인벨럽 또는 코어 단백질의 코딩 서열을 발현시키기 위하여 조작할 수 있다.

VLPs의 예는 제한하는 것은 아니지만, B형 간염 바이러스, 홍역 바이러스, 신드비스 바이러스, 로타바이러스, 구저질환 바이러스, 노르윅 바이러스의 캡시드 단백질, 레트로바이러스 GAG 단백질, 레트로트랜스포손 Ty 단백질 pI, B형 간염 바이러스, 인간 유두종 바이러스, 인간 폴리오마 바이러스, BK 바이러스(BKV), RNA 파지, Ty, fr-파지, GA-파지, AP 205-파지 및, 특히, Q β -파지의 표면 단백질을 포함한다.

본 분야의 기술자에게 용이하게 이해되는 바, 본 발명의 VLP는 어느 특정의 형태로 제한하지 않는다. 입자는 화학적 또는 생물학적 과정을 통해 합성될 수 있고, 이는 자연발생이거나 비자연발생일 수 있다. 예로서 이러한 유형의 일례로 바이러스-양 입자 또는 그의 재조합 형태를 포함한다.

더욱 구체적인 일례로, VLP는 로타바이러스의 재조합 폴리펩티드, 노르워크 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 알파바이러스의 재조합 폴리펩티드, 구제 질환 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 홍역 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 신드비스 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 폴리오마 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 레트로바이러스의 재조합 폴리펩티드, B형 간염 바이러스의 재조합 폴리펩티드(예: HBcAg), 담배 모자이크병 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 플라크 하우스(Flock House) 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 인간 유두종바이러스의 재조합 폴리펩티드, 박테리오파지의 재조합 폴리펩티드, RNA 파지의 재조합 폴리펩티드, Ty의 재조합 폴리펩티드, fr-파지의 재조합 폴리펩티드, GA-파지의 재조합 폴리펩티드 및 Q β -파지의 재조합 폴리펩티드로부터 선택되는 재조합 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 구성되거나, 다르게는 구성될 수 있다. 바이러스-양 입자는 추가로 하나 이상의 상기 폴리펩티드, 및 상기 폴리펩티드 변이체로부터 선택되는 재조합 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 구성되거나, 다르게는 구성될 수 있다. 폴리펩티드 변이체는 예를 들면, 그의 야생형 카운터파트와 아미노산 수준으로 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치성을 공유할 수 있다.

바람직한 일례로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지의 재조합 폴리펩티드 또는 그의 단편을 포함하거나, 본질적으로는 상기로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 바람직하게, RNA-파지는 a) 박테리오파지 Q β ; b) 박테리오파지 R17; c) 박테리오파지 fr; d) 박테리오파지 GA; e) 박테리오파지 SP; f) 박테리오파지 MS2; g) 박테리오파지 M11; h) 박테리오파지 MX1; i) 박테리오파지 NL95; k) 박테리오파지 f2; l) 박테리오파지 PP7; m) 박테리오파지 AP25로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

본 발명의 또다른 바람직한 일례로, 바이러스-양 입자는 RNA-박테리오파지 Q β , 또는 RNA-박테리오파지 fr, RNA-박테리오파지 AP205의 재조합 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 재조합 단백질은 RNA 파지의 코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

캡시드 또는 VLPs를 형성하는 RNA-파지 코트 단백질, 또는 캡시드 또는 VLP내로의 자기-어셈블리에 적합한 박테리오파지 코트 단백질의 단편이 본 발명의 추가의 바람직한 일면이다. 예를 들면, 박테리오파지 Q β 코트 단백질은 *E. coli*에서 재조합적으로 발현될 수 있다. 추가로, 발현시 이 단백질은 캡시드를 자발적으로 형성한다. 또한, 이 캡시드는 고유한 반복적 체계의 구조를 형성한다.

본 발명의 조성물 제조에 사용할 수 있는 박테리오파지 코트 단백질의 특정 일례는 박테리오파지 Q β (서열번호: 10; PIR 데이터베이스, 수탁번호 VCBPQR, Q β CP로 언급됨 및 서열번호: 11; 수탁번호 AAA16663, Q β A1 단백질로 언급됨) 박테리오파지 R17(PIR 수탁번호 VCBPR7), 박테리오파지 fr(서열번호: 13; PIR 수탁번호 VCBPFR), 박테리오파지 GA(서열번호: 14; GenBank 수탁번호 NP-040754), 박테리오파지 SP(GenBank 수탁번호 CAA30374, SP CP로 언급됨 및 수탁번호: NP695026, SP A1 단백질로 언급됨) 박테리오파지 MS2 (PIR 수탁번호 VCBPM2), 박테리오파지 M11(GenBank 수탁번호 AAC06250), 박테리오파지 MX1 (GenBank 수탁번호 AAC14699), 박테리오파지 NL95 (GenBank 수탁번호 AAC14704), 박테리오파지 f2 (GenBank 수탁번호 P03611), 박테리오파지 PP7 (서열번호: 19), 및 박테리오파지 AP205 (서열번호:31)와 같은 RNA 박테리오파지의 코트 단백질을 포함한다. 추가로, 박테리오파지 Q β 의 A1 단백질 또는 그의 C-말단으로부터 약 100, 약 150 또는 약 180 아미노산 정도가 누락된 C-말단 절단형을 Q β 코트 단백질의 캡시드 어셈블리내로 혼입시킬 수 있다. 일반적으로, 캡시드 어셈블리중 Q β CP에 상대적인 A1 단백질의 퍼센트는 캡시드 형성을 안정하게 하기 위하여 제한될 것이다. 추가로 박테리오파지 코트 단백질의 특정 일례는 본 명세서에서 참고문헌으로서 인용되는 WO02/056905의 45 및 46 페이지에 기술되어 있다. 추가로, 본 발명에 RNA-파지, 특히 Q β 의 바람직한 바이러스-양 입자는 본 명세서에서 참고문헌으로서 인용되는 WO 02/056905에 기술되어 있다.

본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다(여기에서, 재조합 단백질은 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질, 바람직하게 상기 언급한 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다. 또다른 바람직한 일면으로, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 제거, 또는 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형되었거나; 다르게 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 또는 삽입에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형된다. 특히 백신 요건에 일치시키고, 그에 적합화(tailor)시키기 위하여 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 치환 또는 첨가를 통해 커핑 정도, 즉 RNA 파지 VLP 서브유닛당 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체의 양을 다양하게 할 수 있다. 본 발명의 바람직한 일면으로, 서브유닛당 대략 적어도 1.0개의 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 RNA 파지 VLP에 결합시킨다.

이 값은 RNA 파지 VLP 모노머 또는 모든 서브유닛에 대한 평균으로서 계산된다. 본 발명의 추가의 일면으로, RNA 파지 VLP 모노머 또는 모든 서브유닛에 대한 커플링 평균으로서 계산된 바, 적어도 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9개 또는 적어도 2.0개의 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 RNA 파지 VLP에 결합시킨다.

또다른 바람직한 일면으로, 바이러스-양 입자는 RNA-박테리오파지 Q β 의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다(여기에서, 재조합 단백질은 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 코트 단백질, 또는 서열번호: 10 및 서열번호:11의 아미노산 서열 또는 서열번호 11의 뮤턴트를 갖는 코트 단백질 혼합물을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성되고, N-말단 메티오닌은 바람직하게 절단된다).

본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스-양 입자는 Q β 의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다(여기에서, 재조합 단백질은 뮤턴트 Q β 코트 단백질을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다). 또다른 바람직한 일면으로, 이들 뮤턴트 코트 단백질은 치환에 의해 적어도 하나의 리신 잔기를 제거하거나, 치환에 의해 적어도 하나의 리신 잔기를 첨가하여 변형된다. 다르게는, 이들 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 또는 삽입에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형된다.

4개의 리신 잔기는 Q β 코트 단백질 캡시드 표면상에 노출되어 있다. 아르기닌으로 대체된 Q β 뮤턴트의 노출된 리신 잔기가 본 발명에 사용될 수 있다. 하기의 Q β 코트 단백질 뮤턴트 및 뮤턴트 Q β VLPs를 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다: "Q β -240" (Lys 13-Arg; 서열번호 :20), "Q β -243" (Asn 10-Lys; 서열번호 :21), "Q β -250" (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; 서열번호 :22), "Q β -251" (서열번호 : 23) 및 "Q β -259" (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; 서열번호 : 24). 따라서, 추가로 바람직한 본 발명의 일면으로 바이러스-양 입자는 a) 서열번호: 20의 아미노산 서열; b) 서열번호: 21의 아미노산 서열; c) 서열번호: 22의 아미노산 서열; d) 서열번호: 23의 아미노산 서열; 및 e) 서열번호: 24의 아미노산 서열로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 단백질을 포함하는, 뮤턴트 Q β 코트 단백질의 재조합 단백질을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다. 상기 언급한 Q β 코트 단백질, 뮤턴트 Q β 코트 단백질 VLP 및 캡시드 각각의 작제, 발현 및 정제는 W002/056905에 기술되어 있다. 특히 본 명세서에서는 상기 언급한 출원의 실시예 18을 참고한다.

본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스-양 입자는 Q β 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다(여기에서, 재조합 단백질은 상기 Q β 뮤턴트 및 상응하는 A1 단백질 중 하나의 혼합물을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다).

본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다.

AP205 계통은 성숙단백질, 코트 단백질, 리플리케이스 및 관련 파지에는 존재하지 않는 두개의 오픈리딩 프레임; 분해 유전자 및 성숙 유전자의 해독에서 중요한 역할을 하는 오픈 리딩 프레임으로 구성되어 있다(Klovins, J., et al., J. Gen. Virol. 83: 1523-33 (2002)). AP205 코트 단백질은 플라스미드 pAP283- 58 (서열번호: 30)로부터 발현될 수 있고, 이는 pQb10의 유도체이며(Kozlovskaya, T. M. et al., Gene 137: 133-37 (1993)), AP205 리보솜 결합 사이트를 포함한다. 다르게는, AP205 코트 단백질은 벡터에 존재하는 리보솜 결합 사이트 하류의 pQb 185내로 클로닝될 수 있다. WO 04/007538(본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로서 인용됨)에 기술된 바와 같이 두개의 접근법을 통해 단백질을 발현시키고 캡시드를 형성시킨다. 벡터 pQb10 및 pQb185는 pGEM으로부터 유래된 벡터이고 이들 벡터에서 클로닝된 유전자의 발현은 trp 프로코터에 의해 조정된다(Kozlovskaya, T. M. et al., Gene 137: 133-37 (1993)). 플라스미드 pAP283-58(서열번호: 30)은 하기 서열에서 XbaI 사이트의 하류, 및 AP205 코트 단백질의 ATG 개시 코돈 상류에 인접하게 추정된 AP205 리보솜 결합 사이트를 포함한다:

tctagaATTTTCTGCGCACCCATCCCGGGTGGCGCCCAAAGTGAGGAAAATCACatg(서열번호 30의 염기 77-133).
 벡터 pQb185는 XbaI 사이트로부터 하류 및 개시 코돈 상류에 Shine Delagarno 서열을 포함한다
 (tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAGTCAGGCCatg(서열번호: 61), 밑줄친 서열이 Shine Delagarno이다).

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 바이러스-양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 코트 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다.

따라서, 본 발명의 바람직한 일면은 캡시드를 형성하는 AP205 코트 단백질을 포함한다. 상기 단백질은 재조합으로 발현되거나, 자연발생된 원으로부터 제조된다.

박테리아에서 생산된 AP205 코트 단백질은 전자현미경(EM) 및 면역확산법에 의해 입증된 바 자발적으로 캡시드를 형성한다. AP205 코트 단백질(서열번호: 31)에 의해 형성된 캡시드의 구조적 성질 및 AP205 RNA 파지의 코트 단백질에 의해 형성된 캡시드의 것은 EM에 의해 관찰할 경우 거의 식별불가능하다. AP205 VLP는 고도로 면역원성이고, 항원 및/또는 항원 결정기와 결합하여 반복적 방식으로 방향성을 띤 항원 및/또는 항원 결정기를 디스플레이하는 백신 구조물을 형성할 수 있다. 결합한 항원 및/또는 항원 결정기는 항체 분자와 상호작용하기 쉽고 면역원성이라는 것을 나타내는 디스플레이된 항원에 대하여 고역가를 유도한다.

본 발명의 추가로 바람직한 일례로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 뮤턴트 코트 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

5번 아미노산인 프롤린이 트레오닌으로 치환된 AP205 코트 단백질(서열번호: 32)을 포함하는 어셈블링 수행능력이 있는 돌연변이 형태의 AP205 VLP 또한 본 발명의 실시예에 사용할 수 있고, 본 발명의 추가로 바람직한 일례이다. 이들 VLP, 자연발생 공급원으로부터 유래된 AP205 VLP, 또는 AP205 바이러스 입자는 항원과 결합하여 본 발명의 항원의 정돈되고 반복적인 어레이를 형성할 수 있다.

AP205 P5-T 뮤턴트 코트 단백질은 pQb185로부터 직접적으로 유도되고 QB 코트 단백질 유전자 대신 돌연변이 AP205 코트 단백질을 포함하는 플라스미드 pAP281-32(서열번호:33)로부터 발현될 수 있다. AP205 코트 단백질을 발현시키기 위한 벡터를 *E. coli*내로 형질감염시켜 AP205 코트 단백질을 발현시킨다.

각각 VLP내로 자가-어셈블리하는 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질을 발현시키는 방법은 WO 04/007538(본 명세서에서 참고문헌으로 인용된다)에 기술되어 있다. 적절한 *E. coli* 균주는 제한하는 것은 아니지만 *E. coli* K802, JM 109, RR1 이다. 적절한 벡터 및 균주 및 그의 배합물은 SDS-PAGE에 의해 각각 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질의 발현을 테스트하여 확인하고 캡시드 형성 및 어셈블리는 임의로 우선 겔 여과에 의해 캡시드를 정제한 후 연속하여 면역확산 분석(Ouchterlony test) 또는 전자현미경법에 의해 테스트하여 확인한다(Kozlovskaya, T. M., et al., Gene 137 : 133-37(1993)).

벡터 pAP283-58 및 pAP281-32로부터 발현된 AP205 코트 단백질은 *E. coli*의 세포질에서 프로세싱되기 때문에 초기 메티오닌 아미노산이 결핍되어 있을 수 있다. 절단, 절단되지 않은 형태의 AP205 VLP, 또는 그의 혼합물이 본 발명의 추가로 바람직한 일례이다.

본 발명의 추가로 바람직한 일례로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 코트 단백질, 또는 그의 단편의 혼합물 및, RNA-파지 AP205의 재조합 뮤턴트 코트 단백질, 또는 그의 단편의 혼합물을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된다.

본 발명의 추가로 바람직한 일례로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 코트 단백질 또는 재조합 뮤턴트 코트 단백질의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된다.

각각 VLP 및 캡시드내로 어셈블링할 수 있는 재조합 AP205 코트 단백질 단편은 또한 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 이 단편은 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질의 내부 또는 말단에서 결실되므로써 형성될 수 있다. VLP내로의 어셈블리에 적합한 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질 서열내 삽입 또는 항원 서열과 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질 서열의 융합이 본 발명에 포함되고, 이는 각각 키메라성 AP205 코트 단백질, 및 입자를 가져온다. 삽입, 결실 및 코트 단백질 서열에 대한 융합 결과 및 VLP내로의 어셈블리 적합성 여부는 전자현미경으로 측정할 수 있다.

WO 04/007538(본 명세서에서 참고문헌으로 인용된다)에 기술된 바와 같이 상기 기술된 AP205 코트 단백질, 코트 단백질 단편 및 키메라성 코트 단백질에 의해 형성된 입자는 침전에 의한 분류 단계 및 예를 들면, 세파로스 CL-4B, 세파로스 CL-2B, 세파로스 CL-6B 칼럼 및 그의 조합을 사용하여 겔 여과에 의한 정제 단계를 병용하여 순수한 형태로 분리할 수 있다. 바이러스-양 입자를 분리하는 다른 방법은 공지되어 있고, 이를 사용하여 박테리오파지 AP205의 바이러스-양 입자(VLP)를 분리할 수 있다. 예를 들면, 효모 레트로트랜스포존(retro트랜스포존) Ty의 VLP를 분리하기 위하여 초원심분리법을 사용하는 것이 U. S. Patent No. 4,918, 166(본 명세서에서 참고문헌으로 인용된다)에 기술되어 있다.

여러 RNA 박테리오파지의 결정형 구조가 측정되었다(Golmohammadi, R. et al., 구조 4 : 543-554(1996)). 상기 정보를 사용하여, 표면 노출 잔기를 확인하고 하나 이상의 반응성 아미노산 잔기가 삽입 또는 치환에 의해 삽입될 수 있도록 RNA-파지 코트 단백질을 변형시킬 수 있다. 따라서, 변형된 형태의 박테리오파지 코트 단백질을 본 발명에 사용할 수 있

다. 따라서, 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 단백질의 변이체(예: 박테리오파지 Q β , 박테리오파지 R17, 박테리오파지 fr, 박테리오파지 GA, 박테리오파지 SP, 및 박테리오파지 MS2의 코트 단백질) 또한 본 발명의 조성물 및 백신 조성물 제조에 사용할 수 있다. 추가로, 본 발명에 사용하기 적절한 변형된 RNA 박테리오파지 및 단백질의 변이체 및 캡시드 또는 캡시드 양 구조를 형성하는 N- 및 C- 말단 절단 뮤턴트, 및 조성물 백신 조성물을 제조하는 방법의 가능한 일례들 각각 WO 02/056905의 50페이지, 33째줄 내지 52페이지 29에 기술되어 있다.

따라서, 본 발명은 캡시드 또는 VLPs를 형성하는 단백질로부터 제조된 조성물 및 백신 조성물, 각개 단백질 서브유닛 및 캡시드 또는 VLPs로부터 이들 조성물을 제조하는 방법, 각개 단백질 서브유닛, 이들 서브유닛을 코딩하는 핵산 분자를 제조하는 방법, 및 본 발명의 이들 조성물을 사용하여 개별적으로 면역 반응을 유도하고/거나 백신화시키는 방법을 포함한다.

본 발명의 또다른 바람직한 일면으로, VLP에는 리포프로테인 인벨럽 또는 리포프로테인-함유 인벨럽이 결합되어 있다. 추가의 일면으로, VLP'에는 인벨럽 모두가 결합되어 있다.

리포프로테인 인벨럽 또는 리포프로테인-포함 인벨럽의 결합 및, 특히, 인벨럽의 완전한 결합은 그 구조물 및 조성물에서 더욱 한정된 바이러스-양 입자를 유도한다. 따라서, 더욱 한정된 바이러스-양 입자에 의해 부작용은 최소화될 수 있다. 또한, 리포프로테인 인벨럽 또는 리포프로테인-포함 인벨럽의 결합 및, 특히, 인벨럽의 완전한 결합은 바이러스-양 입자 내 잠재적으로 독성인 물질 및 발열원의 혼입을 회피하거나 최소화시킨다.

일면으로, 본 발명은 바이러스-양 입자, 바람직하게는 바이러스-양 입자가 재조합 바이러스-양 입자인 본 발명의 백신 조성물을 제공한다. 바람직하게, 바이러스-양 입자는 RNA-파지, 바람직하게 RNA 파지의 코트 단백질의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다. 다르게는, 본 발명의 백신 조성물의 바이러스-양 입자의 재조합 단백질은 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다(여기에서, RNA-파지는 (a) 박테리오파지 Q β ; (b) 박테리오파지 R17; (c) 박테리오파지 fr; (d) 박테리오파지 GA; (e) 박테리오파지 SP; (f) 박테리오파지 MS2; (g) 박테리오파지 MI 1; (h) 박테리오파지 MX1; (i) 박테리오파지 NL95; (k) 박테리오파지 f2; (1) 박테리오파지 PP7; 및 (l) 박테리오파지 AP205로 구성된 그룹으로부터 선택된다).

바람직한 일면으로, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 제거, 또는 첨가에 의해 변형된다. 또다른 바람직한 일면으로, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 또는 삽입에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형된다. 바람직한 일면으로, 바이러스-양 입자는 RNA-파지 Q β , RNA-파지 fr, 또는 RNA-파지 AP205의 재조합 단백질 또는 그의 단편을 포함한다.

상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 바이러스-양 입자 또는 그의 재조합 형태를 포함한다. 본 분야의 기술자는 입자를 제조하고 그에 대한 항원을 결합시키는 지식을 갖고 있다. 추가로 본 발명의 바람직한 일면은 실시예에 기술되어 있다.

일면으로, 바이러스-양 입자는 BK 바이러스 (BKV)의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다(여기에서, 재조합 단백질은 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함하거나, 또는 다르게는 실질적으로 그로 구성되거나, 또는 다르게는 구성된다). BK 바이러스 (BKV)는 파포바바이러스과의 폴리오마 바이러스 서브패밀리에 속하는 비-인벨럽 더블 스트랜드 DNA 바이러스이다. VP1는 BKV의 주요 캡시드 단백질이다. VP1은 362개의 아미노산을 갖고(서열번호: 12, Gene Bank entry: AAA46882) 그의 크기는 42 kDa이다. E. coli에서 제조될 때 곤충 세포 또는 효모 VP 1은 자발적으로 캡시드 구조를 형성한다(Salunke D. M., et al., 세포 46 (6): 895-904 (1986); Sasnauskas, K., et al., Biol. Chem. 380 (3): 381-6 (1999); Sasnauskas, K., et al., 3rd International Workshop "Virus-like particles as 백신s" Berlin, September 26-29 (2001); Touze, A., et al., J Gen Virol. 82 (Pt 12): 3005-9 (2001)). 캡시드는 정20면체 구조를 형성하는 72 VP1 펜타머로 구조화된다. 캡시드의 지름은 약 45nm이다.

일면에서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 입자는 B형 간염 캡시드(코어) 단백질(HBcAg), HBcAg 단편으로 구성된다. 추가의 일례로, 본 발명의 조성물에서 사용되는 입자는 B형 간염 캡시드(코어) 단백질(HBcAg), HBcAg 단백질 단편으로 유리 시스테인 잔기를 제거하거나 그 갯수를 감소시키기 위하여 변형된다. Zhou 등(J. Virol. 66 : 5393-5398(1992)은 자연적으로 남아있는 시스테인 잔기가 제거되어 변형된 HBcAg는 캡시드와 결합하고 형성하는 능력을 보유하고 있다고 증명하였다. 따라서, 본 발명의 조성물에 사용하기에 코어 입자는 자연적으로 남아있는 하나 이상의 시스테인 잔기가 결실되거나 또다른 아미노산 잔기(예: 세린 잔기)로 치환된 변형된 HBcAg, 또는 그의 단편을 포함하는 것을 포함한다.

HBcAg은 B형 간염 코어 항원 전구체 단백질을 프로세싱하여 형성된 단백질이다. 다수의 HBcAg 이소타입이 확인되었고 그의 아미노산 서열을 본 분야의 기술자는 이용하게 이용할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 16에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 HBcAg 단백질의 길이는 183개의 아미노산이고 이는 212개의 아미노산의 B형 간염 코어 항원 전구체 단백질을 프로세싱하여 형성된다. 상기 프로세싱에 의해 B형 간염 코어 항원 전구체 단백질의 N-말단으로부터 29개의 아미노산이 제거된다. 유사하게 길이가 185개의 아미노산인 HBcAg 단백질은 214 아미노산 B형 간염 코어 항원 전구체 단백질을 프로세싱하여 형성된다.

본 발명의 조성물 및 백신 조성물 각각은 HBcAg의 프로세싱된 형태(즉, B형 간염 코어 항원 전구체 단백질의 N-말단 리더 서열이 제거된 HBcAg)를 사용하여 제조할 수 있다.

추가로, 프로세싱이 되지 않는 조건하에서 HBcAg가 제조될 때 HBcAg는 일반적으로 "프로세스"된 형태로 발현될 것이다. 예를 들면, 박테리아 시스템, 예로서, *E. coli*는 통상 진핵 세포에서 정상적으로 발현되는 단백질의 리더서열("시그널 서열"로도 언급됨)을 제거하지 않는다. 따라서, 세포질로 단백질을 발현시키는 *E. coli* 발현 시스템을 본 발명의 HBcAg 생산에 사용할 때 이들 단백질은 통상 B형 간염 코어 항원 전구체 단백질의 N 말단 리더 서열이 존재하지 않도록 발현될 것이다.

본 발명에 사용할 수 있는 바람직한 B형 간염 바이러스-양 입자는 예를 들면, WO 00/32227, 특히 실시예 17 내지 19 및 21 내지 24, 및 WO 01/85208, 특히 실시예 17 내지 19, 21 내지 24, 31 및 41, 및 2002년 1월 18일에 현 양수인에 의해 출원된 계류중인 U. S. Application No. 10/050,902에 기술되어 있다. 후자 출원의 경우에는 특히, 실시예 23, 24, 31 및 51에 기술되어 있다. 3개의 문서 모두 전체적으로 참고문헌으로서 인용된다.

본 발명은 또한 하나 이상의 추가의 시스테인 잔기를 결실시키거나 치환하여 변형된 HBcAg 변이체를 포함한다. 따라서, 백신 본 발명의 조성물은 서열번호 16에 나타낸 아미노산에 존재하지 않는 시스테인 잔기가 결실된 HBcAg를 포함하는 조성물을 포함한다.

본 분야에서는 유리 시스테인 잔기가 다수의 화학적 부작용에 관여할 수 있다고 공지되어 있다. 이 부작용은 디설파이드 교환, 예를 들면, 다른 물질과의 병용 요법에서 주사되거나 형성된 화학 물질 또는 대사물질과의 반응, 또는 직접적인 산화 및 UV 노출시 뉴클레오티드와의 반응을 포함한다. 특히, HBcAg는 핵산에 결합하는 경향이 있다는 사실을 고려할 때 독소 첨가 물질이 형성될 수 있다. 따라서 개별적으로 낮은 농도로 존재할 수 있지만 함께인 경우에는 독성 수준에 도달할 수 있는 독소 첨가 물질은 다수의 종 사이에 분포할 수 있다.

상기와 관련하여, 변형시켜 자연발생적으로 남아있는 시스테인 잔기를 제거된 백신 조성물중 HBcAg의 용도에 대한 잇점은 항원 또는 항원 결정기가 결합한 경우 독소 종류가 결합하는 부위가 양적으로 감소하거나 모두 제거된다는 점이다.

다수의 실시예 사용하기에 적절한 다수의 자연발생된 HBcAg 변이체가 확인되었다. Yuan 등(J. Virol. 73 : 10122-10128(1999))은 예를 들면, 서열번호: 25의 97번 위치에 상응하는 위치의 이소류신 잔기가 류신 잔기 또는 페닐 알라닌 잔기로 대체된 변이체를 기술하였다. 다수의 HBcAg 변이체, 및 수개의 B형 간염 코어 항원 전구체 변이체의 아미노산 서열은 GenBank 리포트 AAF121240, AF121239, X85297, X02496, X85305, X85303, AF151735, X85259, X85286, X85260, X85317, X85298, AF043593, M20706, X85295, X80925, X85284, X85275, X72702, X85291, X65258, X85302, M32138, X85293, X85315, U95551, X85256, X85316, X85296, AB033559, X59795, X85299, X85307, X65257, X85311, X85301 (서열번호 : 26), X85314, X85287, X85272, X85319, AB010289, X85285, AB010289, AF121242, M90520 (서열번호 : 27), P03153, AF110999, 및 M95589에 기술되어 있고 이들 각각은 전체적으로 참고문헌으로서 본 명세서에서 인용된다. 상기 언급한 B형 간염 코어 항원 전구체 변이체의 서열은 추가로 WO01/85208의 서열번호: 89-138에 기술되어 있다. 이들 HBcAg 변이체는 서열번호: 28에서 위치 12,13, 21,22, 24,29, 32,33, 35,38, 40,42, 44,45, 49,51, 57,58, 59,64, 66,67, 69,74, 77,80, 81,87, 92,93, 97,98, 100,103, 105,106, 109,113, 116,121, 126,130, 133,135, 141,147, 149, 157,176, 178,182 및 183에 위치하는 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는, 여러 위치의 아미노산 서열에서 상이하다. 추가로, 본 발명의 조성물에 사용하기 적절하고 본 명세서에 따라 추가로 변형될 수 있는 HBcAg 변이체는 WO 00/198333, WO 00/177158 및 WO 00/214478에 기술되어 있고, 이는 전체적으로 참고문헌으로서 본 명세서에서 인용된다.

본 발명에 사용하기 적절한 HBcAg는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오티드를 둘러싸거나, 그와 커플링하거나, 다르게는 그에 결합할 수 있거나, 특히 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오티드를 패키징할 수 있고, 면역 반응을 유도하는 한, 모든 유기체로부터 유래될 수 있다.

상기 언급한 바와 같이, 프로세싱된 HBcAg(즉, 리더 서열이 결여된 서열)를 본 발명의 조성물 및 백신 조성물에 사용할 것이다. 본 발명은 조성물, 및 이 조성 물을 사용하는 방법을 포함하고, 이는 상기 기술한 변이체 HBcAg를 사용한다.

추가로, 다이머 또는 멀티머를 형성하기 위하여 결합할 수 있는 추가의 HBcAg 변이체가 본 발명의 범주내 포함된다. 따라서, 본 발명은 추가로 야생형 아미노산 서열들중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 약 99% 일치하는 아미노산 서열, 및 적절하게는 N-말단 리더 서열을 제거하기 위하여 프로세싱된 이들 단백질 형태를 포함하거나, 다르게는 그로 구성된 HBcAg 폴리펩티드를 포함하는 각각의 조성물 및 백신 조성물을 포함한다.

폴리펩티드의 아미노산 서열이 상기 야생형 아미노산 서열들중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 약 99% 일치하는 아미노산 서열, 또는 그의 하위부분을 갖는지는 Bestfit 프로그램과 같이 공지된 컴퓨터 프로그램을 통상적으로 사용하여 결정할 수 있다. 특정 서열이 본 발명에 따른 참고 아미노산 서열과 예를 들면, 약 95% 일치하는지 결정하기 위하여 Bestfit 또는 어느 다른 서열 배열(alignment) 프로그램을 사용하는 경우 파라미터를 세팅하여 일치도(%)를 전장의 참고 아미노산 서열에 대하여 계산하고 참고 아미노산 서열중 전체 아미노산 잔기의 5% 이하의 상동성의 차는 인정한다.

상기 언급한 HBcAg 변이체 및 전구체의 아미노산 서열은 상대적으로 서로 유사하다. 따라서, 서열번호 28중 특정 위치에 상응하는 위치에 존재하는 HBcAg 변이체의 아미노산 잔기에 대한 언급은 서열번호: 28에 나타난 아미노산 서열중 그 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 참고한다. 이들 HBcAg 변이체 사이의 상동성은 포유동물을 감염시키는 B형 간염 바이러스중에서 대체로 매우 높기 때문에 본 분야의 기술자는 서열번호 28에 나타난 아미노산 서열과 특정 HBcAg의 변이체의 것을 리뷰하고 "상응하는" 아미노산 잔기를 확인하는 것이 어렵지 않을 것이다. 추가로, 우드척을 감염시키는 바이러스로부터 유래된 HBcAg의 아미노산을 나타내는 서열번호: 28에 나타난 HBcAg 아미노산 서열은 서열번호 28중 155번 아미노산 잔기 및 156번 아미노산 잔기 사이에 서열번호: 27에 3개의 아미노산 잔기 인서트가 존재한다는 것이 자명한 서열번호 28에 나타난 아미노산 서열을 갖는 HBcAg과 충분히 상동성이다.

본 발명은 또한 가금류를 감염시키는 B형 간염 바이러스의 HBcAg 변이체를 포함하는 백신 조성물, 및 HBcAg 변이체의 단편을 포함하는 백신 조성물을 포함한다. 이들 HBcAg 변이체에 대하여 이 폴리펩티드에 자연발생적으로 존재하는 1개, 2개, 3개 이상의 시스테인 잔기는 본 발명의 백신 조성물에 포함되기 앞서 또다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실될 수 있다.

상기 기술한 바와 같이, 유리 시스테인 잔기를 제거하여 독소 성분이 HBcAg에 결합하는 부위, 동일하거나 이웃하는 HBcAg의 리신 및 시스테인 잔기의 가교-결합 부위의 수를 감소시킨다. 따라서, 본 발명의 또다른 일면에서, B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 하나 이상의 시스테인 잔기는 또다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실될 수 있다. HBcAg-Lys 변이체의 발현 및 정제는 WO 02/056905 실시예 24에 기술되어 있고, 유리 시스테인 잔기가 결여되어 있고 삽입된 리신 잔기를 포함하는 HBcAg 작제는 WO 02/056905 실시예 31에 기술되어 있다.

다른 일면에서, 본 발명의 조성물 및 백신 조성물은 각각 C-말단 부위 (예: 서열번호 28중 145-185번 또는 150-185번 아미노산 잔기)가 제거된 것으로부터의 HBcAg를 포함할 것이다. 따라서, 본 발명의 실시예 사용하기 적절한 추가로 변형된 HBcAg는 C-말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 C-말단으로부터 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 34, 35번 아미노산이 제거된 HBcAg를 포함한다.

본 발명의 실시예 사용하기 적절한 추가로 변형된 HBcAg는 N-말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 N-말단으로부터 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 제거된 변형된 HBcAg를 포함한다.

추가로 본 발명의 실시예 사용하기 적절한 추가로 변형된 HBcAg는 N- 및 C- 말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 N-말단으로부터 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 제거되고, C-말단으로부터 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 34, 35번 아미노산이 제거된 HBcAg를 포함한다.

본 발명은 추가로 상기 기술한 절단 뮤턴트와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치하는 아미노산을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 단백질을 포함하는, 각각의 조성물 및 백신 조성물을 포함한다.

본 발명의 특정 일면으로, 리신 잔기를 HBcAg 폴리펩티드에 도입시켜 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 HBcAg의 VLP의 결합을 매개시킨다. 바람직한 일면으로, 79번 및 80번 위치에 상응하는 아미노산이 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (서열번호: 18)의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 대체되어 서열번호: 20의 서열을 갖는 HBcAg 폴리펩티드를 수득할 수 있도록 변형된 서열번호: 28의 아미노산 1-144, 또는 1-149, 1-185을 포함하거나, 다르게는 그로 구성된 HBcAg을 사용하여

본 발명의 조성물을 제조한다. 본 조성물은 특히 항원 결정기가 HBcAg의 VLP와 커플링하고 있는 일면에서 유용하다. 추가로 바람직한 일면으로, 서열번호 : 28의 위치 48번 및 107번의 시스테인 잔기는 세린으로 돌연변이화된다. 추가로 본 발명은 상기 언급한 B형 간염 코어 항원 전구체 변이체중 어느 것으로 제시한 아미노산 서열, 또는 상기 언급한 아미노산 변형을 갖는 상응하는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 포함한다. 추가로 결합하여 캡시드 또는 VLP를 형성하고 상기 언급한 아미노산 변형을 갖는 추가의 HBcAg 변이체도 본 발명의 범위내 포함된다. 따라서, 본 발명은 추가로 야생형 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 일치하는 아미노산 서열, 및 프로세스되어 적절하게는 N 말단 리더 서열이 제거되고 상기 언급된 변형으로 변형된 단백질 형태를 포함하거나, 다르게는 그로 구성된 HBcAg 폴리펩티드를 포함하는 각각의 조성물 및 백신 조성물을 포함한다.

본 발명의 조성물 및 백신 조성물은 상이한 HBcAg의 혼합물을 포함할 수 있다. 따라서, 백신 조성물은 아미노산 서열이 상이한 HBcAg로 구성될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된(예: 결실, 삽입 또는 치환) 변형된 HBcAg 및 "야생형" HBcAg를 포함하여 조성물 및 백신 조성물을 제조할 수 있다. 추가로, 본 발명의 바람직한 백신 조성물은 항원이 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체인 고도로 정돈되고 반복적 항원 에피톱을 제시하는 것이다.

상기 기술된 바와 같이, 본 발명은 변형된 VLP's, 즉 면역자극 물질, 바람직하게 면역자극 핵산 및 더욱더 바람직하게 DNA 올리고뉴클레오타이드 또는 다르게는 폴리 (I: C)가 결합된 VLP's, 및 바람직하게 면역자극 물질, 바람직하게 면역자극 핵산 및 더욱더 바람직하게 DNA 올리고뉴클레오타이드 또는 다르게는 폴리 (I: C)이 VLP's에 결합하므로써 패키징된 VLP's를 유도하는 VLP's는 단지 변형된 VLP's와 항원들의 혼합을 통해 항원들에 대한 B 및 T 세포 반응을 증진시킬 수 있다는 놀라운 발견에 기초한다. 놀랍게도, 공유 결합 또는 항원과 VLP의 커플링은 필요하지 않다. 또한, VLPs 및 항원들 모두에 대한 T 세포 반응은 특히 Th1 형을 가르킨다. 추가로 패키징된 핵산 및 CpGs는 각각 분해로부터 보호받고, 즉, 이들은 더욱 안정적이다. 또한, 면역계로부터의 세포의 비특이적 활성화는 현저히 감소한다.

선천성 면역계는 미생물 병원체에 의해 공유되는 불변의 분자 패턴을 인식하는 능력을 갖는다. 최근 연구를 통해 상기 인식이 유효 면역 반응을 유도하는 중요한 단계라고 밝혀졌다. 미생물 산물이 면역 반응을 증가시키는 주요 기작은 APC, 특히 가지돌기 세포를 자극하여 전염증성 사이토카인을 생산하고 T 세포에 대한 고수분의 고자극성 분자를 발현시키는 것이다. 이 활성화된 가지돌기 세포는 연속하여 1차 T 세포 반응을 개시하고 T 세포-매개된 효과기 작용 유형을 지시한다.

2개 부류의 핵산, 즉, 1) 특이적으로 측면에 위치하는 염기내 면역자극 서열, 특히 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 세균성 DNA(CpG 모티프로 언급함) 및 2) 다양한 유형의 바이러스에 의해 합성되는 더블-스트랜드 RNA는 면역 반응을 증진시키는 미생물의 성분중 중요한 구성원을 나타낸다. 합성 더블 스트랜드 (ds) RNA 예로서, 폴리이노신-폴리시티딘산(폴리 I: C)은 가지돌기 세포를 유도하여 전염증성 사이토카인을 생산하고 고수준의 공자극성 분자를 발현시킬 수 있다.

Tokunaga and Yamamoto et al.의 일련의 연구를 통해 세균성 DNA 또는 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드는 인간 PBMC 및 마우스 비장 세포가 I형 인터페론(IFN)을 유도할 수 있도록 한다고 밝혀냈다(리뷰: Yamamoto et al., Springer SeminImmunopathol. 22: 11-19). 폴리 (I: C)는 본래 I형 IFN의 강력한 유도자로 합성되고 다른 사이토카인 예로서 IL-12을 유도한다.

바람직한 리보핵산은 폴리이노신-폴리시티딘산 더블-스트랜드 RNA (폴리 I: C)을 포함한다. 리보핵산 및 그의 변형체 및 그의 생산 방법은 Levy, H. B (Methods Enzymol. 1981, 78: 242-251), DeClercq, E (Methods Enzymol. 1981, 78: 227-236) and Torrence, P. F. (Methods Enzymol 1981; 78: 326-331)에 기술되어 있다(본 명세서에서 참고문헌이다). 추가로 바람직한 리보핵산은 이노신산 및 시티딘산(cytidylic acid)의 폴리뉴클레오타이드, 예로서 2개의 스트랜드가 더블 스트랜드 RNA를 형성하는 폴리(I:C)를 포함한다. 리보핵산은 생물로부터 분리될 수 있다. 리보핵산은 또한 추가로 포스포디에스테르 백본의 변형, 특히 포스포로티오에이트 변형에 의해 뉴클레아제가 내성이 되도록 하는 합성 리보핵산, 특히 합성 폴리 (I: C) 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 추가의 일면으로 폴리 (I: C)의 리보스 백본은 데옥시리보스로 대체된다. 본 분야의 기술자는 합성 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법을 알고 있다.

또다른 바람직한 일면으로 톨-양 수용체(TLR)를 활성화시키는 분자를 포함한다. 현재까지 10개의 인간 톨-양 수용체가 공지되어 있다. 이는 다양한 리간드에 의해 활성화된다. TLR2는 펩티도글리칸, 리포프로테인, 리포폴리사카라이드, 리포테이콘산(lipoteichoic acid) 및 Zymosan, 및 마크로파지-활성화 리포펩티드 MALP-2에 의해 활성화되고; TLR3은 더블-스트랜드 RNA, 예로서 폴리 (I: C)에 의해 활성화되고; TLR4는 리포폴리사카라이드, 리포테이콘산 및 탁솔 및 열-쇼크 단백질 예로서 열 쇼크 단백질 HSP-60 및 Gp96에 의해 활성화되고; TLR5는 세균성 플라젤라, 특히 플라젤린 단백질에 의해 활성화되고; TLR6는 펩티도글리칸에 의해 활성화되고, TLR7은 이미퀴모이드 및 이미다조퀴놀린 화합물, 예로서 R-848, 로속리빈 및 브로피리민에 의해 활성화되고 TLR9는 세균성 DNA, 특히 CpG-올리고뉴클레오타이드에 의해 활성화

된다. TLR1, TLR8 및 TLR10에 대한 리간드는 현재까지 알려져 있지 않다. 그러나, 최근 보고를 통해 동일한 수용체가 상이한 리간드와 반응하고 추가의 수용체가 존재한다고 보고되었다. 상기 열거된 리간드가 완전히 규명된 것은 아니며 추가의 리간드는 본 분야의 기술자에게 공지되어 있다.

바람직하게, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 서열:

$$5'X_1X_2CGX_3X_4\ 3'$$

(여기에서, X_1, X_2, X_3 및 X_4 는 모든 뉴클레오티드이다). 추가로, 올리고뉴클레오티드는 약 6개 내지 약 100, 000개의 뉴클레오티드, 바람직하게 약 6개 내지 약 2000개의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게 약 20개 내지 약 2000개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고 더욱더 바람직하게 약 20개 내지 약 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 추가로, 올리고뉴클레오티드는 100개 이상 내지 약 2000개의 뉴클레오티드, 바람직하게 100개 이상 내지 약 1000개의 뉴클레오티드, 더욱더 바람직하게 더욱 100개 이상 내지 약 500개의 뉴클레오티드를 포함한다.

바람직한 일면으로, CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 포스페이트 백본의 포스포티오에스테르 변형을 포함한다. 예를 들면, 하나 이상 포스페이트 백본 변형을 갖거나 모든 포스페이트 백본이 변형된 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드 및 하나, 일부 또는 모든 뉴클레오타이드 포스페이트 백본 변형이 포스포로티오에이트 변형인 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가 본 발명의 범주에 포함된다. 따라서, 바람직한 일면으로, 뉴클레오타이드 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 중 적어도 하나는 포스페이트 백본 변형을 갖는다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 면역자극 물질은

[illegible]

로부터 선택된 핵산 서열을 갖는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이다. 서열번호: 34 내지 서열번호: 49의 상기 언급한 서열에 나타난 소문자는 포스포로티오에이트 결합을 통해 결합된 데옥시뉴클레오타이드를 나타내고, 대문자는 포스포디에스테르 결합을 통해 결합된 데옥시뉴클레오타이드를 나타낸다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 면역자극 물질은 GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG ((서열번호: 41); 및 본 명세서에서 약어 g10gacga-PO 또는 G10-PO로서 사용됨)의 핵산 서열을 갖는 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이다.

CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 또한 재조합, 유전자, 합성, cDNA, 플라스미드-유도 및 싱글 또는 더블 스트랜드일 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위하여, 핵산을 본 분야의 공지된 다수의 방법을 사용하여 새로 합성할 수 있다. 예를 들면, b-시아노에틸 포스포아미다이트 방법 (Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H., Tet. Let. 22: 1859 (1981); Nucleoside H-phosphonate method (Garegg et al., Tet. Let. 27: 4051-4054 (1986); Froehler et al., Nucl. Acid. Res. 14: 5399-5407 (1986); Garegget al., Tet. Let. 27: 4055-4058 (1986), Gaffney et al., Tet. Let. 29: 2619-2622 (1988)). 다양한 시판용의 자동 올리고뉴클레오타이드 합성기에 의해 이들 화학 작용을 수행시킬 수 있다. 다르게는, 대상에게 투여된 후 올리고뉴클레오타이드로 분해되는 CpGs를 대량으로 플라스미드에서 생산할 수 있다(참조 Sambrook, T., et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989). 올리고뉴클레오타이드는 제한 효소, 엑소뉴클레아제 또는 엔도뉴클레아제를 사용하는 것과 같이 공지된 기술을 사용하여 현존 서열(예: 유전자 또는 cDNA)로부터 제조될 수 있다.

면역자극 물질, 면역자극 핵산 및 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 단, 동물에서 조성물이 면역 반응을 증진시키는 한 본 분야에 공지되어 있는 방법에 의해 VLP에 결합할 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드는 공유 또는 비공유 결합에 의해 결합할 수 있다. 추가로, VLP는 면역자극 물질, 면역자극 핵산 및 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드를 전체적으로 또는 부분적으로 둘러쌀 수 있다. 바람직하게, 면역자극 핵산 및 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 VLP 부위 예로서 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(자연 또는 비자연 발생), DNA 결합 부위 또는 RNA 결합 부위에 결합할 수 있다. 또다른 일면으로, VLP 부위는 아르기닌-풍부 리피드 또는 리신-풍부 리피드를 포함한다.

본 발명의 조성물의 특이적인 용도는 항원들에 대한 특정 면역 반응을 증진시키기 위하여 가지돌기 세포를 활성화하는 것이다. 가지돌기 세포는 생체의 또는 생체내 기술을 사용하여 증진될 수 있다. 생체의 방법을 자가 또는 이종 세포에 사용할 수 있고 바람직하게는 자가 세포상에서 사용한다. 바람직한 일면으로, 가지돌기 세포를 말초 혈액 또는 골수로부터 분리할 수 있지만 가지돌기 세포의 어느 근원으로부터 분리할 수 있다. 암 면역요법을 위한 가지돌기 세포의 생체의 조작법은 본 분야에서 수개의 참고문헌에 기술되어 있고, 이는 Engleman, 예; Cytotechnology 25: 1 (1997); Van Schooten, W., et al., Molecular Medicine Today, June, 255 (1997); Steinman, R. M., Experimental Hematology 24: 849 (1996); and Gluckman, J. C., cytokines, Cellul and Molecular Therapy 3: 187 (1997)를 포함한다.

생체내 방법을 사용하여 본 발명의 조성물을 가지돌기 세포와 접촉시킬 수 있다. 이를 수행하기 위하여, CpGs를 항원들과 혼합된 VLP와 배합하여 면역요법을 필요로 하는 대상에 직접 투여한다. 일례로 본 분야의 공지된 방법에 의해 종양의 국소 부위에, 예로서 종양에 직접 주사하여 VLPs/CpGs를 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명의 바람직한 일면은 (a) 바이러스-양 입자; (b) 적어도 하나의 면역자극 물질; 및 (c) 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는, 동물에서 면역 반응을 증진시키는 조성물을 제공하는 것이다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자와 결합하고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성되고, 면역자극 물질은 바이러스-양 입자와 결합하고, 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열(palindromic sequence)의 일부이고, 앞뒤역순상동 서열은 GACGATCGTC (서열번호: 1)이고, 앞뒤역순상동 서열은 2개 이상 및 11개 미만의 구아노신 엔티티, 더욱 바람직하게 8-10개의 구아노신 엔티티, 또는 가장 바람직하게 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 및 그의 3'-말단 측면에 위치한다).

본 발명자는 본 발명의 면역자극 물질, 즉, 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드(여기에서, 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 일부이고, 앞뒤역순상동 서열은 GACGATCGTC (서열번호: 1)이고, 앞뒤역순상동 서열은 2개 이상 및 11개 미만의 구아노신 엔티티, 더욱 바람직하게 8-10개의 구아노신 엔티티, 또는 가장 바람직하게 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 및 그의 3'-말단 측면에 위치한다)가 특히 시험관내에서 면역 세포를 자극하는데 효과적이라는 것을 발견하게 되었다.

본 발명의 바람직한 일면으로 앞뒤역순상동 서열은 GACGATCGTC (서열번호: 1)를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나 다르게는 구성되고, 여기에서, 앞뒤역순상동 서열은 적어도 3개 및 최대로 9개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열은 적어도 6개 및 최대로 9개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치한다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면에서, 면역자극 물질은 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 (a) GGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 2); 및 본 명세서에서 약어 G3-6로서 사용됨), (b) GGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 3); 및 본 명세서에서 약어 G4-6로서 사용됨), (c) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 4); 및 본 명세서에서 약어 G5-6로서 사용됨), (d) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 5); 및 본 명세서에서 약어 G6-6로서 사용됨), (e) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 6); 및 본 명세서에서 약어 G7-7로서 사용됨), (f) GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG ((서열번호: 7); 및 본 명세서에서 약어 G8-8로서 사용됨), (g) GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG ((서열번호: 8); 및 본 명세서에서 약어 G9-9로서 사용됨), (h) GGGGGGGGCGACGACGATCGTCGTCGGGGGGGG ((서열번호: 9); 및 본 명세서에서 약어 G6로서 사용됨) 및 (i) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG ((서열번호: 41); 및 본 명세서에서 약어 G10-PO로서 사용됨)으로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는다.

본 발명의 추가의 일면으로 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 GACGATCGTC (서열번호: 1)이고, 앞뒤역순상동 서열은 적어도 4개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열은 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치한다.

본 발명은 또다른 바람직한 일면으로, 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 (a) GGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 3); 및 본 명세서에서 약어 G4-6로서 사용됨), (b) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 4); 및 본 명세서에서 약어 G5-6로서 사용됨), (c) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 5); 및 본 명세서에서 약어 G6-6로서 사용됨), (d) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 6); 및 본 명세서에서 약어 G7-7로서 사용됨), (e) GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG ((서열번호: 7); 및 본 명세서에서 약어 G8-8로서 사용됨), (f) GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG ((서열번호: 8); 및 본 명세서에서 약어 G9-9로서 사용됨); 및 (g) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG ((서열번호: 41); 및 본 명세서에서 약어 G10-PO로서 사용됨)로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는다.

본 발명의 추가의 일면으로 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 GACGATCGTC (서열번호: 1)이고, 앞뒤역순상동 서열은 적어도 5개 및 최대로 8개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열은 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치한다.

앞뒤역순상동 서열이 더욱 적은 수의 구아노신 엔티티에 의해 측면에 위치하는 경우, VLP's로의 바람직한 본 발명의 면역자극 물질, 즉, 구아노신이 측면에 위치하는, 앞뒤역순상동 및 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드(여기에서, 앞뒤역순상동 서열은 GACGATCGTC (서열번호: 1)이고 앞뒤역순상동 서열은 11개 미만 또는 10개 미만의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 및 5'-말단 측면에 위치한다)의 패키징은 더욱 용이한 것으로 실험상 데이터를 통해 나타났다. 그러나, 앞뒤역순상동 서열 측면에 위치하는 구아노신 엔티티의 갯수를 감소시키는 것은 시험관내에서 혈액 세포의 자극을 감소시킨다. 따라서, 패키징(packagability)은 언급한 본 발명의 면역자극 물질의 생물학적 활성을 감소시킨다. 따라서, 본 발명의 바람직한 일면은 패키징 및 생물학적 활성 사이의 절충안을 제시한다.

본 발명의 또다른 바람직한 일면으로 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 (a) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 4); 및 본 명세서에서 약어 G5-6로서 사용됨), (b) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG ((서열번호: 5); 및 본 명세서에서 약어 G6-6로서 사용됨), (c)

GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG((서열번호: 6); 및 본 명세서에서 약어 G7-7로서 사용됨), (d) GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG ((서열번호: 7); 및 본 명세서에서 약어 G8-8로서 사용됨); 및 (e) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG ((서열번호: 41); 및 본 명세서에서 약어 G10-PO로서 사용됨)로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는다.

본 발명의 바람직한 일면으로 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 7, 또는 서열번호: 41의 핵산 서열을 갖고, 즉, 면역자극 물질은 G8-8, 또는 G10-PO이다.

본 발명의 바람직한 일면으로 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고, 여기에서, 여기에서 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 부분이고, 여기에서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 41의 핵산 서열을 갖고, 즉, 면역자극 물질은 G10-PO이다. 따라서, 바람직한 일면으로, 본 발명은 (a) 바이러스-양 입자; (b) 적어도 하나의 면역자극 물질; 및 (c) 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는, 동물에서 면역 반응을 증진시키는 조성물을 제공하는 것이다(여기에서, 항원은 바이러스-양 입자와 결합하고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성되고, 면역자극 물질은 바이러스-양 입자와 결합하고, 면역자극 물질은 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드이고 비메틸화된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드의 CpG 모티프는 앞뒤역순상동 서열의 일부이고, 앞뒤역순상동 서열은 GACGATCGTC (서열번호: 1)이고, 앞뒤역순상동 서열은 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 및 그의 3'-말단 측면에 위치한다).

상기 언급한 바와 같이, VLP내로 패키징할 때 사용되는 최적의 서열은 패키징 및 생물학적 활성 사이의 절충안이다. 이를 고려하면, G8-8 면역자극 물질이 바람직하고, G10-PO 면역자극 물질이 본 발명의 매우 바람직한 일면인 바, 이는 생물학적으로 고도로 활성적이면서 적절하게 잘 패키징되기 때문이다.

본 발명의 조성물은 추가로 바이러스-양 입자와 결합되어 있는 본 발명의 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함한다.

본 발명의 추가의 일면으로 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체는 바이러스-양 입자에 융합되어 있다. 상기 언급한 바와 같이 VLP는 통상 VLPs내로 어셈블리되는 적어도 하나의 서브유닛으로 구성된다. 따라서, 다시 본 발명의 추가의 일면으로 MelanA 펩티드 유사체는 VLP내로 도입될 수 있는 단백질 또는 바이러스-양 입자의 적어도 하나의 서브유닛과 융합되어 키메라성 VLP-서브유닛-항원 융합을 형성한다.

MelanA 펩티드 유사체의 융합은 VLP내로 도입될 수 있는 단백질 또는 VLP-서브유닛의 N- 말단 또는 C-말단과 융합, VLP 서브유닛 서열내로의 삽입에 의해 수행될 수 있다. 이하 VLP 서브유닛과 펩티드의 융합 단백질을 언급할 때 서브유닛 서열 말단과의 융합 또는 서브유닛 서열내 펩티드의 내부 삽입을 포함한다.

융합은 MelanA 펩티드 유사체 서열을 서브유닛 서열의 일부가 결실된(추가로 절단 뮤턴트로 언급함) VLP 서브유닛 변이체내로 삽입시켜 수행될 수 있다. 절단 뮤턴트는 N- 또는 C-말단, 또는 VLP 서브유닛의 서열 일부의 내부 결실을 가질 수 있다. 예를 들면, 아미노산 잔기 79번 내지 81번이 결실된 특이 VLP HBcAg는 내부 결실을 포함하는 절단 뮤턴트이다. 항원 또는 항원 결정기와 절단 뮤턴트 VLP-서브유닛의 N- 또는 C- 말단과의 융합도 본 발명의 일례이다. 또한, VLP 서브유닛 서열내로의 에피토프 융합은 또한 치환에 의해 수행될 수 있고, 여기에서, 예를 들면, 특이 VLP HBcAg의 경우, 아미노산 79-81번은 외부 에피토프로 대체된다. 따라서, 이하, 융합은 VLP 서브유닛의 서열내 MelanA 펩티드 유사체 서열 삽입, MelanA 펩티드 유사체에 대한 VLP 서브유닛 서열 일부의 치환, 또는 결실, 치환 또는 삽입 배합에 의해 수행될 수 있다.

키메라성 MelanA 펩티드 유사체-VLP 서브유닛은 일반적으로 VLP내로 자가-어셈블리할 수 있을 것이다. 그의 서브유닛과 융합된 에피토프를 나타내는 VLP는키메라성 VLPs로서 언급된다. 언급한 바와 같이, 바이러스-양 입자는 적어도 하나의 VLP 서브유닛을 포함하거나 다르게는 그로 구성된다. 본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스-양 입자는 키메라성 VLP 서브유닛 및 비-키메라성 VLP 서브유닛, 즉, 그에 융합된 항원을 갖지 않는 VLP 서브유닛의 혼합물을 포함하거나 그로 구성됨으로써 소위 모자이크 입자를 형성하게 된다. VLP의 형성 및 VLP 어셈블리를 확인하는 것이 이로울 것이다. 일례로 키메라성 VLP-서브유닛의 비율은 1,2, 5,10, 20,30, 40,50, 60,70, 80,90, 95% 이상일 수 있다.

VLP의 서브유니트의 서열 끝과 융합시키거나, VLP의 서브유니트의 서열내로 상기 펩티드 서열을 내부 삽입시키기 위해 측면에 위치하는 아미노산 잔기를 펩티드 또는 에피토프의 끝에 가할 수 있다. 글리신 및 세린 잔기는 측면에 위치하는 서열 융합을 위해 펩티드에 첨가되어 사용되는 특히 바람직한 아미노산이다. 글리신 잔기는 추가의 가용성을 제공하여 VLP 서브유니트의 서열내로 외부 서열이 융합될 때 잠재적인 불안정화 효과를 감소시킬 수 있다.

본 발명의 특정 일면으로 VLP는 B형 간염 코어 항원 VLP이다. HBcAg의 N-말단과의 융합 단백질(Neyrinck, S. et al., Nature Med. 5: 1157-1163 (1999)) 또는 소위 주 면역우세 부위(immunodominant)내 삽입은 (Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44: 98-114 (2001)), WO 01/98333에 기술되어 있고 본 발명의 바람직한 일면으로 MIR중 결실을 포함하는 자연발생된 HBcAg의 변이체 또한 기술되어 있고(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44: 98-114 (2001), 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로 인용된다), N- 또는 C-말단과의 융합, wt HBcAg과 비교하여 결실 부위에 상응하는 MIR 부위로의 삽입 또한 본 발명의 추가의 일면이다. C-말단과의 융합 또한 기술되어 있다(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44: 98-114 (2001)). 본 분야의 기술자는 고전적인 분자 생물학 기술(Sambrook, J. et al., eds., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), Ho et al., Gene 77: 51 (1989))을 사용하여 융합 단백질 작제방법에 대한 가이드를 용이하게 발견할 수 있을 것이다. HBcAg 및 HBcAg 융합 단백질을 코딩하는 HBcAg 및 HBcAg 융합 단백질 발현에 유용한 벡터 및 플라스미드 또한 기술되어 있고(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001), Neyrinck, S. et al., Nature Med. 5: 1157-1163 (1999)) 본 발명에 실시예에 사용할 수 있다. 자가-어셈블리의 효율 최적화 및 HBcAg의 MIR에 삽입되는 에피토프의 디스플레이를 위한 중요한 인자는 삽입시, 또는 아미노산 형태 HBcAg가 새로운 에피토프로 치환될 때의 삽입 부위, MIR내 HBcAg 서열로부터 결실시키고자 하는 아미노산의 갯수로부터 선택된다(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001)). 예를 들면, HBcAg 76-80, 79-81, 79-80, 75-85 또는 80-81을 외부 에피토프로 치환하는 것도 기술되어 있다(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001), EP 420 635;US 6,231,864). HBcAg는 캡시드 어셈블리를 처리하고 핵산과 결합할 수 있는 (Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001) 장래의 아르기닌 테일을 포함한다(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001)). 아르기닌 테일을 포함하거나, 포함하지 않는 HBcAg도 본 발명에 포함된다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 VLP는 RNA 파지의 VLP이다. RNA 파지의 주요 코트 단백질은 박테리아, 특히 E.Coli에서 발현될 때 VLP내로 자발적으로 어셈블리된다. 본 발명의 조성물 제조에 사용될 수 있는 박테리오파지 코트 단백질의 특정 일례로 박테리오파지 Q β (서열번호: 10; PIR 데이터베이스, 수탁번호 VCBPQR, Q β CP로 언급됨 및 서열번호: 11; 수탁번호 AAA16663, Q β A1 단백질로 언급됨) 박테리오파지 R17(PIR 수탁번호 VCBPR7), 박테리오파지 fr(서열번호: 13; PIR 수탁번호 VCBPFR)와 같은 RNA 박테리오파지의 코트 단백질을 포함한다.

또다른 바람직한 일면으로 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체는 Q β 코트 단백질에 융합된다. 에피토프가 Q β 의 A1 단백질의 절단형의 C-말단으로 융합되거나, A1 단백질내로 삽입된 융합 단백질이 기술되어 있다(Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996). UGA 종결 코돈을 억제시켜 A1 단백질을 생성하고, N-말단의 메티오닌의 절단을 고려할 때 그의 길이는 329aa, 또는 328aa이다. 통상 E.Coli에서 알라닌(Q β CP 유전자에 의해 코딩된 두번째 아미노산) 앞의 N-말단의 메티오닌의 절단되고, 이는 주로 Q β 코트 단백질의 N-말단의 경우이다. UGA 암버 코돈의 3'인 A1 유전자의 일부는 CP 확장을 코딩하고, 길이는 195개의 아미노산이다. CP 확장의 위치 72번과 73번 사이에 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체 삽입도 본 발명의 추가의 일면이다(Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996). C-말단적으로 절단된 Q β A1 단백질의 C-말단에 MelanA 펩티드 유사체의 융합도 본 발명의 바람직한 일면이다, 예를 들면, (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996))에는 19번 위치에서 절단된 Q β CP 확장의 C-말단에 융합된 Q β A1 단백질 융합이 기술되어 있다.

(Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996))에 기술된 바와 같이, 융합된 에피토프를 나타내는 입자의 어셈블리는 모자이크 입자의 형성을 위해 A1 단백질-MelanA 펩티드 유사체의 융합 및 wt CP 둘 모두의 존재를 필요로 할 수 있다. 그러나, 바이러스-양 입자를 포함하는, 이로써 특히 RNA 파지 Q β 코트 단백질의 VLP를 포함하는 일례는 그에 융합된 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체를 갖는 VLP 서브유니트로 구성되고, 이 또한 본 발명의 범주내 포함된다.

모자이크 입자의 제조는 다양한 방식으로 수행될 수 있다. (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996))에는 본 발명의 실시예에 사용되는 모든 3가지 방법이 기술되어 있다. 첫번째 방법으로 VLP상의 융합된 에피토프의 유효한 디스플레이는

UGA 코돈을 Trp로 해독시키는 클로닝된 UGA 억제자 tRAN를 코딩하는 플라스미드(pISM3001 플라스미드(Smiley B.K. et al., Gene 134:33-40(1993)))를 수반하는(harboring) E.Coli 균주에서 CP 및 CP 확장 사이의 UGA 종결 코돈을 갖는

Q β A1 단백질 융합을 갖는 플라스미드의 발현에 의해 매개된다. 다른 방법은 CP 유전자 종결 코돈을 UAA로 변형시키고, A1 단백질-항원 융합을 발현시키는 두번째 플라스미드를 공형질전환시킨다. 두번째 플라스미드는 상이한 항생제 내성을 코딩하고 복제 기점은 첫번째 플라스미드와 일치한다(Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996)). 세번째 방법에서 CP 및 A1 단백질-항원 융합은 바이시스트론 양식으로 Trp 프로모터와 같은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 코딩되고, 이는 (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996))의 도 1에 기술되어 있다.

추가로 일면으로, MelanA 펩티드 유사체는 fr Cp의 아미노산 2번 및 3번(절단된 CP의 번호화, 이는 N-말단 메티오닌이 절단된 부위이다) 사이에 삽입되어 MelanA 펩티드 유사체 fr Cp 융합 단백질을 형성한다. VLP내로 자가-어셈블리하는 fr CP 융합 단백질의 작제 및 발현을 위한, 본 발명에 유용한 벡터 및 발현 시스템이 [Pushki P. et al., Prot. Eng. 6:883-891(1993)]에 기술되어 있다. 특정 일면으로 MelanA 펩티드 유사체는 fr CP의 잔기 3번 및 4번이 결실된 2번 아미노산 뒤의 fr CP의 결실 변이체내로 삽입된다.

RNA 파지 MS-2의 코트 단백질의 N-말단의 돌출된 β -헤어핀에서의 에피토프 융합 후 RNA 파지 MS-2의 자가-어셈블리된 VLP상의 융합된 에피토프의 제시(WO 92/13081) 또한 기술되어 있고 MS-2 RNA 파지의 코트 단백질내로의 삽입 또는 치환에 의한 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체의 융합 또한 본 발명의 범주내 포함된다.

본 발명의 다른 일면으로 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 유두종 바이러스의 캡시드 단백질과 융합한다. 더욱 특정한 일면으로, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 소 유두종바이러스 1형(BPV-1)의 주요 캡시드 단백질 L1과 융합한다. 바쿨로바이러스/곤충 세포 시스템에서 BPV-1 융합 단백질의 작제 및 발현을 위한 벡터 및 발현 시스템이 기술되어 있다 (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2373-2378 (1999), WO 00/23955). 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체로 BPV-1 L1의 아미노산 130-136을 치환시킴으로써 본 발명의 바람직한 일면인 BPV-1L1-MelanA-펩티드-유사체 융합 단백질을 수득한다. 바쿨로바이러스 벡터에서의 클로닝 및 바쿨로바이러스 감염된 Sf9 세포에서의 발현 또한 기술되어 있고 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다(Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2373-2378 (1999), WO 00/23955). 본 발명의 융합된 MelanA 펩티드 유사체를 나타내는 어셈블리 입자의 정제는 다양한 방식으로, 예로서, 겔 여과 또는 수크로스 구배 한외여과(Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2373-2378 (1999), WO 00/23955)를 통해 수행될 수 있다.

본 발명의 추가의 일면으로, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 Ty VLP 내로 도입될 수 있는 Ty 단백질로 융합된다. 더욱 특이 일면으로, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 Ty VLP내로 혼입될 수 있는 Ty 단백질과 융합된다. 더욱 특정한 일면으로 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 TYA 유전자에 의해 코딩되는 캡시드 단백질 또는 p1에 융합된다(Roth, J. F., Yeast 16: 785-795 (2000)). 효모 레트로트랜스포존 Ty1, 2, 3 및 4는 사카로미세스 세레비시아로부터 분리하고 레트로트랜스포존 Tf1은 스킨조사카로미세스 폼바에로부터 분리하였다(Boeke, J. D. and Sandmeyer, S. B., "Yeast Transposable elements, "in The molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, p. 193, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991)). 레트로트랜스포존 Ty1 및 2는 식물 및 동물 원의 코피아(copia) 부류와 관련되고 Ty3은 식물 및 동물 레트로바이러스와 관련된 레트로트랜스포존의 gypsy 패밀리에 속한다. Ty1 레트로트랜스포존에서 Gag 또는 캡시드 단백질로도 언급되는 p1 단백질의 길이는 440개의 아미노산이다. VLP 성숙화되는 동안 P1은 408번 위치에서 절단되어 VLP의 필수 성분인 p2 단백질을 형성한다.

p1과의 융합 단백질 및 효모에서 상기 융합 단백질의 발현을 위한 벡터가 기술되어 있다(Adams, S. E., et al., Nature 329: 68-70 (1987)). 예를 들면, MelanA 펩티드 유사체를 코딩하는 서열을 pMA5620 플라스미드의 BamH1 사이트내로 삽입시켜 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체를 p1로 융합시킬 수 있다. 외부 에피토프를 코딩하는 서열을 pMA5620 벡터로 클로닝하여 외부 에피토프의 N-말단에 C-말단이 융합된 Ty1-15의 p1의 아미노산 1-381을 포함하는 융합 단백질을 발현시킨다. 또한, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체의 N-말단 융합, 또는 p1 서열내로의 내부 삽입, 또는 p1 서열 일부 치환 또한 본 발명의 범주내 포함하는 것을 의미한다. 특히, Ty 단백질 p1 (EP0677111)의 아미노산 30-31, 67-68, 113-114 및 132-133 사이의 Ty 서열내로 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체를 삽입하는 것도 본 발명의 바람직한 일면이다.

추가로, 본 발명의 MelanA 또는 MelanA 펩티드 유사체의 융합에 적절한 VLPs는 예를 들면, 레트로바이러스-양-입자 (W09630523), HIV2 Gag (Kang, Y. C., et al, Biol. Chem. 380: 353-364 (1999)), Cowpea Mosaic 바이러스 (Taylor, K. M. et al., Biol. Chem. 380: 387-392 (1999)), 파르보바이러스 VP2 VLP (Rueda, P. et al., Virology 263: 89-99 (1999)), HBsAg (US 4,722, 840, EP0201416B1)이다.

본 발명의 실시예에 적절한 키메라성 VLPs의 예는 Intervirology 39: 1 (1996)에 기술되어 있다. 본 발명에 사용하기 위해 주시되고 있는 VLPs의 예로서, HPV-1, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45, CRPV, COPV, HIV GAG, Tobacco Mosaic 바이러스를 포함한다. SV-40, 폴리오마바이러스, 아데노바이러스, 단순헤르페스 바이러스, 로타 바이러스 및 노르워크 바이러스의 바이러스-양 입자를 포함하고, 상기 VLPs의 키메라성 VLPs 또한 본 발명에 포함된다.

언급한 바와 같이, 바이러스-양 입자 형성 모노머의 서열내로 삽입시켜 바이러스-양 입자로 융합된 항원을 포함하는 일면도 본 발명의 범주내 포함된다. 몇몇 경우에서 항원은 결실을 포함하는 바이러스-양 입자 형성 모노머 형태로 삽입될 수 있다. 이 경우, 바이러스-양 입자 형성 모노머는 삽입된 항원의 부재하에서는 바이러스-양 구조를 형성할 수 없다.

몇몇 경우에서 재조합 DNA 기술을 이용하여 이중 단백질을 VLP 단백질로 융합시킬 수 있다(Kratz, P. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1915 (1999)). 예를 들면, 본 발명은 융합 단백질을 또는 컨주게이트를 제조하기 위하여 본 발명의 항원(또는 그의 일부, 바람직하게 적어도 10, 20 또는 50개의 아미노산)에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 컨주게이트된(공유 및 비공유 컨주게이션 모두 포함) VLPs를 포함한다. 융합은 반드시 직접적인 필요는 없지만 링커 서열을 통해 발생할 수 있다. 더욱 일반적으로, 바이러스-양 입자에 융합, 컨주게이트 또는 다르게는 결합된 에피토프를 본 발명에 따른 항원으로서 사용하는 경우, 통상적으로 스페이서 또는 링커 서열을 에피토프 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 첨가한다. 바람직하게 링커 서열은 엔도솜 또는 세포의 다른 소포 구획의 프로테아제인 프로테아솜에 의해 인식되는 서열을 포함한다.

커플링하는 한 가지 방법은 펩티드 결합에 의한 것이며, 여기에서, 컨주게이트는 인접 폴리펩티드, 즉, 융합 단백질일 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질에서 상이한 펩티드 또는 폴리펩티드는 프레임에서 서로 연결되어 인접 폴리펩티드를 형성하게 된다. 따라서, 융합 단백질의 첫번째 부위는 항원 또는 이뮤노젠이고, 첫번째 부위에 N-말단 또는 C-말단 융합된 융합 단백질의 두번째 부위는 VLP를 포함한다. 다르게는, 항원의 양쪽 말단에 임의로 연결 서열을 포함하는, VLP내로의 내부 삽입도 본 발명에 따라 사용할 수 있다.

HBcAg를 VLP로서 사용할 때, 항원을 HBcAg 입자의 C-말단에 연결시키는 것이 바람직하다. 림프구막락수막염 바이러스(LCMV) 당단백질로부터 유래된 MHC 부류 I 제한된 펩티드 p33의 C-말단 융합을 나타내는 B형 간염 코어 항원(HBcAg)이 항원(HBcAg-p33)일 수 있고, 항원(HBcAg-p33)로서 사용할 수 있다. 길이가 185개의 아미노산인 야생형 HBc 단백질은 20면체의 기하학적 배열로 가정되는 180개의 서브유닛으로 구성된 고도로 조직화된 입자내로 어셈블리된다. 조직화된 캡시드를 형성하는 능력을 유지하면서 상이한 위치에 외부 서열을 상대적으로 다수 삽입시킬 때의 HBcAg 및 다른 VLPs의 가용성도 문헌에 기술되어 있다. 이로써 HBc VLPs를 비복제성 백신의 디자인을 위한 관심의 대상이 되는 후보물질이 되었다.

가용성이 있는 링커 서열(예; 폴리글리신/폴리세린-함유 서열 예로서, [Gly4 Ser]2 (Huston et al., Meth. Enzymol. 203: 46-88 (1991)))를 항원 및 리간드 사이의 융합 단백질내로 삽입시킬 수 있다. 또한, 융합 단백질은 예를 들면, 표지화 또는 정제 목적으로 융합 단백질을 항체(예: 모노클로날 항체)에 결합시킬 수 있는 "에피토프 태그"를 포함하도록 작제될 수 있다. 에피토프 태그의 예로서 모노클로날 항체 YL1/2에 의해 인식되는 Glu-Glu-Phe 트리펩티드를 포함한다.

본 발명은 VLP를 코딩하는 서열 및 MelanA 펩티드 유사체를 코딩하는 서열을 포함하는 키메라성 DNA에 관한 것이다. DNA는 예를 들면 바콜로바이러스로 형질전환된 곤충 세포, 효모 또는 박테리아에서 발현될 수 있다. 발현 시스템과 관련하여 제한 없이 일상적인 용도로 광범위하게 선별될 수 있다. 바람직하게, 다량의 단백질을 발현시킬 수 있는 시스템이 사용된다. 일반적으로 박테리아 발현 시스템은 그의 효율면에 있어서 바람직하다. 본 발명의 범위에서 사용하기 적절한 박테리아 발현 시스템의 일례는 [Clarke et al., J. Gen. Virol. 71: 1109-1117 (1990); Borisova et al., J. Virol. 67: 3696-3701 (1993) and Studier et al., Methods, Enzymol. 185-60-89(1990)]에 기술되어 있다. 적절한 효소 발현 시스템의 일례는 [Emr, Methods Enzymol. 185-231-3(1990)]에 기술되어 있고, 앞서 캡시드 단백질 제조에 사용된 바콜로바이러스 시스템 또한 적절하다. 구성적 또는 유도성 발현 시스템을 사용할 수 있다. 이용가능한 발현 시스템의 선택 및 가능한 변형에 의해 단백질이 수득한 형태를 조절할 수 있다.

본 발명의 특정 일면으로 증진된 면역 반응이 바람직한 항원은 B형 간염 캡시드(코어) 단백질(HBcAg)과 프레임에서 커플링, 융합 또는 다르게는 결합한다. 그러나, 본 분야의 모든 기술자들은 다른 바이러스-양 입자가 본 발명의 융합 단백질 작제물에 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체는 적어도 하나의 공유 결합에 의해 바이러스-양 입자에 결합한다. 바람직하게 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체는 각각 정돈되고 반복적 어레이 및 MelanA 펩티

드 유사체-VLP 컨주게이트를 형성하는 비-펩티드 결합인 적어도 하나의 공유 결합에 의해 바이러스-양 입자에 결합한다. 각각 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체가 지향적 방식으로 VLP와 결합하고 있기 때문에 MelanA 펩티드 유사체 어레이 및 컨주게이트는 통상적이고 바람직하게 반복적이고 정돈된 구조를 갖는다. 바람직하게, 120개 이상, 더욱 바람직하게 180개 이상, 더욱더 바람직하게 270개 이상, 더욱더 바람직하게 360개 이상의 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 VLP와 결합한다. 반복적이고 정돈된 MelanA 펩티드 유사체-VLP 어레이 및 컨주게이트의 형성은 각각 하기에 설명되는 바와 같이 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체와 VLP의 지향적이고(oriented) 방향성을 갖고(directed), 한정된 결합 및 부착에 의해 확보된다. 추가로, VLP의 전형적이고 고유하며 고도로 반복적이고 조직화된 구조는 고도로 정돈되고 반복적인 양식으로 MelanA 펩티드 유사체를 디스플레이하여 고도로 반복적이고 구조화된 MelanA 펩티드 유사체-VLP 어레이 및 컨주게이트를 생성시킨다.

따라서, 바람직한 본 발명의 컨주게이트 및 어레이는 각각 그의 고도로 조직화된 구조, 크기 및 어레이 표면상의 항원의 반복성에 있어 선행 기술과 상이하다. 본 발명의 바람직한 일면으로 발현 숙주에서 입자를 발현 시킴으로써 항원, 즉 본 발명의 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체와 추가로 커플링하는 VLP가 적절하게 폴딩하고 어셈블리되도록 한다.

본 발명은 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 VLP의 결합 또는 결합(association) 시키는 방법을 기술한다. 언급한 바와 같이 본 발명의 일면으로 본 발명의 적어도 하나의 MelanA 펩티드 유사체는 화학적 가교-결합에 의해 전형적이고 바람직하게 이작용기성 가교제를 사용하여 VLP에 결합한다. 수개의 헤테로-이작용기성 가교제는 본 분야에 공지되어 있다. 일례로, 헤테로-이작용기성 가교제는 바람직하게 제 1결합부, 즉, VLP 또는 적어도 하나의 VLP 서브유닛 각각의 리신 잔기의 측쇄 아미노 그룹과 반응할 수 있는 작용 그룹, 및 추가로, 제 2 결합부, 즉, 존재하거나, 환원 반응에 이용할 수 있도록 제조되거나, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체상에서 조작되고 임의로 환원 반응에 이용할 수 있도록 제조된 시스템 잔기와 반응할 수 있는 작용 그룹을 포함한다. 소위 유도화로 불리는 공정의 첫번째 단계는 코어 입자 또는 VLP와 가교제의 반응이다. 이 반응 산물은 활성화된 캐리어라 불리는 활성화된 코어 입자 또는 활성화된 VLPs이다. 두번째 단계에서 반응하지 않은 가교제는 겔 여과 또는 투석과 같은 일반적인 방법을 사용하여 제거된다. 세번째 단계에서, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 활성화된 캐리어와 반응하고, 이 단계는 전형적으로 커플링 단계로 명명된다. 반응하지 않은 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 임의로 네번째 단계에서 예를 들면 투석에 의해 제거될 수 있다. 수개의 헤테로-이작용기성 가교제가 본 분야에 공지되어 있다. 이는 가교제 SMPH(Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA 및 Pierce Chemical Company(Rockford, IL, USA)로부터 입수되고 아미노 그룹에 대하여 반응성인 하나의 작용 그룹 및 시스템 잔기에 대하여 반응성인 하나의 작용 그룹을 갖는, 이용가능한 다른 가교제를 포함한다. 상기 언급한 가교제 모두 티오에테르 결합을 형성한다. 본 발명의 실시예에 적절한 다른 부류의 가교제는 커플링시 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체 및 코어 입자 또는 VLP 사이에 디설파이드 결합을 도입하는 것을 특징으로 한다. 이 부류에 속하는 가교제는 예를 들면 SPDP 및 Sulfo-LC-SPDP(Pierce)를 포함한다. 가교제에 의한 코어 입자의 유도화 범위는 실험 조건, 예를 들면, 반응 파트너의 농도, 한 시약의 다른 것에 대한 초과량, pH, 온도 및 등장성을 달리하여 영향을 받을 수 있다. 커플링도, 즉 VLP 서브유닛당 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체의 양 각각은은 상기 기술한 실험 조건을 달리하여 백신의 필요조건에 일치하도록 조절할 수 있다.

본 발명의 MelanA 펩티드 유사체를 각각 VLP에 결합시키는 특히 바람직한 방법은 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체상의 시스템 잔기와 각각 VLP 표면상의 리신 잔기의 결합이다. 일례로, 제 2 결합부 또는 그의 일부로서 시스템 잔기를 포함하는 아미노산 링커와 본 발명의 MelanA 펩티드의 융합, 커플링, 부착 또는 결합이 필요할 수 있다. 아미노산 링커를 포함하는 작제물 또한 본 분야에 공지된 단순한 펩티드 합성법에 의해 수득도리 수 있다.

따라서, 추가의 바람직한 본 발명의 일면으로 항원 또는 항원 결정기를 아미노산 링커를 포함하고, 여기에서, 아미노산 링커는 제 2 결합부를 포함하거나, 다르게는 그로 구성된다.

일반적으로, 가요성 아미노산 링커가 바람직하다. 아미노산 링커의 바람직한 예는 (a) CGG; (b) N-말단 감마 1-링커; (c) N-말단 감마 3-링커; (d) Ig 힌지(hinge) 부위; (e) N-말단 글리신 링커; (f) $(G)_kC(G)_n$ ($n=0-12$ 및 $k=0-5$); (g) N-말단 글리신-세린 링커; (h) $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$ ($n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$)(서열번호: 62); (i) GGC; (k) GGC-NH₂; (l) C-말단 감마 1-링커; (m) C-말단 감마 3-링커; (n) C-말단 글리신 링커; (o) $(G)_nC(G)_k$ ($n=0-12$ 및 $k=0-5$); (p) C-말단 글리신-세린 링커; (q) $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$ ($n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$, 및 $o=0-8$)(서열번호: 63)으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

아미노산 링커의 바람직한 추가의 예는 모두 추가로 제 2 결합부로서 시스템 잔기 및 임의로 추가의 글리신 잔기를 포함하는 이류노글로블린의 힌지 부위, 글리신 세린 링커 $(GGGGS)_n$ (서열번호: 64), 및 글리신 링커 $(G)_n$ 이다. 아미노산 링커

의 전형적으로 바람직한 예는 N-말단 감마 1: CGDKTHTSPP(서열번호: 65); C-말단 감마 1(서열번호: 66): DKTHTSPPCG; N-말단 감마 3: CGGPKSTPPGSSGGAP(서열번호: 67); C-말단 감마 3: PKPSTPPGSSGGAPGGCG(서열번호: 68); N-말단 글리신 링커: GCGGGG(서열번호: 69); C-말단 글리신 링커: GGGGCG(서열번호: 70); C-말단 글리신-리신 링커: GGKKGC(서열번호: 71); N-말단 글리신-리신 링커: CGKKGG(서열번호: 72)이다.

소수성인 항원 또는 항원 결정기가 VLP와 결합할 때 본 발명의 실시예 특히 적절한 다른 아미노산 링커는 N-말단 링커의 경우 CGKKGG (서열번호: 73), 또는 CGDEGG (서열번호: 74), 또는 C-말단 링커의 경우 GGKKGC (서열번호: 75) 및 GGEDGC (서열번호: 76)이다. C-말단의 경우 말단 시스테인은 임의로 C-말단에서 아미드화(amidated)된다.

본 발명에 사용되는 추가의 링커는 항원 펩티드, 즉 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 VLP로부터 유리시킬 수 있는 아미노산 서열이다. 이 링커들의 예는 [Toes RE et al. J Exp Med. 2001 Jul 2;194 (1) : 1-12]에 기술되어 있다. 또한, 항원 펩티드, 즉 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 VLP로부터 유리시킬 수 있는 상기 언급된 바와 같은 아미노산 서열을 예측하기 위하여 프로테아좀 절단에 대한 PAPProC-a 예측 알고리즘을 사용할 수 있다(Nussbaum AK, et. al. Immunogenetics. 2001 Mar; 53 (2): 87-94).

본 발명의 바람직한 일면에서, 특히 펩티드의 C-말단의 GGCG(서열번호: 77), GGC 또는 GGC-NH₂ ("NH₂"는 아민화를 나타낸다) 링커 및 그의 N-말단의 CGG가 아미노산 링커로서 바람직하다. 일반적으로, 글리신 잔기는 거대한(bulky) 아미노산 및 시스테인 사이에 삽입되어 제 2결합부로 사용되어 커플링 반응에서 더욱 거대한 아미노산의 입체 방해의 가능성을 피할 수 있도록 한다. 본 발명의 가장 바람직한 일면에서 아미노산 링커 GGC-NH₂는 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체 C-말단으로 융합된다.

본 발명의 MelanA 펩티드 유사체에 첨가되는 시스테인 잔기는 활성화된 VLP상의 헤테로이작용기성 가교제와 반응하기 위하여 환원상태로 존재하여야 하는, 즉 유리 시스테인 잔기이거나, 유리 설프하이드릴 그룹을 포함하는 시스테인 잔기가 이용가능하여야 한다. 결합부로서 작용하는 시스테인 잔기가 산화된 형태인 경우 예를 들면, 디설파이드 브릿지를 형성한다면, 예로서, DTT, TCEP 또는 β-머캅토에탄올에 의한 디설파이드 브릿지의 환원이 요구된다. WO02/05690에 기술된 바와 같이 저농도의 환원제는 커플링에 적합하지만(compatible), 고농도는 커플링 반응을 저해하는 바, 기술자는 잘 알고 있는 바와 같이, 이 경우에는 예를 들면 투석, 겔 여과 또는 역상 HPLC에 의해 커플링에 앞서, 환원제를 제거하거나 그의 농도를 제거하여야 한다.

상기 기술한 바람직한 방법에 따른 헤테로이작용기성 가교제를 사용한 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 VLP의 결합은 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체가 VLP와 지향적(oriented) 방식으로 커플링할 수 있도록 한다. 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 VLP의 결합의 다른 방법은 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체가 카보디이미드 EDC, 및 NHS를 사용하여 VLP 각각에 결합하는 방법을 포함한다. 추가의 방법에서, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 글루타알데히드, DSG, BM[PEO]₄, BS³, (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA)과 같은 호모-이작용성 가교제 또는 각각의 VLP의 아민 그룹 또는 카복실 그룹에 대하여 반응성인 작용 그룹을 갖는 다른 공지된 호모-이작용성 가교제를 사용하여 각각의 VLP에 결합한다.

VLP와 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체를 결합시키는 다른 방법은 VLP가 바이오틴화되고 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체가 스트렙타비딘-융합 단백질로서 발현되는 방법, 또는 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체 및 VLP 모두 WO 00/23955에 기술된 바와 같이 바이오틴화된 방법을 포함한다. 이 경우, 유리 결합부가 다음 단계에서 첨가되는 VLP의 결합에 이용될 수 있도록 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체 대 스트렙타비딘의 비를 조절하여 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체를 스트렙타비딘 또는 아비딘에 결합시킬 수 있다. 다르게는, 모든 성분을 "원 팻(one pot)"에 혼합할 수 있다. 가용성 형태의 수용체 및 리간드가 이용될 수 있고 VLP, 또는 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체에 가교결합할 수 있는 다른 리간드-수용체 쌍을 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체를 각각의 VLP에 결합시키기 위한 결합제로서 사용할 수 있다. 다르게는, 리간드 또는 수용체는 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체에 융합되어 수용체, 또는 리간드 각각에 화학적으로 결합하거나 융합된 VLP와의 결합을 매개할 수 있다. 융합은 삽입 또는 치환에 의해 작용할 수 있다.

앞서 언급한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 일면에서, VLP는 RNA 파지의 VLP이고, 더욱 바람직한 일면에서 VLP는 RNA 파지 Qβ 코트 단백질의 VLP이다.

하나 또는 수개의 항원 분자, 즉, 하나 또는 수개의 항원 또는 항원 결정기는 바람직하게, 입체적으로 허용되는 경우 RNA 파지의 VLP의 노출된 리신 잔기를 통해 RNA 파지 코트 단백질의 VLP 또는 캡시드의 하나의 서브유닛에 결합할 수 있다. RNA 파지의 코트 단백질의 VLP 및 특히 Q β 코트 단백질 VLP의 특이적인 성질은 서브유닛당 수개의 항원과 커플링할 수 있다는 것이다. 이로서 조밀한 항원 어레이를 형성할 수 있다.

본 발명의 바람직한 일면으로, 적어도 하나의 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 바이러스-양 입자의 결합 및 결합(attachment)은 각각 바이러스-양 입자의 적어도 하나의 제 1 결합부 및 항원 또는 항원 결정기의 적어도 하나의 제 2 결합부 사이의 작용 및 결합 각각에 의한다.

Q β 코트 단백질의 VLPs 또는 캡시드는 캡시드 내부로 향하고 RNA와 상호작용하는 3개의 리신 잔기, 및 캡시드 외부로 노출된 다른 4개의 리신 잔기를 갖는 제한된 토폴로지로서 그의 표면에 제한된 갯수의 리신 잔기를 디스플레이한다. 이러한 제한된 성질은 리신 잔기가 RNA와 상호작용하는 내부보다는 입자 외부가 항원과의 결합에 바람직하다. 다른 RNA 파지의 VLPs는 또한 그의 표면에 제한된 갯수의 리신 잔기를 갖고, 이들 잔기의 제한된 토폴로지를 갖는다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면에서, 제 1 결합부는 리신 잔기이고/거나 제 2 결합부는 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기를 포함한다. 본 발명의 매우 바람직한 일면에서, 제 1 결합부는 리신 잔기이고 제 2 결합부는 시스테인 잔기이다.

본 발명의 매우 바람직한 일면에서, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 시스테인 잔기를 통해 RNA 파지 코트 단백질의 VLP, 및 특히 Q β 코트 단백질의 VLP의 리신 잔기에 결합한다.

RNA 파지로부터 유래된 VLPs의 또다른 잇점은 적절한 비용으로 대량의 물질을 생산케하는 박테리아에서의 고발현율이다.

언급한 바와 같이, 본 발명의 컨쥬게이트 및 어레이는 각각 고도로 정돈된 구조, 크기, 및 어레이 표면상의 항원 반복성에 있어서 선행 컨쥬게이트와 상이하다. 또한, 캐리어로서 VLP를 사용함으로써 항원 밀도가 다양한 강력한 항원 어레이 및 컨쥬게이트 각각을 형성할 수 있다. 특히, RNA 파지의 VLP의 사용, 및 특히 RNA 파지 Q β 코트 단백질의 VLP의 사용으로 고밀도의 에피토프를 수득할 수 있다. 특히, 펩티드를 Q β 코트 단백질의 VLP(예: WO2004/016282에 기술한 바와 같은 인간 A β 1-6 펩티드)와 커플링시켜 밀도가 서브유닛당 1.5개 이상의 에피토프가 되도록 하였다. 고밀도의 에피토프를 포함하는 RNA 파지 코트 단백질의 VLPs 조성물의 제조는 본 출원의 교시를 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일면으로, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체가 Q β 코트 단백질과 커플링할 때 서브유닛당 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체의 평균 갯수는 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 개 이상이 바람직하다.

본 명세서에 정의된 바 제 2 결합하는 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적 또는 비자연발생적으로 존재할 수 있다. 항원 또는 항원 결정기상에 적절한 자연발생된 제 2 결합부가 존재하지 않는 경우, 비자연발생된 제 2 결합부가 항원에 설계된다.

상기 기술한 바와 같이, 4개의 리신 잔기는 Q β 코트 단백질의 VLP 표면에 노출되어 있다. 전형적으로 이들 잔기는 가교제 분자와의 반응시 유도체화된다. 일례로 모든 노출된 리신 잔기가 항원과 커플링할 수 없는 경우, 가교제와 반응한 리신 잔기는 유도체화 단계후 ϵ -아미노 그룹에 결합된 가교제 분자와 함께 남아있다. 이는 하나 또는 수개의 양전하를 소멸시키고, 이는 VLP의 가용성 및 안정성에 유해할 수 있다. 하기 기술하는 Q β 코트 단백질 뮤텐트에서와 같이 일부의 리신 잔기를 아르기닌으로 대체하여 아르기닌 잔기는 가교제와 반응하지 않기 때문에 양전하가 소멸되는 것을 막았다. 또한, 리신 잔기를 아르기닌으로 대체하여 항체 반응에 대하여 보다 소수의 부위가 이용가능하기 때문에 더욱 한정된 항원 어레이를 제공할 수 있다.

따라서, 본 출원에서 기술하는 하기 Q β 코트 단백질 뮤텐트 및 뮤텐트 Q β VLPs에서 노출된 리신 잔기를 아르기닌으로 대체하였다: Q β -240 (Lys13-Arg; 서열번호: 20), Q β -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; 서열번호: 22) 및 Q β -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; 서열번호: 24). 작제물을 클로닝하고 단백질을 발현시키고 VLPs를 정제하고 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 커플링시키기 위하여 사용하였다. Q β -251; (서열번호: 23) 또한 작제하고 Q β -251 코트 단백질의 VLP를 발현시키고, 정제하고 커플링하는 방법에 대한 가이드는 본 출원을 통해 알 수 있다.

추가 일면으로, 본 발명자는 더욱 고밀도의 항원 어레이 수득에 적절한 추가로 하나의 리신 잔기를 포함하는 Q β 뮤텐트 코트 단백질을 기술한다. 이 뮤텐트 Q β 코트 단백질, Q β -243 (Asn 10-Lys; 서열번호: 21)를 클로닝하고, 단백질을 발현

시키고 캡시드 또는 VLP를 분리하고 정제하여 추가의 리신 잔기 도입이 캡시드 또는 VLP와 서브유니트의 자기-어셈블리에 적합하다는 것을 나타내었다. 따라서, MelanA 펩티드 유사체 어레이 및 컨주게이트 각각을 QB 코트 단백질 뮤턴트의 VLP를 사용하여 제조할 수 있다. 특히 항원과 VLPs, 특히 RNA 파지 코트 단백질의 VLP를 결합시키는 바람직한 방법은 항원, 즉 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체상에 자연발생적으로 존재하거나 조작된 시스테인 잔기와 RNA 파지 코트 단백질의 VLP 표면상에 존재하는 리신 잔기에 결합이다. 시스테인 잔기에 대하여 제 2결합부로서 유효하게 하기 위하여, 설프하이드릴 그룹을 커플링에 이용할 수 있어야 한다. 따라서, 시스테인 잔기는 환원 상태로, 즉, 유리 시스테인 또는 유리 설프하이드릴 그룹과의 시스테인 잔기가 이용가능하여야 한다. 제 2 결합부로서 작용하는 시스테인 잔기가 산화된 형태인 경우, 예를 들면, 디설파이드 브릿지를 형성한다면, 예로서, DTT, TCEP 또는 β -머캅토에탄올을 사용하여 디설파이드 브릿지의 환원이 필요하다. 환원제 농도, 및 항원에 대한 환원제의 과량의 물수는 각 항원에 대하여 조절하여야 한다. 10 μ M 이하의 저농도로부터 시작하여 10 내지 20 mM 이상의 환원제의 적정 범위를 필요하다면 시험하고, 항원과 캐리어의 커플링을 분석하였다. WO 02/056905에 기술된 바와 같이 저농도의 환원제가 커플링 반응에 적절하지만, 본 분야의 기술자는 알고 있는 바, 이러한 경우 환원제를 투석 또는 겔 여과에 의해 제거하여야 한다. 이롭게는, 투석 또는 평형 완충액의 pH는 7 미만, 바람직하게 6이다. 낮은 pH 완충액과 항원 활성 또는 안정성과의 적합성은 시험되어야 한다.

RNA 파지 코트 단백질의 VLP상의 에피토프 밀도는 가교제 및 다른 반응 조건의 선택에 따라 조절될 수 있다. 예를 들면, 가교제 Sulfo-GMBS 및 SMPH를 통해 전형적으로 고밀도의 에피토프를 얻을 수 있다. 유도체화는 고농도의 환원제에 의해 바람직하게 영향을 받고, 환원 조건의 조작을 통해 RNA 파지 코트 단백질의 VLP, 및 특히 QB 코트 단백질의 VLP에 커플링하는 항원의 수를 조절할 수 있다.

비자연발생적인 제 2결합부를 디자인하기 앞서, 융합, 삽입, 또는 유전적으로 조작되어야 하는 위치를 선택하여야 한다. 제 2 결합부 위치의 선정은 예를 들면, 항원의 결정 구조에 기초할 수 있다. 항원의 결정 구조가 분자의 C- 또는 N-말단의 이용가능성(예를 들면, 용매에 대한 접근가능성으로부터 측정됨), 또는 시스테인 잔기와 같이 제 2 결합부로서 사용하기 적절한 잔기의 용매에 대한 노출에 대한 정보를 제공할 수 있다. 주로 Fab 단편의 경우에서 노출된 디설파이드 브릿지는 또한 일반적으로 예를 들면, 2-머캅토에틸아민, TCEP, β -머캅토에탄올 또는 DTT에 의한 경미한 환원을 통해 단일 시스테인 잔기로 전환될 수 있기 때문에 제 2 결합부의 근원이 될 수 있다. 항원의 면역원성에는 작용하지 않는 경미한 환원 조건이 선정될 것이다. 일반적으로, 자기-항원을 사용하는 면역화를 통해 자기-항원과 그의 자연발생된 리간드의 상호작용을 저해하고자 하는 경우, 제 2 결합부를 가하여 자연발생된 리간드와의 상호작용 부위에 대한 항체를 형성한다. 따라서, 제 2 결합부의 위치는 제 2 결합부 또는 동일한 것을 포함하는 어느 아미노산 링커로부터 입체 방해로 피할 수 있도록 선택되어야 한다. 추가의 일면으로, 자기-항원과 그의 자연발생된 리간드의 상호작용 부위와 상이한 부위에 지정된 항체 반응이 바람직하다. 이 일례에서, 제 2 결합부는 자기-항원과 그의 자연발생된 리간드의 상호작용에 대한 항체 생산을 막도록 선정될 수 있다.

제 2 결합부 위치 선정에서 중요한 기준은 항원의 올리고머화 상태, 올리고머화 위치, 공인자의 존재, 및 항원의 변형이 자기 항원의 작용, 또는 자기-항원을 인식하는 항체의 생성에 적합한 항원 구조 및 서열내 위치를 기술하는 실험상의 증거 이용가능성을 포함한다.

가장 바람직한 일면에서, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 코어 입자 및 VLPs 또는 VLP 서브유니트상의 제 1 결합부와 결합할 수 있는 첨가된 단일 제 2 결합부 또는 단일 반응 결합부를 포함한다. 이는 적어도 하나의, 전형적으로는 하나 이상, 바람직하게 10, 20, 40, 80, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 400, 450개 이상의 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체와 각각의 코어 입자 및 VLP의 한정되고 균일한 결합 및 결합(association) 각각을 확실히 한다. 항원상에 단일 제 2 결합부 또는 단일 반응 결합부를 제공하여 단일의 균일한 형태의 결합 및 결합(association) 각각을 확실히 하여 매우 고도로 정돈되고 반복적 어레이를 수득하게 된다. 예를 들면, 리신- (제 1 결합부) 및 시스테인- (제 2 결합부) 상호작용에 의해 결합 및 결합(association) 각각이 수행된 경우, 본 발명의 바람직한 일면에 따라 항원상에 존재하는 시스테인 잔기가 자연 발생 또는 비자연발생인 것과 상관없이 항원 하나당 단지 하나의 시스테인 잔기가 VLP 및 코어 입자의 제 1 결합부 각각을 결합 및 결합(association)시킬 수 있다는 것이 확인된다.

몇몇 일례로, 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체상의 제 2 결합부의 조작이 본 발명의 개시에 따른 제 2 결합부로서 적절한 아미노산을 포함하는 아미노산 링커의 융합을 요구한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 일면으로, 아미노산 링커는 적어도 하나의 공유 결합을 통해 항원 또는 항원 결정기에 결합한다. 바람직하게, 아미노산 링커는 제 2 결합부를 포함하거나, 다르게는 구성된다. 추가의 바람직한 일면에서 아미노산 링커는 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기이다. 또다른 바람직한 일면으로, 아미노산 링커는 시스테인이다. 아미노산 링커 선정의 기준 및 본 발명에 따른 추가의 바람직한 아미노산 링커 일례는 이미 상기 언급한 바 있다.

본 발명의 또다른 특정 일면으로, 결합 부위는 프레임에서 HBcAg과 융합되는 리신 또는 시스테인이 되도록 선택한다. 바람직한 일면으로, 항원은 3개의 류신 링커를 통해 HBcAg의 C-말단과 융합된다.

항원 또는 항원 결정기가 리신 잔기를 통해 VLP에 결합할 때 하나 이상의 자연발생된 잔여 리신 잔기, 및 HBcAg 변이체에 존재하는 다른 리신 잔기를 치환하거나 결실시키는 것이 이로울 수 있다.

다수의 경우에서 자연발생된 잔여 리신 잔기가 제거될 때 또다른 리신은 항원 또는 항원 결정기에 대한 결합 부위로서 HBcAg내로 도입될 것이다. 상기 리신 잔기를 삽입하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다. 존재하는 리신 잔기를 제거하지 않고 리신 잔기를 첨가할 수 있다.

HBcAg의 C 말단은 이 단백질의 핵 위치선정을 지정하는 것으로 나타났다(Eckhardt et al. , J. Virol. 65 : 575 582 (1991)). 또한, 단백질의 상기 부위는 HBcAg가 핵산과 결합할 수 있는 능력을 제공하는 것으로 여겨지고 있다.

상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 실시예 적절한 HBcAgs는 또한 N-말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 N-말단으로부터 제거된 변형된 HBcAgs를 포함한다. 그러나, 바이러스-양 입자를 포함하는 서브유닛 서열내 내부 결실을 포함하는 바이러스-양 입자의 변이체는 바이러스-양 입자의 정돈 또는 미립자 구조에 적합하다면 본 발명에 적합할 수 있다. 예로서, HBcAgs 서열내 내부 결실이 적절할 수 있다 (Preikschat, P. , et al. , J. Gen. Virol. 80: 1777-1788 (1999)).

추가로 본 발명의 실시예 적절한 HBcAgs는 N- 및 C 말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 N-말단으로부터 제거되고, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 또는 48번 아미노산이 C-말단으로부터 제거된 HBcAgs를 포함한다.

본 발명의 백신 조성물은 상이한 HBcAgs의 혼합물을 포함할 수 있다. 따라서, 백신 조성물은 아미노산 서열이 상이한 HBcAgs로 구성될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된(예: 결실, 삽입 또는 치환) 변형된 HBcAg 및 "야생형" HBcAg를 포함하여 백신 조성물을 제조할 수 있다. 그러나, 대부분 출원에서 유일하게 HBcAg 타입만이 사용될 것이다.

바람직한 일면으로, 바이러스-양 입자는 적어도 하나의 제 1 결합부를 포함하고, 항원 또는 항원 결정기는 적어도 하나의 제 2 결합부를 포함한다. 바람직하게, 제 1 결합부는 아미노 그룹 또는 리신 잔기를 포함하거나, 바람직하게 그로 구성된다. 제 2 결합부는 바람직하게 (a) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연발생적으로 발생된 결합 부위; 및 (b) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적으로 발생된 결합 부위로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 더욱더 바람직하게, 제 2 결합부는 설프하이드릴 또는 시스테인 잔기를 포함하거나, 바람직하게 그로 구성된다. 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기와 바이러스-양 입자의 결합은 제 1 결합부와 제 2 결합부 사이의 결합을 통해 수행되고, 여기에서, 바람직하게 결합은 적어도 하나의 비-펩티드 결합이며, 바람직하게 항원 또는 항원 결정기 및 바이러스-양 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다. 일면으로, 제 1 결합부는 리신 잔기이고 제 2 결합부는 시스테인 잔기이다. 또일면으로, 제 1 결합부는 아미노 그룹이고 제 2 결합부는 설프하이드릴이다.

본 발명의 특정 일면으로 항원, 특히 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체는 하나 이상의 세포 독성 T 세포 에피토프, Th 세포 에피토프, 또는 상기 두개의 에피토프의 배합물을 포함한다. 따라서, 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 1개, 2개 이상의 세포 독성 T 세포 에피토프를 포함한다. 또다른 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 1개, 2개 이상의 Th 세포 에피토프를 포함한다. 또다른 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 1개, 2개 이상의 세포 독성 T 세포 에피토프 및 1개, 2개 이상의 Th 세포 에피토프를 포함한다.

자연발생된 MelanA/Mart-1 에피토프, 및 예를 들면, MelanA/Mart-1 26-35 에피토프는 낮은 친화력으로 오직 인간 HLA-2와 결합한다. 따라서, 백신화시킬 때 각각의 자연발생된 MelanA 에피토프 및 펩티드의 생체내 제시(presentation)이 제한 요소일 수 있다. 이들 조건하에서 MelanA 펩티드는 교차-제시(cross-presentation)에 의해 HLA 분자를 로딩하기 때문에 각각 VLPs에 결합, 커플링 또는 융합된 Melan A 에피토프 및 펩티드를 백신화시키기 위하여 사용할 경우 특히 중요하다. 그러나 교차-제시 방법은 통상의 항원 제시 경로만큼 효율적이지 않고, HLA에 대한 MelanA 펩티드의 친화성이 더욱 중요하다. 따라서, VLP-기초 백신화를 위해 상대적으로 높은 친화력으로 HLA과 결합하는 MelanA 펩티드 유사체를 사용하는 것이 바람직하다. 유사하게, 높은 친화력으로 숙주의 자연발생된 T 세포 레퍼토리에 의해 인식되는 MelanA 펩티드 유사체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 일반적으로 MelanA 에피토프 및 펩티드 유사체는 각각 MHC 분자에 효율적으로 결합할 수 있도록 적절한 위치에 부착(anchor) 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

따라서, 본 발명의 추가의 일면 및 본 발명의 매우 바람직한 일면은 (a) 바이러스-양 입자; 및 (b) 면역자극 물질을 포함하는 동물에서 면역 반응을 증진시키기 위한 조성물을 조성물을 제공하는 것이다(여기에서, 면역자극 물질은 바이러스-양 입자와 결합하고 있고, 추가로 본 조성물은 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하고, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자와 결합하고 있고, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기는 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성되고, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체는 바이러스-양 입자와 결합하고 있다).

본 발명의 바람직한 일면으로, Melan A 펩티드 유사체는 MHC 분자에 효율적으로 결합할 수 있다. 따라서, MelanA 펩티드 유사체를 사용하여 부착 잔기를 도입함으로써 MHC 분자의 결합을 개선시킬 수 있다. 각각의 자연발생되고 정상적인 MelanA 펩티드가 상기 부착 잔기를 포함하지 않거나, 각각의 자연발생되고 정상적인 부착 잔기를 대체하는 새로 도입되는 부착 잔기(들)보다 열등한 상기 부착 잔기만을 포함하지 않는 경우 부착 잔기를 도입함으로써 MHC 분자의 결합을 개선시키는 것이 특히 이롭다.

정상 인간 MelanA 펩티드를 MelanA 펩티드 유사체가 되게 하는 변형, 및 바람직하게 부착 잔기의 도입은 (i) 유도된 돌연변이 (예: 화학적 유도, 방사선조사 또는 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 다른 방법) 및 이후 MHC와의 결합을 개선시키는 변형된 펩티드의 선별, 또는 (ii) 단백질 발현의 DNA, 전사, RNA 또는 해독 수준으로 발생하는 돌연변이로 제한하는 것은 아니지만, 단백질 합성 수준으로 발생하는 자연발생된 돌연변이로부터 발생하는 MHC와의 결합을 개선시키는 변형된 펩티드의 선별 또는 (iii) 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 통상의 펩티드 합성을 사용하여 계획적 또는 랜덤한 아미노산 교환, 결실, 치환 또는 삽입에 의해 수행된다. 전형적이고 바람직하게 Rammensee et al. [Immunogenetics 50: 213-219 (1999)]에 기술된 바와 같이 SYFPEITHI 데이터베이스를 사용하여 부착 잔기를 동정하였다. SYFPEITHI 데이터베이스를 통해 선택된 펩티드에 대한 HLA 결합율을 계산할 수 있고, 이 프로그램을 사용하여 HLA 결합율과 관련하여 펩티드들 최적화할 수 있다. 다르게는, 제한하는 것은 아니지만 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 것으로서, 뮤턴트 세포주에서 세포 전체의 T 세포 활성화 또는 인식 또는 MHC 상향조절 에세이, MHC-테트라- 펩티드 결합 에세이, 표히된 펩티드를 포함하는 경쟁 결합 에세이, 표면 플라스몬 공명 에세이를 포함하는 MHC-펩티드 결합 에세이에 의해 바람직한 펩티드 유사체를 동정할 수 있다.

본 발명의 추가의 일면으로, MelanA 펩티드 유사체는 상응하는 정상의 MelanA 펩티드와 관련되는 2개, 더욱 바람직하게 단일 아미노산 치환을 특징으로 한다.

본 발명의 또다른 바람직한 일면으로, MelanA 펩티드 유사체는 프로테아제 또는 펩티다아제 매개 분해로부터 보호된다. 프로테아제 또는 펩티다아제 매개 분해로부터 보호되는 MelanA 펩티드 유사체를 사용하여 펩티드를 대상에 적용시킨 후 펩티드의 생체내 안정성을 증가시킬 수 있고/거나 프로테아제 또는 펩티다아제의 존재하에 저장하는 동안 펩티드의 안정성을 증가시킬 수 있다. 안정성이 증가된 결과 MHC상의 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체는 더욱 효과적인 장기간 전달되고, 특히 T 세포 반응의 자극은 증진된다.

바람직하게, 인간 MelanA 펩티드 유사체는 Blanchet et al [J. Immunol. 167: 5852-5861 (2001)(참고문헌으로서 인용됨)]에 예시된 바와 같은 자연발생되지 않은 아미노산 유도체에 의해 자연발생된 인간 MelanA 펩티드의 선택된 아미노산 잔기를 치환시킴으로써 보호된다. 이로써, 각각의 자연발생되고 정상적인 MelanA 펩티드와 비교하여 각각의 화학적으로 변형된 MelanA 펩티드 및 MelanA 펩티드 유사체는 T 세포와 동일한 인식될 수 없다는 사실에 의해 통상 부과된 제한을 극복할 수 있다.

또다른 바람직한 일면으로, 항원은 (a) LAGIGILTV (서열번호:84); (b) MAGIGILTV (서열번호: 85), (c) EAMGIGILTV (서열번호: 86), (d) ELAGIGILTV (서열번호: 50), (e) EMAGIGILTV (서열번호: 87), (f) YAAGIGILTV (서열번호: 88), (g) FAAGIGILTV (서열번호: 89), (h) GHGHSYTAE ELAGIGILTV (서열번호:51), (i) SYTTAEELAGIGILTVILGVL (서열번호: 52), 및 (j) ELAGIGILTVILGVL (서열번호: 53)으로 구성된 그룹으로부터 제한없이 선택되는 아미노산 서열을 갖는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 매우 바람직한 일면으로, 항원은 (a) LAGIGILTV (서열번호:84); (b) MAGIGILTV (서열번호: 85), (c) EAMGIGILTV (서열번호: 86), (d) ELAGIGILTV (서열번호: 50), (e) EMAGIGILTV (서열번호: 87), (f) YAAGIGILTV (서열번호: 88), 및 (g) FAAGIGILTV (서열번호: 89)으로 구성된 그룹으로부터 제한없이 선택되는 아미노산 서열을 갖는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 이들 펩티드 유사체 및 그의 합성법은 Valmori et al. [J. Immunol. 160: 1750-1758 (1998)]에 기술되어 있다. 이들 펩티드 유사체는 자연발생된 악성흑색종 펩티드에 대하여 발생된 5개의 상이한 세포 독성 T 세포 클론에 의해 상대적으로 증가된 인식 및 표적 세포 분해를 나타낸다.

본 발명의 매우 바람직한 일면으로 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체는 서열 ELAGIGILTV(서열번호:50)을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 실시예를 통해 언급하는 바와 같은 매우 바람직한 일면은 HLA-A2 트랜스제닉 마우스에서 작용성 MelanA-특히 CD8+ T 세포의 증식을 유도하고 HLA-결합 및 TCR-인식 사이의 우수한 타협을 나타낸다(cf. Valmori et al., J. Immunol. 160:1750-1758(1998)).

추가로 본 발명의 매우 바람직한 일면으로, 제 2 결합부를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체는 (a) CGHGHHSYTTAEELAGIGILTV(서열번호: 54); 16-35로서 약칭함); (b) CGHGHHSYTTAEELAGIGILTV(서열번호: 55); MelanA 16-35 A/L로서 약칭함); (c) CGGEAAAGIGIKTV(서열번호: 56); MelanA 26-35로서 약칭함); (d) CGGELAGIGILTV(서열번호: 57); MelanA 26-35 A/L로서 약칭함); (e) CSYTTAEELAGIGILTVILGTL(서열번호: 58); MelanA 20-40 A/L로서 약칭함); (f) CGGELAGIGILTVILGVL(서열번호: 59); MelanA 26-40 A/L로서 약칭함); (g) ELAGIGILTVGGC(서열번호: 60); MelanA 26-35-C A/L로서 약칭함); (h) CSPKSLELAGIGILTV(서열번호: 92); CSPKSL-MelanA 16-35 A/L로서 약칭함); 및 (i) ELAGIGILTVILGVLGGC(서열번호: 93); MelanA 66-40-C A/L로서 약칭함)으로 구성된 그룹으로부터 제한없이 선택되는 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명의 매우 바람직한 일면으로 제 2 결합 부위를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체는 (a) CGHGHHSYTTAEELAGIGILTV(서열번호: 55); MelanA 16-35 A/L로서 약칭함); (b) CGGELAGIGILTV(서열번호: 57); MelanA 26-35 A/L로서 약칭함); (c) CSYTTAEELAGIGILTVILGTL(서열번호: 58); MelanA 20-40 A/L로서 약칭함); (d) CGGELAGIGILTVILGVL(서열번호: 59); MelanA 26-40 A/L로서 약칭함); (e) ELAGIGILTVGGC(서열번호: 60); MelanA 26-35-C A/L로서 약칭함)으로 구성된 그룹으로부터 제한없이 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

본 발명의 또다른 매우 바람직한 일면으로 제 2 결합 부위를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체는 CGHGHHSYTTAEELAGIGILTV (서열번호: 55) (MelanA 16-35 A/L)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시예 21에 기술하는 바와 같이, 본 발명의 매우 바람직한 일면을 포함하는 본 백신 조성물, 즉 Q β MelanA 16-35 A/L 백신은 가지세포에 의해 프로세싱된다.

본 발명의 또다른 일면으로, 바이러스-양 입자와 커플링, 융합 또는 다르게는 결합하된 본 발명의 MelanA 펩티드 유사체는 T 세포 에피토프, 세포 독성 또는 Th 세포 에피토프이다. 추가의 일면으로, 항원은 적어도 2개의 유사하거나 상이한, 바람직하게 상이한 에피토프의 배합물로서, 적어도 2개의 에피토프는 링크 서열에 의해 또는 직접적으로 결합된다. 이 에피토프는 악성흑색종에 대하여 기술된 세포 독성 및 Th 세포 에피토프로 구성된 그룹으로부터 바람직하게 선택된다 (gp100, 티로시나제, MAGE-패밀리 또는 NY-ESO-1).

따라서, 추가로 본 발명의 바람직한 일면으로 항원은 세포 독성 T 세포 에피토프, Th 세포 에피토프 또는 적어도 2개의 에피토프의 배합물을 포함하거나, 다르게는 포함하고, 적어도 2개의 에피토프는 링크 서열에 의해 또는 직접적으로 결합되고, 바람직하게 세포 독성 T 세포 에피토프는 바이러스 또는 종양 세포 독성 T 세포 에피토프이다.

바람직한 세포 독성 T 세포 에피토프는 MelanA 에피토프: (16-36 A/L) (25-36 A/L); 티로시나제 에피토프: (1-9) 및 (368-376) (Panelli, M. C. et. al. , J. Immunol. , 2000,164, 495-504); Gp100 에피토프: (154-162), (209-217 (T210M)), (280-288) 및 (280-288 (A288V)) 및 (457-466) (Nielsen, M. B. et. al. , 2000. J Immunol. , 164 (4). , 2287-96 and Linette, G. P. et. al. J Immunol, 2000,164, 3402-3412 and Skipper, J. C. , Int. J. Cancer, 1999,82, 669-677 and Pass, H. A., et. al. , Cancer J Sci Am. , 1998,4, 316-323); TRP2 에피토프: (180-188) (288-296) (455-463) (Sun, Y. et. al. , Int. J Cancer 2000,87 (3), 399- 404 and Parkhurst, M. R. et. al. , Cancer Res. , 1998,58, 4895-8901 and Harada, M. , et. al., Cancer Res. , 2001,61, 1089-1094)); NY-ESO-1 에피토프: 157-165 (Chen, J. L. , et. al. , J. Immunol, 2000,165, 948-955); 및 MAGE-A 에피토프: (248V9) (Graff-Dubois, S. , et. al., 2002, J. Immunol, 169,575-580)이다.

세포 독성 T 세포 에피토프의 바람직한 배합물은 배합물 MelanA (25-36 A/L); 티로시나제 에피토프(368-376) Gp100 에피토프(T210M) 및 (457-466), 및 NY-ESO-1(157-165)이다.

바람직한 Th 세포 에피토프는 Mage-3 에피토프: (281-295), (141-155), and (146- 160) (Kobayashi, H. , et. al., Cancer Res. , 2001,61, 4773-4778); 티로시나제 에피토프: (188-208), (193-203) (Kobayashi H. , et. al. , Immunogenetics, 1998,47, 398-403); GP100 에피토프: (44-59); 및 NY-ESO-1 에피토프: (115-132), (121-138), (139-156), (119-143), 및 (134-148) (Zarour, H. M. , et. al., cancer Res. , 2002,62, 213-218)이다.

세포 독성 및 Th 세포 에피토프의 바람직한 배합물은 MelanA 에피토프(1-118 A/L) (서열번호: 94); NY-ESO-1 에피토프 115-165; 또는 MelanA (25-36 A7L), gp100 (209-217 (T210M), Mage-3 (146-160), 및 gp100 (44-59)의 배합물이다.

모자이크 바이러스-양 입자 예로서, 각각 상이한 항원 및 에피토프와 결합하고 있는 서브유닛으로 구성된 바이러스-양 입자도 본 발명에 포함된다. 본 발명의 조성물을 예를 들면, 각각 상이한 항원 및 에피토프에 융합된 바이러스-양 입자를 포함하는 서브유닛을 코딩하는 두개의 적합한 플라스미드로 E.coli를 형질전환시켜 수득할 수 있다. 이 경우, 모자이크 바이러스-양 입자는 세포내로 직접 어셈블리되거나 세포 분해후 어셈블리된다. 또한, 본 발명의 조성물은 또한 각각 상이한 항원 및 에피토프의 혼합물을 분리된 바이러스-양 입자를 결합시켜 수득할 수 있다.

본 발명의 MelanA 펩티드 유사체, 및 특히 언급한 에피토프 또는 에피토프들은 재조합 DNA 기술을 사용하여 합성되거나 재조합적으로 발현되고 바이러스-양 입자와 커플링하거나 바이러스-양 입에 융합될 수 있다. 항원을 바이러스-양 입자에 결합시키는 것을 설명하는 일례의 방법은 WO 00/32227, WO01/85208 및 WO 02/056905에 기술되어 있고, 이는 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로서 인용된다.

본 발명은 또한 VLP와 올리고뉴클레오티드를 인큐베이션시키고, RNase를 가하고 조성물을 정제하는 것을 포함하는, VLP 및 VLP에 결합된 비메틸화 CpG- 포함 올리고뉴클레오티드를 포함하는 동물에서 면역 반응을 증진시키기 위한 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 바람직하게, 추가로 본 방법은 항원 또는 항원 결정기를 바이러스-양 입자와 결합시키는 단계를 포함하고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자를 면역자극 물질과 함께 인큐베이션시키기 전에 바이러스-양 입자에 결합시킨다. 또다른 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 조성물을 정제한 후 바이러스-양 입자에 결합시킨다. 동등하게 바람직한 일면으로, 상기 방법은 VLP와 RNase를 인큐베이션시키고, 올리고뉴클레오티드를 가하고 조성물을 정제하는 것을 포함한다. 바람직하게, 추가로 본 방법은 항원 또는 항원 결정기를 바이러스-양 입자와 결합시키는 단계를 포함하고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자를 RNase와 함께 인큐베이션시키기 전에 바이러스-양 입자에 결합시킨다. 또다른 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 조성물을 정제한 후 바이러스-양 입자에 결합시킨다. 일례로, VLP는 세균성 발현 시스템에서 생산된다. 또다른 일면으로, the RNase는 RNase A이다.

본 발명은 또한 VLP를 디선헤블리하고 면역자극 물질 및 올리고뉴클레오티드를 각각 가하고, VLP를 리선헤블리하는 것을 포함하는 동물에서 면역 반응을 증진시키기 위한 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 방법은 추가로 디선헤블리된 VLP의 핵산을 제거하고/거나 리선헤블리 후 조성물을 정제하는 것을 포함할 수 있다. 바람직하게, 본 방법은 추가로 항원 또는 항원 결정기를 바이러스-양 입자와 결합시키는 단계를 포함하고, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자를 디선헤블리하기 전에 바이러스-양 입자에 결합시킨다. 또다른 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자를 리선헤블리하고, 바람직하게 조성물을 정제한 후 바이러스-양 입자에 결합시킨다.

본 발명은 또한 질환 또는 증상을 예방하고/거나 악화시키는데 유용할 수 있는 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 면역학적 유효량의 본 발명의 면역 증진 조성물을 포함하거나, 다르게는 그로 구성된다. 백신은 임의로 애주번트를 포함할 수 있다.

따라서, 바람직한 일면으로, (a) 바이러스-양 입자; (b) 적어도 하나의 면역자극 물질; 및 (c) 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 면역학적 유효량의 본 발명의 면역 증진 조성물을 포함하는 백신을 제공한다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자와 결합하고, 면역자극 물질은 바이러스-양 입자와 결합하고 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성된다). 바람직하게, 백신은 추가로 애주번트를 포함한다.

본 발명은 추가로 동물에서 질환 또는 증상을 예방하고/거나 악화시키는 백신화 방법을 제공한다. 일면으로, 본 발명은 다양한 범위의 동물 중 특히 포유동물 중, 예를 들면 인간, 원숭이, 소, 개, 고양이, 말, 돼지 등에서 감염성 질환을 예방하기 위한 백신을 제공한다. 백신은 모든 종류의 암, 바람직하게 악성흑색종을 치료하기 위하여 고안될 수 있다.

단백질 또는 바이러스를 사용하는 동종 초회감작-추가접종 백신화 방법은 대부분 성공적이지 못하다고 알려져 있다. 기존의 항체는 항원과 재만남시 메모리 반응의 유도를 방해하는 것으로 알려져 있다. 놀랍게도 RNA-과지 유래 VLPs, 특히

Q β 로부터 유래된 VLP는 동종 초회감작-추가접종 백신화 체계에서 메모리 CD8+ T 세포 반응을 유도함에 있어 매우 효율적이다. 대조적으로 실시예 26에 기술하는 바와 같이, 생(live) 백신이나 바이러스 면역화는 1차 CD8+ T 세포 반응 유도에 매우 비효율적이고 백신이나에 의한 동종 추가 접종도 메모리 세포의 확장을 일으키지 못한다.

따라서, 추가의 일면으로, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명의 백신을 투여하여 동물에서 T 세포 반응을 초회감작(priming)시키는 것을 포함하는, 동물을 면역화시키거나 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게, 추가로 본 방법은 동물에서 면역 반응을 증진(boosting)시키는 단계를 포함하여, 바람직하게 면역학적 유효량의 본 발명의 백신 또는 면역학적 유효량의 이중 백신을 투여하여 증진시키며, 더욱더 바람직하게 이중 백신은 DNA 백신, 펩티드 백신, 재조합 바이러스 또는 가지세포 백신이다.

또한, 또다른 일면으로 본 발명은 추가로 동물에서 T 세포 반응을 초회감작시키고, 동물에서 면역 반응을 증진시키는 단계를 포함하는 동물을 면역화시키거나 치료하는 방법을 제공하고, 면역학적 유효량의 본 발명의 백신을 투여하여 증진시킨다. 바람직하게, 초회감작은 면역학적 유효량의 본 발명의 백신 또는 면역학적 유효량의 이중 백신을 투여하여 수행하며, 더욱더 바람직하게 이중 백신은 DNA 백신, 펩티드 백신, 재조합 바이러스 또는 가지세포 백신이다.

또한, 또다른 일면으로 본 발명은 추가로 바이러스-양 입자, 적어도 하나의 면역자극 물질; 및 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 바이러스-양 입자와 결합하고, 면역자극 물질은 바이러스-양 입자와 결합하고, 항원은 세포 독성 T 세포 에피토프, Th 세포 에피토프 또는 적어도 2개의 상기 에피토프의 배합물을 포함하고, 적어도 2개의 에피토프는 직접 결합하거나 링크 서열에 의해 결합하고, 바람직하게 세포 독성 T 세포 에피토프는 바이러스 또는 종양 세포 독성 T 세포 에피토프이다.

추가 일면으로, 본 발명은 (a) a 바이러스-양 입자; (b) 면역자극 물질(여기에서, 면역자극 물질(b)는 바이러스-양 입자(a)와 결합);(c) 항원(여기에서, 항원은 바이러스-양 입자(a)와 혼합되어 있고 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 구성)을 포함하는 전형적이고 바람직하게 동물에서 면역 반응을 증진시키기 위한 조성물을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "혼합된"은 함께 첨가되지만 화학적으로는 서로 배합되지 않고 분리될 수 있는 2개 이상의 물질, 성분, 또는 요소의 배합물을 언급한다. 항원과 바이러스-양 입자를 혼합하는 방법은 WO 04/000351(전체적으로 참고문헌으로서 인용된다)에 기술되어 있다.

본 분야의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 조성물을 동물에 투여하는 경우, 이는 염, 완충액, 애주번트 또는 조성물의 효능을 개선시키는데 바람직할 수 있는 다른 물질을 포함하는 조성물일 수 있다. 약제학적 조성물 제조시 사용하기 적절한 물질의 예는 [REMITINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990))]를 포함하는 여러 출처에서 제공된다.

숙주 종에 따라 다양한 애주번트를 사용하여 면역학적 반응을 증가시킬 수 있고, 제한하는 것은 아니지만, 프로인트(완전 및 불완전), 무기 겔 예로서 수산화알루미늄, 계면활성제 예로서 리소렉시틴, 플루론 폴리올, 폴리음이온, 펩티드, 오일 유제, 키흐 림페테모시아닌, 디니트로페놀을 포함하고, BCG (바실 칼메트(*bacille Calmette*) 및 코리네박테리움 파르부름(*Corynebacterium parvum*)과 같은 인간 애주번트가 유용하다. 그러한 애주번트는 본 분야에 잘 공지되어 있다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 추가로 애주번트는, 제한하는 것은 아니지만 모노포스포릴 리피드 면역조절제, AdjuVax100a, QS-21, QS-18, CRL1005, 알루미늄 염 (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294, 및 비로솜(Virosomal) 애주번트 기술을 포함한다.

애주번트는 또한 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물의 투여에 의해 수혜자 각자가 내성을 띠는 경우 본 발명의 조성물은 "약제학적으로 허용가능"하다고 본다. 추가로, 본 발명의 조성물은 "치료학적 유효량"(즉, 바람직한 생리학적 효능을 유발하는 양)으로 투여될 것이다.

본 발명의 조성물은 본 분야에 공지된 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 선택된 특정 방식은 선택된 특정 조성물, 치료하고자 하는 증상의 경중도 및 치료 효능을 위해 필요한 투여량에 따라 달라질 것이다. 일반적으로 말하면 본 발명의 방법은 임상적으로 허용되지 않는 부작용없이 활성 화합물의 유효 수준을 나타내는 방식을 의미하는 의학적으로 허용가능한 투여 방식을 사용하여 실시될 수 있다. 투여 방식은 경구, 직장, 비경구, 인트라시스테말(intracisternal), 질내, 복강내, 국소(분말제, 연고제, 드립제 또는 경피용 패치에 의해), 구강(bucal), 또는 경구 또는 비강 분사를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바 "비경구"는 정맥내, 근육내, 복강내, 복장내(intrasternal), 피하 및 관절내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 언급한다. 본 발명의 조성물은 또한 림프절에 직접 주사될 수 있다.

투여를 위한 조성물의 성분은 멸균수(예: 생리학적 염수) 또는 불수용성 용액 및 현탁액을 포함한다. 불수용성 용매의 예로서 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물유 예로서 올리브 오일, 및 주사용 유기 에스테르 예로서 에틸 올레이트를 포함한다. 캐리어 또는 밀봉드레싱용 캐리어를 사용하여 피부 투과성을 증진시키고 항원 흡착을 증가시킬 수 있다.

배합물은 예를 들면, 혼합물로서 동시에, 동시(simultaneously) 또는 공동(concurrently)이지만 별개로; 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 이는 배합제가 치료제 혼합물로서 함께 투여되는 제시(presentation), 및 배합제가 예를 들면, 동일 개체 내로 별개의 정맥 라인을 통해 동시이지만 별개로 투여되는 방법도 포함한다. 추가로 "배합" 투여는 먼저 투여되는 화합물 또는 제제중 하나, 이어서 두번째 것을 별개로 투여하는 것을 포함한다.

투여 방식, 대상의 상태, 및 담체/애주버트 제제의 질에 따라 투여량은 달라진다. 전형적인 양은 대상 1명당 약 0.1 μ g 내지 약 20 mg 범위이다. 바람직한 양은 대상 1명당 적어도 약 1 μ g 내지 1mg, 더욱 바람직하게 대상 1명당 적어도 약 10 내지 약 400 μ g 이다. 대상을 면역화시키기 위해서는 다중 투여가 바람직하고, 프로토콜은 본 대상에게 적용되는 분 분야에서의 표준인 것이다.

조성물은 편의상 단위 제형으로 존재할 수 있고 약학 분야에 잘 공지되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 하나 이상의 부속 성분으로 구성된 담체와 함께 본 발명의 조성물을 제조하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 본 발명의 조성물을 액상 담체, 미세하게 분할된 고체 담체, 또는 둘 모두와 함께, 필요한 경우에는 산물을 성형화하며 균일하고 밀집하게 제조한다.

경구 투여에 적절한 조성물은 각각 예정된 양의 본 발명의 조성물을 포함하는 캡슐제, 정제 또는 로젠지와 같은 분리형 단위로서 제시될 수 있다. 다른 조성물은 수성 액상내 현탁액 또는 시럽, 액시르 또는 유제와 같은 불수용성 액상을 포함한다.

다른 투여 시스템은 시간-방출, 지연 방출 또는 지효성 방출 투여 시스템을 포함한다. 상기 시스템은 대상 및 의사의 편의를 도모하면서 상기 기술한 바와 같은 본 발명의 조성물의 반복적 투여를 피할 수 있다. 여러 형태의 방출 투여 시스템을 이용할 수 있고, 본 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

본 발명의 다른 일면은 본 발명의 조성물의 제조 방법 및 상기 조성물을 사용하여 암 및 알레르기를 의학적으로 치료하는 방법을 포함한다.

추가로 본 발명의 일면 및 이례는 하기 실시예 및 청구하는 청구범위에서 자명하게 될 것이다.

하기 실시예는 단지 설명을 위한 것이며 청구범위에서 정의된 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 관련 분야의 기술자는 본 명세서에 기술한 방법 및 적용에 대한 적절한 변형 및 조절에 대하여 용이하게 이해할 수 있고 본 발명의 또는 그의 어느 일례로부터 벗어나지 않도록 수행할 수 있다. 따라서, 청구 범위의 범위 및 그의 동등물내에 포함되는 한 본 발명은 본 발명의 수정 및 변형을 포함하고자 한다.

본 명세서에서 인용되는 모든 특허, 특허 출원 및 공개 문헌을 본 명세서에서 참고문헌으로서 인용된다.

실시예

실시예 1

p33-HBcAg VLPs 제조

LCMV로부터 펩티드 p33을 포함하는 HBcAg의 DNA 서열을 서열번호: 15에 기술한다. p33-HBcAg VLPs를 하기와 같이 제조하였다: B형 간염 바이러스의 완전한 바이러스 게놈을 포함하는 B 간염 클론 pEco63을 ATCC로부터 구입하였다. HBcAg를 코딩하는 유전자를 강한 tac 프로모터의 조절하에 발현 벡터 pkk223.3 (Pharmacia)의 EcoRI/HindIII 제한 부위내로 도입하였다. 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV)로부터 유래된 p33 펩티드(KAVYNFATM) (서열번호: 80)를 표준 PCR 방법에 의해 3개의 류신-링커를 통해 HBcAg (1-185)의 C-말단에 융합시켰다. 우수한 발현을 위해 선별된 E. coli K802를 플라스미드를 사용하여 형질감염시키고, 세포를 5 ml 용해 완충액 (10 mM Na₂HP0₄, 30 mM NaCl, 10 mM

EDTA, 0.25 % Tween-20, pH 7.0)에서 배양하고 재현탁시켰다. 200 μ l의 리소자임 용액(20 mg/ml)을 가하였다. 초음파 처리 후, 4 μ l의 벤조나제 및 10 mM MgCl₂를 가하고 현탁액을 RT에서 30분동안 인큐베이션시키고, 15분동안 15,000 rpm으로 4℃에서 원심분리하고 상등액을 유지시켰다.

이어서 20 % (w/v) (0.2 g/ml 용해물) 황산암모늄을 상등액에 가하였다. 30분동안 얼음상에서 인큐베이션시키고 15분동안 20,000 rpm으로 4℃에서 원심분리시킨 후 상등액을 버리고 펠렛을 2-3 ml PBS에서 재현탁시켰다. 20 ml의 PBS-용액을 Sephacryl S-400 겔 여과 칼럼(Amersham Pharmacia Biotechnology AG)상에 로딩하고, 분획을 SDS-Page 겔상에 로딩하고 정제된 p33-HBcAg VLP 캡시드를 갖는 분획을 폴딩하였다. 폴딩된 분획을 Hydroxyapatite 칼럼상에 로딩하였다. 플로우 트로우(Flow through)(정제된 p33-HBcAg VLP 캡시드 포함)를 수거하였다. 표준 프로토콜에 따라 전자현미경법을 시행하였다.

따라서, 전자 현미경법 및 SDS PAGE에 의해 p33-VLPs 구조를 평가하였다. 재조합하여 제조된 HBcAg 야생형 VLPs (HBcAg [aa 1- 185] 모노머로 구성) 및 p33-VLPs를 Sephacryl S-400 겔 여과 칼럼(Amersham Pharmacia Biotechnology AG)상에 로딩하고 여과시켰다. 폴딩된 분획을 Hydroxyapatite 칼럼상에 로딩하였다. 플로우 트로우(정제된 p33-VLPs 포함)를 수거하고 모노머 분자량 분석을 위해 환원 SDS-PAGE 겔상에 로딩하였다.

본 명세서를 통해 용어 p33-HBcAg VLP, HBcAg-p33 VLP, p33-VLPs 및 HBc33는 상호교환하여 사용된다.

실시예 2

GA VLP의 작제, 발현 및 정제

RevertAid First 스트랜드 cDNA 합성 키트(Fermentas)를 사용하여 GA 파지를 역전사시킨 후 PCR 증폭 단계에 의해 GA 파지 코트 단백질의 cDNA를 증폭시켰다. cDNA를 효소 NcoI 및 HindIII로 절단하고 동일한 효소로 미리 절단된 벡터 pQB185에 클로닝시켜 GA cDNA를 수반하는 플라스미드 355.24를 수득하였다. 삽입된 cDNA 서열을 DNA 서열화에 의해 체크하였다.

플라스미드 355.24를 *E. coli* JM109에서 형질전환시켰다. QB VLP에 대하여 기술된 바와 같이 실질적으로 발현을 시켰다. 진탕시키지 않고 밤새도록 20 mg/L 암피실린을 함유하는 LB 배지에 단일 콜로니를 접종시켰다. 다음날 1% 카사미노산, 0.2% 글루코스 및 20 mg/L 암피실린으로 보충된, M9 배지를 포함하는 더욱 큰 플라스크내로 이 접종물을 이동시키고, 14-20h동안 진탕시키면서 인큐베이션시켰다.

QB VLP에 대하여 기술된 바와 같이 실질적으로 GA VLP를 분리시켰다. 세포를 분해하고, 정제된 분해물을 Sepharose CL-4B 칼럼(Amersham Pharmacia)상에 로딩하였다.

용출물을 황산암모늄 침전을 통해 농축시키고, Sepharose CL-6B 칼럼(Amersham Pharmacia)상에서 재로딩시켰다. 최종 단계로 수크로스 구배(20-50% w/v), 또는 CsCl상에서 초원심분리하였다. 연속하여 20 mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0에 대하여 분리된 VLPs를 투석시켰다.

실시예 3

형광 표지된 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드를 BKV, HBcAg 및 QB-VLPs내로 패키징할 수 있다.

효소에서 제조된 VLPs는 용이하게 분해될 수 있고, VLPs를 RNase A와 인큐베이션시킴으로써 제거될 수 있는 소량의 RNA를 포함한다. 고도로 활성인 RNase A 효소의 분자량은 약 14 kDa이고, 원치않는 리보핵산을 제거하기 위해 VLPs내로 들어갈 수 있을만큼 충분히 작다. 재조합하여 제조된 BKV VLPs (서열번호: 12)를 PBS 완충액 pH7.2에서 1 mg/ml로 농축시키고 RNase A(200 μ g/ml, Roche Diagnostics Ltd, Switzerland) 의 존재 또는 부재하에 3h동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. RNase A 분해 후 BKV VLPs에 75nmol/ml 5'-형광 표지된 포스포로티오에이트 CpG-FAM 올리고뉴클레오타이드 (서열번호: 34로부터의 올리고뉴클레오타이드)를 보충하고 3 h동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서 BKV VLPs를 3h동안 37℃에서 DNaseI 분해시키거나(40u/ml AMPD1, Sigma, Division of Fluka AG, Switzerland) DNaseI 분해하지 않고 로딩하였다. 샘플을 6배 농축된 DNA-로딩 완충액 (10 mM Tris pH7.5, 10% v/v 글리세롤, 0.4% 오렌지

G)로 보충하고 1h동안 65볼트에서 0.8% 원(native) 트리-아세테이트 pH 7.5 아가로스 겔에서 이동시켰다. 에티디움 브로마이드로 염색시킬 때 핵산을 검출하고, 에티디움 브로마이드 부재하에 UV 여기를 통해 CpG- FAM에서 형광물질-표지의 형광을 야기시킨다.

에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue로 염색시키면서 대조군을 인큐베이션시키거나, RNase A로 분해한 후 더블 스트랜드 (ds) DNA (246 bp) (서열번호: 17)와 함께 인큐베이션시킨 후 BKV VLPs (15μg)를 원(native) 0.8% 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 하기 샘플을 겔상에 로딩하였다: 1: 비처리 BKV VLPs; 2: RNase A 처리된 BKV VLPs; 3: RNase A로 처리하고 dsDNA와 함께 인큐베이션시킨 BKV VLPs; 라인 M: Gene Ruler 1 Kb DNA 래더(MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, Germany).

에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue로 염색시키면서 대조군을 인큐베이션시키거나, RNase A로 분해한 후 CpG-올리고뉴클레오티드 (포스페이트- 또는 포스포로티오에이트 (pt) 백본 포함)와 함께 인큐베이션시킨 후 BKV VLPs (15μg)를 원(native) 0.8% 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 하기 샘플을 겔상에 로딩하였다: 1: BKV VLPs 스톱 (PBS/50% 글리세롤); 2: 비처리된 BKV VLPs (PBS 완충액); 3: RNase A 처리된 BKV VLPs; 4: RNase A 처리 후 투석시킨 BKV VLPs; 5: CpG-올리고뉴클레오티드와 함께 RNase A 처리된 BKV VLPs; 6: CpG (pt)-올리고머 와 함께 RNase A 처리된 BKV VLPs; 7: CpG (pt)-올리고머와 함께 RNase A 처리된 후 투석시킨 BKV VLPs; 라인 M: Gene Ruler 1 Kb DNA 래더(MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, Germany).

예측컨대 RNA로부터의 음전하 결핍에 의해 RNase A 분해는 Coomassie 염색된 아가로스 겔상에서 볼 수 있는 VLP 이동을 변화시켰다. CpG-올리고뉴클레오티드를 가하여 BKV VLPs 이동을 회복시키고 비처리된 VLP에서 나타나는 RNA 밴드와 동일하게 이동하는 형광 밴드를 얻었다. 이는 CpG-FAM 올리고뉴클레오티드가 VLPs내로 패키징되었음을 나타낸다.

실시예 4

라지(large) 더블 스트랜드 올리고뉴클레오티드를 BKV VLPs내로 패키징할 수 있다.

더블 스트랜드 (ds) 뉴클레오티드 서열을 도입하기 위하여 RNase A 처리된 재조합 BKV VLPs (실시예 3)를 50μg/ml (ds) DNA 단편 (길이 246 bp, dsDNA, 서열번호: 17)로 보충하고, 3h동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 샘플을 6-배 농축된 DNA-로딩 완충액 (10 mM Tris pH7.5, 10% v/v 글리세롤, 0.4% 오렌지 G)로 보충하고 1h동안 65볼트에서 0.8% 원 트리스-아세테이트 pH 8.0 아가로스 겔에서 이동시켰다. BKV VLPs(15μg)를 원(native) 0.8% 아가로스 겔 전기영동상에 로딩하고 대조군 인큐베이션시키거나 RNase로 분해시킨 후 분석하고 이후 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue로 염색시키면서 (ds) DNA와 인큐베이션시켜 RNA/DNA 또는 단백질의 존재를 평가하였다. 패키징된 DNA 분자는 에티디움 브로마이드 존재하에 Coomassie Blue로 가시화된 VLP 밴드와 동일하게 이동하는 밴드로서 가시화된다.

(ds) DNA를 가하여 BKV VLPs 이동을 회복시켜 Coomassie Blue로 염색된 VLPs와 동일하게 이동하는 DNA 밴드를 수득하였다. (ds) DNA가 BKV VLPs내로 패키징되었음을 명확하게 제시하였다 .

실시예 5

CpG-포함 올리고뉴클레오티드를 BKV VLPs내로 패키징할 수 있다.

면역자극 CpG-올리고뉴클레오티드를 도입하기 위하여, RNase A 처리된 재조합 BKV VLPs (실시예 3)에 150nmol/ml의 포스포디에스테르 백본을 포함하는 CpG- 올리고뉴클레오티드 CyCpG 또는 포스포로티오에이트 백본을 포함하는 CyCpGpt를 보충하고, 3h동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 마우스 면역화를 위해 VLP 시료(preparations)를 PBS pH7.2에 대하여 24h동안 300 kDa MWCO 투석 막(Spectrum Medical industries Inc. , Houston, USA)을 사용하여 철저하게 투석(10,000배 희석됨)시켜 RNase A 및 과량의 CpG-올리고뉴클레오티드를 제거하였다. 샘플에 6-배 농축된 DNA-로딩 완충액 (10 mM Tris pH7.5, 10% v/v 글리세롤, 0.4% 오렌지 G)을 보충하고 0.8% 원 트리-아세테이트 pH7.5 아가로스 겔에서 65볼트에서 1h동안 이동시켰다. BKV VLPs(15μg)를 원(native) 0.8% 아가로스 겔 전기영동상에 로딩하고 대조군 인큐베이션시키거나 RNase로 분해시킨 후 분석하고 이후 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue로 염색시키면서 CpG-올리고뉴클레오티드 (포스포디에스테르- 또는 포스포로티오에이트 백본 포함)와 인큐베이션시켜 RNA/DNA 또는 단백질의 존재 및 투석후 비결합 CpG- 올리고뉴클레오티드의 감소를 평가하였다. 비결합 CpG-올리고뉴

클레오티드는 저분자의 에티디움 브로마이드 염색된 밴드로서 가시화되었다. CpG-올리고뉴클레오티드를 가하여 BKV VLPs 이동을 회복시켜 Coomassie Blue로 염색된 VLPs와 동일하게 이동하는 DNA 밴드를 수득하였다. CpG-올리고뉴클레오티드가 BKV VLPs내로 패키징되었음을 명확하게 제시하였다.

실시예 6

VLPs 포함 CpG-올리고뉴클레오티드(포스포티오에이트 백본의 포스포로티오에이트 변형을 포함)는 증진된 Th1 지정 면역 반응을 유도한다.

암컷 BALB/c 마우스를 (그룹당 3마리의 마우스) 포스포로티오에이트 CpG-올리고뉴클레오티드 CyCpGpt (서열번호: 34)를 포함하는 10 μ g BKV VLPs를 피하 주사하였다. 대조군으로서 10 μ g의 RNase 처리된 BKV VLPs만 또는 200 μ l PBS pH7.2중 0.3 nmol 또는 20 nmol 포스포로티오에이트 CpG-올리고뉴클레오티드와 혼합된 BKV VLPs를 마우스에 피하 주사하거나 처리하지 않고 남겨두었다. BKV VLPs를 실시예 5에 기술된 바와 같이 제조하고, 면역화하기 전에 투석에 의해 비결합 CpG-올리고뉴클레오티드로부터 철저하게 정제시켰다. 면역 후 14일째 혈액을 채취하고 BKV VLPs에 대한 IgG1 및 IgG2a 항체 반응을 측정하였다(참조 표 1).

OD 50% 역가	BKV	BKV + 0.3 nmol CpG (pt)	BKV + 20 nmol CpG (pt)	BKV/0.3 nmol CpG (pt)
IgG1	1015	823	<40	340
Stdev	470	412	0	241
IgG2a	1190	1142	4193	2596
Stdev	406	1219	1137	1232

표 1: BKV VLPs and 포스포로티오에이트 (pt) CpG-올리고뉴클레오티드로 면역화시킨 후 14일째 BKV VLPs에 대한 마우스 IgG1 및 IgG2a OD50% 항체 역가

동일한 용량(0.3 nmol)의 BKV VLPs 단독으로, 또는 BKV VLPs와 혼합된 CpG- 올리고뉴클레오티드로 면역화시킨 것과 비교하여 포스포로티오에이트 CpG-올리고뉴클레오티드 CyCpGpt를 포함하는 RNase A 처리된 BKV VLPs로 면역화시켜 IgG1 역가를 증가시키고 항-BKV VLP IgG2a 역가를 증가시켰다. 20 nmol 포스포로티오에이트 CpG-올리고뉴클레오티드 CyCpGpt와 혼합된 BKV VLPs로 면역화된 마우스는 매우 낮은 IgG1 및 높은 IgG2a 역가를 나타내었다. 대조군과 비교하여 IgG1의 감소 및 IgG2a의 증가는 BKV VLPs에 패키징된 포스포로티오에이트 CpG-올리고뉴클레오티드에 의해 유도된 Th1 세포 지정 면역 반응을 입증하였다. 표 1을 통해 단순히 CpG- 올리고뉴클레오티드와 혼합된 BKV VLPs와 비교하여 입자내 패키징된 CpG-올리고뉴클레오티드를 포함하는 BKV VLPs의 더욱더 높은 효능이 입증되었다.

실시예 7

면역자극 핵산은 항원과 함께 융합 단백질을 포함하는 HBcAg VLPs내로 패키징될 수 있다.

B형 간염 코어 항원 융합 단백질 p33-HBcAg (HBc33) (참조 실시예 1) 또는 융합 단백질을 펩티드 P1A (HBcP1A)로 발현시켜 E. coli에서 제조된 HBcAg VLPs는 분해되고 RNase A와 VLPs를 인큐베이션시켜 제거될 수 있는 RNA를 포함한다. 유전자 P1A는 비만세포종 종양세포주 P815에 의해 발현되는 단백질을 코딩한다. P1A 펩티드로 명명되는 우성 CTL 에피토프는 MHC 부류 I (Ld)와 결합하고 콤플렉스는 특이 CTL 클론에 의해 인식된다(Brandle et al. , 1998, Eur. J. Immunol. 28: 4010-4019). 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 적절한 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 펩티드P1A-1 (LPYLGLWLVF)(서열번호: 90)을 HBcAg C-말단(aa 185, 참조 실시예 1)에 융합시켰다. HBcAg 및 펩티드 서열 사이에 3개의 류신 링커를 클로닝하였다. 실시예 1에 기술된 바와 같이 발현시켰다. HBcP1A로 명명되는 P1A를 포함하는 HBcAg의 융합 단백질은 E. coli에서 발현될 때 실시예 1에 기술된 바와 유사한 방법에 따라 정제될 수 있는 캡시드를 형성하였다.

효소적 RNA 가수분해: 1 x PBS 완충액 (KCl 0.2g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ 1.15 g/L) pH 7.4중 1.0 mg/ml의 농도로 재조합으로 생산된 HBcAg-p33 (HBc33) VLPs를 300 μ g/ml RNase A (Qiagen AG, Switzerland)의 존재하에 3시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 650rpm으로 써모믹서에서 인큐베이션시켰다.

면역자극 핵산의 패키징: RNA를 RNase A로 분해한 후 HBcAg-p33 VLPs에 130 nmol/ml CpG-올리고뉴클레오티드 B-CpG, NKCPG, G10-PO를 보충하였다(표 2). 유사하게, 둘 모두 다수의 CpG 모티프를 포함하는 150mer 싱글-스트랜드

패킹 분석: 패킹된 면역자극 핵산의 유리: 50 μ l의 캡시드 용액에 1 μ l의 단백질 분해 효소 K (600 U/ml, Roche, Mannheim, Germany), 3 μ l의 10% SDS-용액 및 6 μ l의 10배 단백질 분해효소 완충액 (0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 0.1 M Tris pH 7.4) 를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. VLPs를 이 조건하에서 완전하게 가수분해하였다. 65 $^{\circ}$ C에서 20분동안 가열시켜 단백질 분해 효소 K를 불활성화시켰다. 1 μ l의 RNase A (Qiagen, 100 μ g/ml, 250배 희석)를 25 μ l의 캡시드에 가하였다. 2-30 μ g의 캡시드를 1 용량의 2x 로딩 완충액(IxTBE, 42% w/v 우레아, 12% w/v Ficoll, 0.01 % Bromphenolblue)와 혼합하고, 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열하고 loaded on a 10% (약 20nt 길이의 올리고뉴클레오티드) 또는 15% (> 40 mer 이상의 핵산) TBE/우레아 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen)상에 로딩하였다. 다르게는 샘플을 6x 로딩 다이(10 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 10% v/v 글리세롤, 0.4 % 오렌지 G)를 포함하는 1% 아가로스 겔상에 로딩하였다. TBE/우레아 겔을 SYBRGold로 염색하고 아가로스 겔을 에티디움 브로마이드로 염색하였다.

올리고뉴클레오티드 B-CpG, NKCPG 및 G10-PO를 HBc33내로 패킹시켰다. 에티디움 브로마이드 및 Coomassie Blue로 염색된 1% 아가로스 겔상에서 HBc33 VLPs내로 패킹된 B-CpG를 분석하였다. 50 μ g의 하기 샘플: 1. 비처리 HBc33 VLP; 2. RNase A로 처리된 HBc33 VLP; 3. RNase A로 처리되고 B-CpG와 함께 패킹된 HBc33 VLP; 4. RNase A로 처리되고 B-CpG와 함께 패킹되고 DNaseI로 처리된 HBc33 VLP; 5. RNase A로 처리되고 B-CpG와 함께 패킹되고 DNaseI로 처리되고 투석된 HBc33 VLP; 6.1 kb MBI Fermentas DNA 래더를 겔 상에 로딩하였다. VLP로부터 추출된 패킹된 B-CpG의 양을 에티디움 브로마이드로 염색된 1.5% 아가로스 겔상에 분석하였다. 하기 샘플 1. 0.5 nmolB-CpG 대조군; 2. 0.5 nmolB-CpG 대조군; 3. 페놀/클로로포름 추출법 후 B-CpG 올리고 내용물 HBc33; 4. 페놀/클로로포름 추출법 RNase A 처리 후 B-CpG 올리고 내용물 HBc33; 5. 페놀/클로로포름 추출법 및 DNaseI 처리 후 B-CpG 올리고 내용물 HBc33; 6. 엠티(empty); 7. MBI Fermentas 100 bp DNA 래더를 겔상에서 로딩하였다.

에티디움 브로마이드 및 Coomassie Blue로 염색된 1% 아가로스 겔상에서 HBc33 VLPs내로 패킹된 NKCPG를 분석하였다. 15 μ g의 하기 샘플: 1. 비처리 HBc33 VLP; 2. RNase A로 처리된 HBc33 VLP; 3. RNase A로 처리되고 NKCPG와 함께 패킹된 HBc33 VLP; 4. RNase A로 처리되고 NKCPG와 함께 패킹되고 DNaseI로 처리된 HBc33 VLP; 5. 1 kb MBI Fermentas DNA 래더를 겔 상에 로딩하였다. VLP로부터 추출된 패킹된 NKCPG의 양을 SYBR 골드로 염색된 15% TBE/우레아 겔상에 분석하였다. 하기 샘플 1. 프로테아제 K 분해 및 RNase A 처리후의 NKCPG 올리고 내용물 HBc33; 2. 20 pmol NKCPG 대조군; 3. 10 pmolNKCPG 대조군; 4.40 pmolNKCPG 대조군을 겔상에 로딩하였다.

에티디움 브로마이드 및 Coomassie Blue로 염색된 1% 아가로스 겔상에서 HBc33 VLPs내로 패킹된 g1Ogacga-PO를 분석하였다. 15 μ g의 하기 샘플: 1.1 kb MBI Fermentas DNA 래더; 2. 비처리된 HBc33 VLP; 3. RNase A로 처리된 HBc33 VLP; 4. RNase A로 처리되고 g1Ogacga-PO와 함께 패킹된 HBc33 VLP; 5. RNase A로 처리되고 g1Ogacga-PO와 함께 패킹되고 벤조나아제에 처리되고 투석된 HBc33 VLP를 겔상에서 로딩하였다.

VLPs내 RNA 함량은 RNaseA 처리 후 현저히 감소한 반면, 대부분의 캡시드는 예상전대 음전하의 RNA의 제거에 기인하여 저속으로 이동하는 표본(smear)과 같이 이동하였다. 과량의 올리고뉴클레오티드와의 인큐베이션 후 캡시드는 RNaseA 처리된 캡시드보다 더욱 많은 양의 핵산을 포함하였고, 이로써 비처리된 캡시드와 유사한 속도로 이동하였다. 추가의 DNase I 또는 벤조나아제에 의한 처리는 유리 올리고뉴클레오티드를 분해시킨 반면, 캡시드내 패킹된 올리고뉴클레오티드는 분해시키지 못했고, 이는 올리고뉴클레오티드의 패킹을 명확히 보여주는 것이다. 몇몇 경우에 있어, DNase I/벤조나아제 처리 및 투석 후 프로테아제 K 분해에 의해 올리고뉴클레오티드의 패킹을 확인하였다. 상기 기술한 방법으로 캡시드로부터 유리된 올리고뉴클레오티드는 패킹을 위해 사용되는 올리고뉴클레오티드와 크기가 동일하다는 결과는 올리고뉴클레오티드의 패킹을 명확히 입증시켜 주었다.

라지 싱글-스트랜드 올리고뉴클레오티드 Cy150-1을 HBc33내로 패킹하였다. Cy150-1은 7.5개의 CyCpG 리피트(repeats)를 포함하고, 표준 올리고뉴클레오티드 합성 방법(IBA, Gottingen, Germany)에 따라 합성하였다. HBc33 VLPs내로 패킹된 Cy150-1을 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue으로 염색된 1% 아가로스 겔상에서 분석하였다. 15 μ g의 하기 샘플: 1.1 kb MBI Fermentas DNA 래더; 2. 비처리된 HBc33 VLP; 3. RNase A로 처리된 HBc33 VLP; 4. RNase A로 처리되고 Cy150-1와 함께 패킹된 HBc33 VLP; 5. RNase A로 처리되고 Cy150-1와 함께 패킹되고 DNaseI로 처리되고 투석된 HBc33 VLP를 겔상에서 로딩하였다. VLP로부터 추출된 패킹된 Cy150-1의 양을 SYBR 골드로 염색된 10 % TBE/우레아 겔상에 분석하였다. 하기 샘플 1. 20 pmol Cy150-1 대조군; 2. 10 pmolCy150-1 대조군; 3. 4 pmol Cy150-1 대조군; 4. 1 용량인 10 % TBE/우레아 샘플 완충액과 함께 95 $^{\circ}$ C에서 3분 후 4 μ g의 HBc33의 Cy150-1 올리고 내용물을 겔상에 로딩하였다. VLPs내 RNA 함량은 RNaseA 처리 후 현저히 감소한 반면, 대부분의 캡시드는 저속으로 이동하는 표본과 같이 이동하였다. 캡시드를 4 용량의 물로 희석시키고 1 mg/ml로 농축시켰다. 과량의 Cy150-1과의 인큐베이션 후 캡시드는 RNaseA 처리된 더욱 많은 양의 핵산을 포함하였고, 이로써 비처리된 캡시드와 유

사한 속도로 이동하였다. 추가의 DNase I에 의한 처리는 패키징되지 못한 유리 올리고뉴클레오타이드를 분해시킨 반면, 캡시드내 패키징된 올리고뉴클레오타이드는 분해시키지 못했다. TBE/우레아 로딩 완충액중 3분동안 95℃에서 가열하여 패키징된 VLPs로부터 DNaseI-내성 핵산의 유리는 150mer의 존재를 밝혀주었다.

올리고뉴클레오타이드 NKCPGpt 또한 HBcP1 A내로 패키징시켰다. HBc33 VLPs내로 패키징된 NKCPGpt를 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue으로 염색된 1% 아가로스 겔상에서 분석하였다. 15μg의 하기 샘플: 1.1 kb MBI Fermentas DNA 래더; 2. 비처리된 HBcP1 A; 3. RNase A로 처리된 HBcP1 A VLP; 4. RNase A로 처리되고 NKCPGpt와 함께 패키징된 HBcP1 A VLP를 겔상에서 로딩하였다. RNase 처리는 핵산의 함량을 감소시켰다. 캡시드의 이동을 저속화시켰다. NKCPGpt 첨가는 캡시드내 핵산 함량을 회복시키고 이동을 가속화시켰다.

실시예 8

면역자극 핵산을 항원과 커플링된 HBcAg-wt내로 패키징시킬 수 있다.

림프구백락수막염 바이러스(LCMV)로부터 유래된 펩티드 p33(CGG-KAVYNFATM) (서열번호:81)와 커플링시킨 후 재조합하여 제조된 HBcAg-wt VLPs를 패키징하였다. 커플링을 위해 HBcAg-wt VLPs (2 mg/ml)를 써모믹서에서 1시간동안 25℃에서 25 x 물 과량의 SMPH (숙신이미딜-6-[(β-말레이미도-프로피온아미도)헥사노에이트], Pierce)으로 유도화시켰다. 유도화된 VLPs를 4℃에서 MWCO 10.000 kD 투석막을 사용하여 2 x 2 h 동안 pH 7.4의 Mes 완충액 (2-(N-모르폴리노)에탄설포산)에 투석시켰다. 이어서 VLPs(50μM)를 25℃에서 써모믹서에서 2h 동안 인큐베이션시키는 동안 p33 펩티드(250μM)의 N-말단 시스테인에 커플링시켰다. 샘플을 1 x PBS pH 7.4에 철저하게 투석시켜(MWCO 300.000) 원치않는 유리 펩티드를 제거하였다.

SMPH에 의해 유도화되고 p33 펩티드와의 커플링된 HBcAg-wt VLPs를 SDS-PAGE상에서 분석하였다. 샘플을 16% SDS PAGE로 분석하고 Coomassie Blue로 염색하였다. 하기 샘플: 1. NEB Prestained 단백질 마커, Broad Range(#7708S), 10μl; 2. p33 펩티드; 3. 투석 전 SMPH에 의해 유도화된 HBcAg-wt VLP; 4. 투석 후 SMPH에 의해 유도화된 HBcAg-wt VLP; 5. p33와 커플링된 HBcAg-wt VLP, 상등액; 6. p33와 커플링된 HBcAg-wt VLP, 펠릿을 겔상에 로딩하였다. HBcAg-wt는 21 kD 단백질 밴드로 가시화되었다. SMPH의 저분자량에 기인하여 유도화된 산물은 단지 아주 약간 더욱 크고 SDS-PAGE에 의해 식별할 수 있다. 오직 펩티드만이 3 kD 밴드로서 가시화되었고, HBx33로 명명되는 커플링된 산물은 대략 24 kD에서 현저하게 2차 밴드가 나타났고, 이는 전체 HBcAg-wt의 50%를 차지하였다.

효소적 RNA 가수분해: RNase A (300μg/ml, Qiagen AG, Switzerland)의 존재하에 HBx33 VLPs (0.5-1.0 mg/ml, 1xPBS 완충액 pH7.4)를 4 용량의 H₂O로 희석시켜 염 농도를 최종 0.2xPBS 농도로 감소시키고 3시간동안 37℃에서 650rpm으로 써모믹서에서 인큐베이션시켰다.

면역자극 핵산의 패키징: RNase A 분해 후 Millipore Microcon 또는 Centrplus 농축기를 사용하여 HBx33 VLPs를 농축시킨 후 130 nmol/ml CpG-올리고뉴클레오타이드 B-CpGpt로 보충하고 pH 7.4의 0.2xPBS에서 3시간동안 37℃에서 써모믹서에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 3시간동안 37℃에서 DNaseI 분해 (5 U/ml) 시켰다(DNaseI, RNase free Fluka AG, Switzerland). 마우스 면역화를 위해 VLP 시료를 PBS pH7.4에 대하여 24h 동안 300 kDa MWCO 투석막(Spectrum Medical industries Inc. , Houston, USA)을 사용하여 철저하게 투석(2x 200배 용량에 대하여)시켜 RNase A 및 과량의 CpG-올리고뉴클레오타이드를 제거하였다. HBx33 VLPs내로 패키징된 B-CpGpt 분석을 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue로 염색된 1% 아가로스 겔에서 수행하였다. 50μg의 하기 샘플: 1. 비처리 HBx33 VLP; 2. RNase A로 처리된 HBx33 VLP; 3. RNase A로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징된 HBx33 VLP; 4. RNase A로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징되고 DNaseI로 처리된 HBx33 VLP; 5. RNase A로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징되고 DNaseI로 처리되고 투석된 HBx33 VLP; 6.1 kb MBI Fermentas DNA 래더를 겔 상에 로딩하였다. RNase 처리가 캡시드의 핵산 함량을 감소시키고 그의 이동을 저속화시키는 것으로 나타날 수 있다. B-CpGpt의 첨가는 캡시드의 이동을 가속화시키고 핵산 함량을 회복시켰다. DNase I만이 유리 올리고뉴클레오타이드를 분해시킨 반면, 패키징된 올리고뉴클레오타이드는 투석후에도 VLP에 남아있었다.

실시예 9

면역자극 핵산은 항원과 커플링된 Qβ VLPs내로 패키징될 수 있다.

p33 펩티드와 Qβ VLPs의 커플링

RNA-박테리오파지 Qb의 재조합적으로 제조된 바이러스-양 입자(Q β VLPs)를 처리하지 않고 사용하거나 N-말단 CGG 또는 및 C-말단 GGC 신장 (CGG-KAVYNFATM (서열번호:81) 및 KAVYNFATM-GGC (서열번호: 82))을 포함하는 p33 펩티드에 커플링시킨 후 사용하였다. 재조합적으로 제조된 Q β VLPs를 10 몰 과량의 SMPH (Pierce)으로 0.5 h동안 25℃에서 유도화시킨 후 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2에 대하여 4℃에서 투석하여 반응하지 않은 SMPH를 제거하였다. 펩티드를 5 배 몰 과량에 가하고 30% 아세토니트릴의 존재하에 25℃에서 썬모믹서내에서 2시간동안 반응시켰다. Coomassie Blue 염색 후 SDS-PAGE상에서 p33 펩티드와 Q β VLPs의 커플링을 분석하였다. 하기 샘플: (A) 1. NEB Prestained 단백질 마커, Broad Range(#7708S), 10 μ l; 2. Q β VLP, 14 μ g; 3. 투석 후 SMPH로 유도화된 Q β VLP; 4. CGG-p33와 커플링된 Q β VLP, 상등액. (B) 1. NEB Prestained 단백질 마커, Broad Range(#7708S), 10 μ l; 2. Q β VLP, 10 μ g; 3. CGG-p33와 커플링된 Q β VLP, 상등액상에 로딩하였다. SDS-PAGE 분석을 통해 Q β 모노머와 커플링된 1, 2, 또는 3개의 펩티드로 구성된 다중 커플링 밴드가 입증되었다. 단순화하기 위하여 펩티드 p33 및 Q β VLPs의 커플링 산물을 특히 실험부를 통해 Qbx33로 명명하였다.

박테리오파지 Q β 캡시드 단백질을 발현시켜 E. coli에서 생산되었을 때, Q β VLPs는 VLPs를 RNase A와 인큐베이션시켜 분해되어 제거될 수 있는 RNA를 포함한다.

낮은 이온 강도 및 낮은 Q β 농도는 RNase A에 의해 Q β VLPs가 RNA 가수분해될 수 있도록 한다:

20mM Hepes/150mM NaCl 완충액 (HBS) pH 7.4중 농도 1.0 mg/ml의 Q β VLPs를 RNase A(300 μ g/ml, Qiagen AG, Switzerland)를 가하여 직접 분해하거나 4 용량의 H₂O로 희석하여 최종 0.2 x HBS 농도로 한 후 RNase A (60 μ g/ml, Qiagen AG, Switzerland)와 함께 인큐베이션시켰다. 썬모믹서에서 650 rpm으로 3시간동안 인큐베이션시켰다. 낮은 이온 강도 및 높은 이온 강도하에 RNase A에 의해 Q β VLPs로부터의 RNA 가수분해를 에티디움 브로마이드 및 Coomassie Blue으로 염색된 1 % 아가로스 겔상에서 분석하였다. 하기 샘플: (A, B) 1. MBI Fermentas 1kb DNA 래더; 2. 비처리된 Q β VLP; 3. 1x HBS 완충액 pH7.2중 RNase A로 처리된 Q β VLP. (C, D) 1. MBI Fermentas 1kb DNA 래더; 2. 비처리된 Q β VLP; 3. 0.2 x HBS 완충액 pH7.2중 RNase A로 처리된 Q β VLP를 겔상에 로딩하였다. 1 x HBS에서는 RNA 내용물의 단지 매우 약한 환원만이 관찰된 반면, 0.2x HBS에서는 대부분의 RNA이 가수되었음이 입증되었다. 이와 일치하여, 1 x HBS중 RNase A를 가한 후 캡시드 이동은 변함이 없었지만, 0.2xHBS에서 RNase A를 가한 후에는 좀더 서서히 이동하였다.

낮은 이온 강도는 Q β VLPs내 핵산 패키징을 증가시킨다:

RNase A 분해시킨 후 Millipore Microcon 또는 Centriplus 농축기를 사용하여 0.2 x HBS에서 Q β VLPs를 1 mg/ml로 농축시키고 분취량을 1 x HBS 또는 0.2 x HBS에 대하여 투석시켰다. Q β VLPs에 130nmol/ml CpG- 올리고뉴클레오티드 B-CpG를 보충하고 썬모믹서에서 3시간동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 연속하여 Q β VLPs를 3시간동안 37℃에서 벤조나제 분해하였다(100 U/ml). 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue으로 염색한 후 샘플을 1% 아가로스 겔상에서 분석하였다. 하기 샘플: 1. 비처리된 Q β VLP; 2. RNaseA로 처리된 Q β VLP; 3. 0.2x HBS 완충액 pH7.2중에서 RNaseA로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징되고 벤조나아제로 처리된 Q β VLP; 4. 1x HBS 완충액 pH7.2중에서 RNaseA로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징되고 벤조나아제로 처리된 HBx33 VLP (참조, 실시예 12)을 겔상에 로딩하였다.

1 x HBS에서는 매우 소량의 올리고뉴클레오티드가 패키징될 수 있었던 반면 0.2 x HBS에서는 강한 에티디움 브로마이드 염색 밴드를 검출할 수 있었고, 이는 캡시드의 Coomassie blue 염색과 함께 위치하고 있음을 나타내었다.

상당한 면역자극 핵산은 낮은 이온 강도는 Q β 및 Qbx33 VLPs내에 패키징될 수 있다:

RNase A 분해시킨 후 Millipore Microcon 또는 Centriplus 농축기를 사용하여 0.2 x HBS에서 Q β 또는 Qbx33 VLPs를 1 mg/ml로 농축시키고 130nmol/ml CpG-올리고뉴클레오티드 B-CpG, g10gacga 및 253 mer dsCyCpG-253 (표 2)를 보충하고 썬모믹서에서 3시간동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 연속하여 Q β 또는 Qbx33 VLPs를 3시간동안 37℃에서 DNase I 분해 (5U/ml) 또는 벤조나제 분해하였다(100 U/ml). 에티디움 브로마이드 또는 Coomassie Blue으로 염색한 후 샘플을 1% 아가로스 겔상에서 분석하였다.

50 μ g의 하기 샘플: 1. 비처리된 Qbx33 VLP; 2. RNaseA로 처리된 Qbx33 VLP; 3. RNaseA로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징된 Qbx33 VLP; 4. RNaseA로 처리되고 B-CpG와 함께 패키징되고 DNaseI로 처리되고 투석된 Qbx33 VLP; 5. 1 kb MBI Fermentas DNA 래더를 겔상에 로딩하였다. (C)는 SYBR Gold로 염색된 15% TBE/우레아상에서 VLP로부터 추

출된 패키징된 올리고의 양 분석을 나타낸다. 하기 샘플: 1. 프로테아제 K 분해 및 RNase A 처리 후 2µg Qbx33 VLP의 BCpGpt 올리고; 2. 20 pmol B-CpGpt 대조군; 3. 10 pmol B-CpGpt 대조군; 4. 5 pmol B-CpGpt 대조군을 겔상에 로딩하였다.

또다른 겔상에 15µg의 하기 샘플: 1. MBI Fermentas 1 kb DNA 래더; 2. 비처리된 Qbx33 VLP; 3. RNaseA로 처리된 Qbx33 VLP; 4. RNaseA로 처리되고 g1Ogacga-PO와 함께 패키징된 Qbx33 VLP; 5. RNaseA로 처리되고 g1Ogacga-PO와 함께 패키징되고, 벤조나아제로 처리되고 투석된 Qbx33 VLP를 로딩하였다.

세번째 겔상에서 15µg의 하기 샘플: 1. MBI Fermentas 1 kb DNA 래더; 2. 비처리된 Qbx33 VLP; 3. RNaseA로 처리된 Qbx33 VLP; 4. RNaseA로 처리되고 dsCyCpG-253와 함께 패키징되고 DNaseI로 처리된 Qbx33 VLP; 5. RNaseA로 처리되고 dsCyCpG-253와 함께 패키징되고, DNaseI로 처리되고 투석된 Qbx33 VLP를 로딩하였다.

상이한 핵산 B-CpGpt, g1Ogacga 및 253mer dsDNA 가 Qbx33내로 패키징될 수 있었다. 패키징 핵산은 DNase I 분해에 대하여 내성을 갖고 투석시 패키징된 상태로 남아있었다(도 18). B-CpGpt의 패키징은 단백질 분해 효소 K 분해 후 아가로스 전기영동 및 에티디움 브로마이드 염색에 의한 핵산 방출을 통해 확인되었다.

실시에 10

AP205 디섀블리-정제-리섀블리 및 면역자극 핵산의 패키징

A. 올리고뉴클레오티드를 첨가하지 않고 리섀블리할 수 있는 물질로부터의 AP205 VLP의 디섀블리 및 리섀블리

디섀블리: 40 mg의 동결되고 정제된 AP205 VLP (서열 번호: 80 또는 81)를 4 ml 6 M GuHCl에 재용해시키고 밤새도록 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 디섀블리 혼합물을 8000 rpm (Eppendorf 5417 R, 고정각 원통 FF34-6-38, 이후 모든 단계에서 사용)에서 원심분리하였다. 펠릿을 7 M 우레아에 재용해시키면서 완충액을 3회 교환하면서 상등액을 NET 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5mM EDTA 및 150 mM NaCl 포함)에 대하여 3일간 투석시켰다. 다르게는, 4일에 걸쳐 연속 방식으로 투석을 수행하였다. 투석된 용액을 8000 rpm에서 20분동안 원심분리하고 펠릿을 7 M 우레아에 재용해시키고 상등액을 황산암모늄(포화도 60%)로 펠릿화하고 10 mM DTT를 포함하는 7 M 우레아에 재용해시켰다. 7 M 우레아에 재용해된 모든 이전 펠릿을 혼합하고 황산암모늄(포화도 60%)로 침전시키고 10 mM DTT를 포함하는 7 M 우레아에 재용해시켰다. 10 mM DTT를 포함하는 7 M 우레아에 재용해된 물질을 혼합하고 10 mM DTT를 포함하는 평형화된 Sephadex G75 칼럼상에 로딩하고 2ml/h으로 7 M 우레아 완충액으로 용출시켰다. 하나의 피크를 칼럼으로부터 용출시켰다. 3 ml의 분획을 수거하였다. AP205 코트 단백질을 포함하는 피크를 폴딩하고 황산암모늄(포화도 60%)으로 침전시켰다. 펠릿을 8000rpm에서 20분동안 원심분리하여 분리하였다. 10 mM DTT를 포함하는 7 M 우레아에 재용해시키고, 짧은 Sepharose 4B 칼럼(1.5 X 27 cm Sepharose 4B, 2 ml/h, 7 M 우레아, 10 mM DTT: 용출 완충액으로서)상에 로딩하였다. 작은 솔더를 갖는 주된 하나의 키프를 칼럼으로부터 용출시켰다. 솔더를 제외하고 AP205 코트 단백질을 포함하는 분획을 SDS-PAGE에 의해 확인하고 폴딩하였다. 10.3 ml의 샘플을 수득하였다. 측정하기 위하여 25배로 희석된 분취량의 단백질을 측정하여 하기 식: $\{(1.55 \times \text{OD}280 - 0.76 \times \text{OD}260) \times \text{부피}\}$ 을 사용하여 분광광도법으로 단백질의 농도를 예측하였다. 평균 농도는 1 nmol/ml의 VLP (2.6 mg/ml)이었다. 280nm 대 260 nm에서의 흡광도 비는 0.12/0. 105이었다.

리섀블리 : 1. 1 ml 베타-머캅토에탄올을 샘플에 가하고 하기에 리섀블리 반응을 세팅하였다:

1ml의 AP205 코트 단백질, 핵산 없음

1ml의 AP205 코트 단백질, rRNA (대략 200 OD260 유닛, 10 nmol)

9ml의 AP205 코트 단백질, CyCpG(370µl의 225 pmol/µl 용액, 즉, 83 nmol).

이 혼합물을 10% 베타-머캅토에탄올을 포함하는 30ml의 NET 완충액에 대하여 1시간동안 투석하였다. 핵산을 포함하지 않는 혼합물을 따라 투석하였다. 이어서 연속 방식으로 투석을 수행하고, 1l의 NET 완충액을 3일에 걸쳐 교환하였다. 연속하여 반응 혼합물을 물(완충액 5회 교환)에 대하여 완전하게 투석시키고 동결시켰다. 물에 재용해시키고 EM에 의해 분석하였다. 모든 혼합물을 캡시드 포함하였고, 이는 에티디움 브로마이드 염색을 사용하여 아가로스 겔 전기영동에 의해 측정되고 EM 분석에 의해 입증된 바와 같이 AP205 VLP 리섀블리는 검출가능한 핵산의 존재와 무관함을 나타낸다. EM 방법은 하기와 같았다: 단백질 현탁액을 탄소-폼바르(fonmvar) 코팅된 그리드상에 흡착시키고 2% 포스포탄산(pH 6, 8)으

로 염색하였다. 그리드를 80 kV의 가속 전압에서 JEM100C (JEOL, Japan) 전자 현미경으로 조사하였다. 영상 판독(음성)을 Kodak 전자 영상 필름에서 수행하고 Kodak Polymax 지상에서 음성으로 프린트하여 전자 현미경 사진을 취득하였다. CyCpG 존재하에 리셈블리된 VLP를 Sepharose 4B 칼럼(1 X 50cm)상에서 정제하고 NET 완충액(1 ml/h)로 용출시켰다. 분획을 Ouchterlony 에세이로 분석하고, VLP를 포함하는 분획을 풀링하였다. 8ml의 샘플을 취득하고, 이를 투석에 의해 물에 대하여 탈염화시키고 건조시켰다. 캡시드의 수율은 10 mg이었다. 에티디움-브로마이드로 염색된 0.6% 아가로스 겔에 재용해된 물질의 분석을 통해 캡시드에는 핵산이 결합되어 있음이 나타났다. 리셈블리 단계 후 대량 투석 전 채취된 CyCpG를 포함하는 리셈블리 반응물의 샘플을 0.6% 아가로스 겔상에서 분석하였다. 완전한 AP205 VLP한 동일한 높이로 이동하고 에티디움-브로마이드 및 Coomassie blue 염색 모두로 염색되는 밴드를 수득할 수 있었고, 이는 AP205 VLP 포함 올리고데옥시뉴클레오티드가 리셈블리되었음을 나타낸다. 리셈블리 과정 후 대량 투석 단계를 통해 VLPs 외부로 올리고데옥시뉴클레오티드를 확산시킬 수 있다. 중요하게는, AP205 VLPs는 또한 에티디움 브로마이드 염색을 사용하여 아가로스 겔 전기영동에 의해 측정된 바와 같이 검출가능한 올리고데옥시뉴클레오티드의 부재하에서 리셈블리될 수 있다. 따라서, 올리고데옥시뉴클레오티드는 VLP의 초기 디셈블리 후, 핵산으로부터 디셈블리된 코트 단백질을 정제하고, 올리고데옥시뉴클레오티드의 존재하에 VLP를 연속하여 리셈블리한 후 성공적으로 AP205 VLP에 결합할 수 있다.

B. 첨가된 올리고뉴클레오티드 부재하에 리셈블리하지 못한 디셈블리 물질을 사용하는 AP205 VLP의 리셈블리

디셈블리 : 100 mg의 정제되고 건조된 재조합 AP205 VLP를 상기 기술한 바와 같이 디셈블리하기 위하여 사용하였다. 황산암모늄 침점 단계의 펠릿을 용해시키기 위하여 8 M 우레아를 사용하고, 리셈블리전 CL-4B 칼럼을 사용하는 겔 여과 단계를 삭제한 것을 제외하고 파트 1에서 디셈블리하에 기술된 모든 단계를 실질적으로 수행하였다. 파트 A에서 기술된 식을 사용하여 분광법에 의해 측정된 바 Sephadex G-75 칼럼의 풀링된 분획은 21 mg의 단백질을 포함하였다. 샘플의 280nm에서의 흡광도 대 260 nm에서의 흡광도의 비는 0.16 대 0.125이었다. 측정하기 위하여 샘플을 50배로 희석하였다.

리셈블리 : Sephadex G-75 겔 여과 정제 단계로부터 생성된 단백질 시료를 황산암모늄(포화도 60%)으로 침전시키고, 생성된 펠릿을 2 ml 7 M 우레아, 10 mM DTT에 용해시켰다. 샘플을 NET 완충액중에서 8ml의 10% 2-머캅토에탄올로 희석하고 1시간동안 NET 완충액중에서 40ml의 10% 2-머캅토에탄올에 대하여 투석하였다. 0.4ml의 CyCpG 용액 (109nmol/ml)을 투석액중 단백질 샘플에 가하여 리셈블리를 개시하였다. 연속 모두의 투석으로 세팅하고, 용출 완충액으로서 NET 완충액을 사요하였다. 2일동안 투석시키고 투석 단계 종결 후 EM 분석을 위해 샘플을 채취하였다(도 44 B). 투석된 리셈블리 용액을 NET 완충액중 50% v/v 글리세롤에 대하여 연속하여 투석하여 농축시켰다. 투석 후 1일째 완충액을 1회 교환하였다. 총 3일간 투석을 실시하였다.

투석되고 농축된 리셈블리 용액을 1 ml/시간의 유속으로 Sepharose 4-B 칼럼(1X60 cm)상에서 겔 여과에 의해 NET 완충액중에서 정제하였다. 분획을 Ouchterlony 분석에서 시험하고 캡시드를 포함하는 분획을 건조시키고 물에 재현탁시키고 20 mM Hepes pH 7.6에서 평형화된 4-B 칼럼상에서 다시 크로마토그래피하였다. 하기 3개의 식:

$1. (183 * OD_{230nm} - 75.8 * OD_{260nm}) * 부피(ml) \sim 2. ((OD_{235nm} - OD_{280nm}) / 2.51) * 부피 - 3. ((OD_{228.5nm} - OD_{234.5nm}) * 0.37) * 부피$ 중 하나를 사용하여 리셈블리된 VLP의 단백질의 양이 6-26mg인 것으로 측정되었다.

리셈블리된 AP205 VLPs를 상기 기술한 바와 같이 EM, 아가로스 겔 전기영동 및 비-환원 조건하에 SDS-PAGE 로 분석하였다.

디셈블리된 물질의 EM 분석을 통해 구아니디움-클로라이드에 의한 AP205 VLP 처리가 VLP의 캡시드 어셈블리를 파쇄한다는 것을 나타냈다. 올리고뉴클레오티드와 디셈블리된 물질의 리셈블리로 캡시드를 수득하고, 이는 정제되고 추가로 겔 여과에 의해 농축된다. 다른 크기의 입자 두개를 수득하였다; 지름이 약 25 nm인 입자 및 더욱 작은 입자를 전자 현미경 사진에서 볼 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 부재하에서는 리셈블리가 관찰되지 않았다. 아가로스 전기영동상에 리셈블리 입자를 로딩하므로써 리셈블리된 입자는 핵산을 포함하고 있음이 나타났다. 페놀 추출에 의한 핵산 내용물의 추출, 연속하여 에티디움 브로마이드로 염색된 아가로스 겔을 통해 입자는 리셈블리를 위해 사용되는 올리고뉴클레오티드를 포함하고 있음이 나타났다. 패키징된 올리고뉴클레오티드의 아이덴티티는 입자로부터 추출된 핵산 물질에 대한 사이드로 이 올리고뉴클레오티드 사이드의 샘플을 로딩하여 조절하였다. 리셈블리된 AP205 VLP가 로딩되고 사전에 에티디움 브로마이드로 염색된 아가로스 겔을 연속하여 Coomassie blue로 염색하므로써, 올리고뉴클레오티드 내용물과 입자의 단백질 내용물이 함께 이동하고, 이는 올리고뉴클레오티드가 입자내 패키징되어 있음을 나타낸다. 비처리된 AP205 VLP, yCpG와 함께 리셈블리되고 정제된 상이한 용량의 AP205 VLP 샘플 3개, 비처리된 QB VLP를 겔상에 로딩하였다.

SDS-PAGE 겔상에 리셈블리된 AP205 VLP를 로딩하였을 때 환원제 부재하에서의 이동은 리셈블리된 입자는 처리되지 않은 AP205 VLP의 경우와 같이 디설파이드 브릿지를 형성한다는 것을 나타낸다. 또한, 디설파이드 브릿지 패턴은 처리되지 않은 입자와 동일하다. SDS 겔상에 로딩된 샘플은 단백질 마커, 비처리된 wt Q β , 리셈블리된 wt Q β , 비처리된 AP205 VLP, 리셈블리된 AP205 VLP이다. AP205 VLP 서브유니트의 분자량은 14.0 kDa이고 Q β 서브유니트의 분자량은 14.3 kDa이다(두개의 분자량 모두 N-말단 메티오닌으로 계산되었다)이다.

C. CyCpG와 리셈블리된 AP205 VLPs와 p33 에피토프 (서열: H₂N-KAVYNFATMGGC-COOH, 유리 N- 및 C-말단, (서열번호: 82) 포함)와의 커플링

파트 B에서 기술된 바와 같이 수득된 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4 중 리셈블리된 AP205 VLP를 1.4 mg/ml 농도로 15°C에서 30분동안 DMSO 중 50 mM 스톱로부터 희석된 5배 과량의 가교제 SMPH와 반응시켰다. 수득한 유도화된 AP205 VLP를 적어도 1000배 용량의 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4 완충액에 대하여 2 X 2 시간동안 투석시켰다. 유도화된 AP205를 1 mg/ml 농도로 2시간동안 15°C에서 DMSO 중 20 mM 스톱로부터 희석된 2.5배, 또는 5배 과량의 펩티드와 반응시켰다. 연속하여 저장하기 위하여 액산 질소에서 샘플을 급속 냉동시켰다.

커플링 반응을 SDS-PAGE상에서 분석하였다. 하기 샘플: 단백질 마커; 유도화된 AP205 VLP (d); 2.5배 과량의 펩티드와 커플링된 AP205 VLP, 상등액(s); 2.5배 과량의 펩티드와 커플링된 AP205 VLP, 펠릿(p); 5배 과량의 펩티드와 커플링된 AP205 VLP, 상등액(s); 5배 과량의 펩티드와 커플링된 AP205 VLP, 펠릿(p)을 겔상에 로딩하였다. 커플링 반응 결과 커플링 반응에서 2.5배 과량의 펩티드보다 5배 과량의 펩티드를 사용하여 고도의 커플링을 달성할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

실시예 11

VLPs의 RNA 내용물의 비효소적 가수분해 및 면역자극 핵산의 패키징

VLP의 핵산 내용물의 ZnSO₄ 의존적 분해:

20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl 중 5 mg Q β VLP (Bradford 분석에 의해 측정)을 2000 ml의 50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% 글리세롤, 10 mM MgCl₂ 또는 2000 ml의 4 mM HEPES, pH 7.4, 30 mM NaCl에 대하여 2h 동안 4°C에서 SnakeSkinTM 플레이팅 투석관 (Pierce, Cat. No. 68035)에서 투석시켰다. 각 투석 완충액을 1회 교환하고 추가의 16h 동안 4°C에서 계속 투석시켰다. 투석된 용액을 14 000 rpm에서 10분동안 정화시키고(Eppendorf 5417 R, 고정각 축차 F45-30-11, 하기 단계 모두 사용) Bradford 분석에 의해 단백질 농도를 측정하였다. 50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% 글리세롤, 10 mM MgCl₂ 중 Q β VLPs를 상응하는 완충액을 사용하여 1mg/ml의 최종 단백질 농도로 희석시키고, 4 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl 중 Q β VLPs는 상응하는 완충액을 사용하여 0.5 mg/ml의 최종 단백질 농도로 희석시켰다. 이 캡시드-함유 용액을 14 000 rpm에서 4°C에서 10분동안 다시 원심분리하였다. 이어서 550 rpm에서 Eppendorf Thermomixer 컴포트에서 60°C에서 24시간동안 2.5 mM의 최종 농도로 첨가되는 ZnSO₄와 함께 상등액을 인큐베이션시켰다. 24h 후 14 000 rpm에서 10분동안 용액을 정화시키고 침전물을 버렸다. 핵산의 ZnSO₄-의존적 분해 효능을 아가로스 겔 전기영동에 의해 확인하였다. 2h 동안 4°C에서 상등액을 5000ml의 4 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl에 대하여 투석하였다. 5000 ml의 완충액을 1회 교환하고 밤새도록 4°C에서 계속 투석시켰다. 투석된 용액을 14 000 rpm에서 10분동안 정화시키고 극소량의 침전물을 버리고 Bradford 분석에 의해 상등액의 단백질 농도를 측정하였다. 캡시드의 염화구리/페난트롤린/과산화수소 처리로 유사한 결과를 수득하였다. 본 분야의 기술자는 RNA 또는 가수분해에 대한 다른 비효소적 방법을 알고 있다.

ZnSO₄-처리된 Q β VLPs를 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다: E. coli로부터 정제되고 완충액 1 (50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% 글리세롤, 10mM MgCl₂) 또는 완충액 2 (4 mM HEPES, pH 7.4, 30 mM NaCl)에 대하여 투석된 Q β VLPs를 2.5 mM 황산아연(ZnSO₄)의 존재, 또는 부재하에 24h 동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 이렇게 처리한 후 동량의 지정된 샘플(5 μ g 단백질)을 로딩 염료와 혼합하고 0.8% 아가로스 겔상에 로딩하였다. 이동시킨 후(run) 겔을 에티디움 브로마이드로 염색하였다. ZnSO₄에 의한 VLPs 처리로 핵산 내용물을 분해시킨 반면, 모의-처리된 대조군은 어떤 영향을 받지 않았다.

ZnSO₄-처리된 VLPs내로의 올리고데옥시뉴클레오타이드의 패키징

단백질 농도(Bradford 분석에 의해 측정됨)가 0.4 mg/ml 내지 0.9 mg/ml인 ZnSO₄-처리되고 투석된 Q β 캡시드를 사용하여 올리고데옥시뉴클레오타이드를 패키징하였다. 올리고데옥시뉴클레오타이드를 300배 물 과량으로 QP-VLP 캡시드에 가하고 550 rpm에서 Eppendorf Thermomixer 컴포트에서 3h동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 3시간 후 반응물을 14 000 rpm에서 10분동안 4℃에서 원심분리하였다. MWCO 300'000의 Spectra/Por^RCE DispoDialyzer(Spectrum, Cat. No. 135 526)에서 상등액을 5000ml의 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl에 대하여 8 h동안 4℃에서 투석시켰다. 5000 ml 완충액을 1회 교환하고 밤새도록 4℃에서 계속 투석시켰다. 투석된 샘플의 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. Q β 캡시드 및 그의 핵산 함량을 실시예 7 및 9에 기술된 바와 같이 분석하였다.

ZnSO₄-처리된 VLPs내로의 올리고데옥시뉴클레오타이드의 패키징을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 2.5 mM 황산아연(+ ZnSO₄)로 처리된 Q β VLPs를 4 mM HEPES, pH 7.4, 30 mM NaCl에 대하여 투석시키고 3h동안 37℃에서 과량의 올리고데옥시뉴클레오타이드와 함께 인큐베이션시켰다(투석에 기인하여 ZnSO₄의 농도는 106 차수까지 감소하였고, 이는 괄호안에만 표시함). 올리고데옥시뉴클레오타이드 존재하에 인큐베이션시킨 후 동량의 지정된 샘플(5 μ g 단백질)을 로딩 염료와 혼합하고 0.8% 아가로스 겔상에 로딩하였다. 이동시킨 후(run) 겔을 에티디움 브로마이드로 염색하였다. ZnSO₄에 의한 VLPs 처리로 핵산 내용물을 분해시킨 반면, 모의-처리된대조군은 어떤 영향을 받지 않았다. E. coli로부터 정제된 비처리된 Q β 캡시드와 비교하여 ZnSO₄-처리된 VLPs에 올리고데옥시뉴클레오타이드를 가하여 그렇게 처리된 캡시드의 전기영동 양상을 회복시킬 수 있었다.

ZnSO₄- 및 올리고데옥시뉴클레오타이드 처리된 Q β VLPs의 핵산 함량은 벤조나아제 및 프로테아제 K 분해 및 폴리아크릴아미드 TBE/우레아 겔 전기영동에 의해 분석하였다: 상기 기술한 바와 같이 올리고데옥시뉴클레오타이드를 ZnSO₄-처리된 Q β VLPs내로 패키징시켰다. 제조사의 지시에 따라 25 μ g의 이들 VLPs를 25 μ l 벤조나아제 (Merck, Cat. No. 1.01694.0001)로 분해하였다. 뉴클레아제의 열-불활성화 후(30분 80℃) 제조사의 지시에 따라 VLPs를 프로테아제 K (최종 효소 농도는 0.5 mg/ml)로 처리하였다. 3시간 후 벤조나아제 및 프로테아제 K로 분해된 동등한 2 μ g의 Q β VLPs를 TBE-우레아 샘플 완충액과 혼합시키고 15% 폴리아크릴아미드 TBE-우레아 겔(Novexg, Invitrogen Cat. No. EC6885)상에 로딩하였다. 라인 2에 로딩된 캡시드를 완충액 1 (상기 참조) 존재하에 2.5 mM ZnSO₄로 처리한 반면, 라인 3에 로딩된 캡시드를 완충액 2 (상기 참조) 존재하에 2.5 mM ZnSO₄로 처리하였다. 질적 및 양적 표준으로서 리샘블리 반응을 위해 사용되는 1 pmol, 5 pmol 및 10 pmol의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 동일한 겔(라인 4-6)상에 로딩하였다. 대조군으로서, E. coli로부터 정제된 Q β 캡시드를 동일하게 정확히 처리하고 동일한 폴리아크릴아미드 TBE-우레아 겔 (라인 1)상에서 분석하였다. 모두 이동을 마친 후, 겔을 고정시키고 중성 pH로 평형화시키고 SYBR-Gold (Molecular Probes Cat. No.S-11494)로 염색하였다. 완전한 Q β VLPs(E. coli로부터 정제됨)는 ZnSO₄- 및 올리고데옥시뉴클레오타이드 처리된 Q β 캡시드로부터 추출된 것과 동일한 크기의 핵산을 포함하지 않았다. 추가로, 후자의 VLPs로부터 분리된 핵산은 리샘블리 반응에서 사용된 올리고데옥시뉴클레오타이드와 함께 이동하였다. 이 결과를 통해 사용된 올리고데옥시뉴클레오타이드가 ZnSO₄-처리된 Q β 캡시드내로 패키징되었음이 확인되었다.

실시예 12

VLPs내로 번역자극 핵산의 패키징 후 항원 펩티드의 커플링

RNase A 및 ZnSO₄ 매개된 VLP의 핵산 내용물의 분해

Q β VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4 또는 4 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH 7.4) 조건하에서 실시예 9에 기술된 바와 같이 RNase A로 처리하였다. 유사하게, 실시예 2, 3, 7, 및 10에 기술된 바와 같은 다른 VLPs, 즉, GA, BKV, HBcAg, 및 AP205를 처리한다. 다르게는, Q β VLPs 및 AP205 VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4 또는 4 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH 7.4) 조건하에서 실시예 11에 기술된 바와 같이 ZnSO₄로 처리하였다. 20 mM Hepes pH 7.4 또는 20 mM Hepes, 1 mM Tris, pH 7.4중 AP205 VLP (1 mg/ml)를 50℃에서 48시간동안 2.5 mM ZnSO₄와 함께 Eppendorf Thermomixer 컴포트 550 rpm에서 처리하였다. Q β 및 AP205 VLPs 샘플을 실시예 11에 기술된 바와 같이

정화시키고 상등액을 10.000 MWCO Spectra/Por^R 투석 튜브(Spectrum, cat. nr. 128 118)에서 2h에서 4℃에서 우선 2ℓ 20 mM Hepes, pH 7.4 에 대하여 투석하고 완충액을 교환한 후, 밤새도록 투석하였다. 샘플을 실시예 11에 기술한 바와 같이 투석한 후 정화시키고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다.

Rnase A 및 ZnSO₄ 처리된 VLPs내로의 ISS의 패키징

RNA 가수분해 및 투석 후, Qβ 및 AP205 VLPs (1-1.5 mg/ml)를 1ml의 VLPs당 130μℓ의 CpG 올리고뉴클레오티드 (NKCpG-cf. 표 2; G3-6, G8-8-cf. 표 3; 10 mM Tris pH 8중 1 mM 올리고뉴클레오티드 저장액)을 혼합하였다. 샘플을 3시간동안 37 ℃에서 열진탕기중 650 rpm에서 인큐베이션시켰다. 연속하여 샘플을 2 mM MgCl₂의 존재하에 125 U 벤조나제/ml VLPs (MerckKGaA, Darmstadt, Germany)로 처리하고 투석하기 전 3시간동안 인큐베이션시켰다. 샘플을 300.000 MWCO Spectra/Por^R 투석관(Spectrum, cat. nr. 131 447)에서 2h에서 4℃에서 우선 20 mM Hepes, pH 7.4 에 대하여 투석하고 완충액을 교환한 후, 밤새도록 동일한 완충액에 대하여 투석하였다. 투석 후 샘플을 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화하고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다.

면역원성 펩티드와 ISS 패키징된 VLPs의 커플링

ISS로 패키징된 Qβ VLPs를 C- 말단 GGC 확장 (KAVYNFATM-GGC) (서열번호: 82)를 포함하는 p33 펩티드와 커플링하여 Qβ-ISS-33 VLPs로 명명되는 Qb VLPs를 수득하였다. 20 mM Hepes, pH 7.4 중 패키징된 Qβ VLPs를 10배 물 과량의 SMPH (Pierce)를 사용하여 0.5h동안 25℃에서 유도화시킨 후 2시간동안 4℃에서 20 mM HEPES pH 7.4에 대하여 각각 2개의 투석 단계를 수행하여 비반응 SMPH를 제거하였다. 펩티드를 5배 물 과량으로 투석된 유도화 혼합물에 가하고 25℃에서 2h동안 썬모믹서에서 반응시켰다. 샘플을 300.000 MWCO Spectra/Por^R 투석관에서 2h에서 4℃에서 20 mM Hepes, pH 7.4 에 대하여 투석하고 완충액을 교환한 후, 밤새도록 동일한 완충액에 대하여 투석하였다. 투석 후 샘플을 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화하고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. 2% SDS 및 β-머캅토 에탄올 또는 DTT를 포함하는 샘플 완충액을 사용하여 16% PAGE Tris-글리신 겔(Novex^R (Invitrogen, Cat. No. EC64952)상에서 분석하였다. 1% 아가로스 겔상에서 패키징을 분석하고, 프로테아제 K 분해후 실시예 7에 기술된 바와 같이 TBE/우레아 겔상에서 분석하였다.

상기 기술된 바와 같이 G8-8 올리고뉴클레오티드로 패키징된 AP205 VLPs (1.24 mg/ml)를 유도화하고 N-말단 C 확장 (c GHGHSYTTAE **ELAGIGILTV**) (서열번호: 55)을 포함하는 MelanA 16-35 A/L와 커플링하여 AP205-G8- 8-MelanA VLPs를 수득하였다. 20 mM Hepes pH 7.4중 AP205 VLPs (G8-8로 패키징)를 0.5h동안 25℃에서 0배 물 과량의 SMPH 로 유도화시키고 4℃에서 20 mM HEPES, pH 7.4에 대하여 2회 투석시켜 반응하지 않은 SMPH를 제거하였다. 펩티드를 10배 물 과량으로 투석된 유도화 혼합물에 가하고 25℃에서 2h동안 썬모믹서에서 반응시켰다. 샘플을 10.000 MWCO 투석관에서 2h에서 4℃에서 20 mM Hepes, pH 7.4 에 대하여 투석하고 완충액을 교환한 후, 밤새도록 동일한 완충액에 대하여 투석하였다. 투석 후 샘플을 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화하고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. 펩티드 MelanA 16-35A/L과 AP205의 커플링 효율을 PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. AP205내로 G8-8 올리고뉴클레오티드 패키징을 1% 아가로스 겔상에서 분석하고 프로테아제 K 분해 후, AP205-G8-8-MelanA 16-35 A/L중 G8- 8 올리고뉴클레오티드 양을 실시예 7에 기술된 바와 같이 TBE/우레아 겔상에서 분석하였다.

p33과 커플링하기 하기 전 및 후 NKCpG와 RNaseA 및 ZnSO₄-처리된 Qβ VLPs와의 패키징을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. NKCpG 올리고뉴클레오티드를 포함하고 이어서 p33 펩티드와 커플링된 Qβ VLPs를 Qβ-NKCpG-33 VLPs로 명명하였다. 1 % 아가로스 겔상에서, 에티디움 브로마이드 염색된 겔상에서 가시화된 형광 밴드는 Coomassie Blue 염색된 겔상에서 가시화된 단백질 밴드와 함께 함께 이동하였고 이는 패키징을 입증하였다. 따라서, 패키징시 RNaseA 및 ZnSO₄ 처리된 Qβ VLPs 둘 모두 p33과 커플링하기 하기 전 및 후 NKCpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 16 % PAGE Tris-글리신상에서의 SDS-PAGE 분석 후 가시화된 다중 커플링 산물로부터 판단할 수 있는 바와 같이 펩티드와 반응하지 않는 잔여 Qβ VLP 서브 유닛 모노머보다 더욱 저속으로 이동하는 밴드와 같이 p33 펩티드의 커플링 효율이 유지되었다. 동일한 겔상에 로딩된 올리고뉴클레오티드 표준 시그널과 함께 패키징된 Qβ-NKCpG-33 라인로부터 올리고뉴클레오티드 시그널을 분석하여 TBE/우레아 겔의 분석으로부터 패키징 효율을 추측할 수 있다. NKCPG 패키징 양은 1 내지 4nmol/100μg Qβ-NKCpG-33 VLPs이었다.

Q β VLPs내로 G8-8 올리고뉴클레오타이드를 패킹한 후 p33 펩티드와의 커플링을 아가로스 겔 전기영동에서 분석하였다. G8-8 올리고뉴클레오타이드를 포함한 후 p33 펩티드와 커플링된 Q β VLPs Q β -G8-8-33 VLPs로 명명하였다. 에티디움 브로마이드로 염색된 1 % 아가로스 겔상에서 G8-8 패킹된 Q β VLPs의 에티디움 브로마이드 염색을 볼 수 있다. 에티디움 브로마이드 형광 밴드가 이어서 Coomassie Blue로 염색된 동일한 겔상에 가시화된 Q β VLP 단백질 밴드와 함께 이동하는 것은 패킹을 입증하였다. 16 % PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE 분석에 의해 커플링 효율이 30%인 것으로 예측되었다. 1% 아가로스 겔상에서 Q β -G8-8-33 VLPs의 G8-8 함량 분석을 수행하고, 패킹된 올리고뉴클레오타이드의 양은 대략 1nmol/100 μ g Q β -G8-8-33 VLPs이었다.

AP205내로 G8-8 올리고뉴클레오타이드 패킹을 1% 아가로스 겔상에서 분석하였다. G8-8 패킹된 AP205 VLPs의 염색을 에티디움 브로마이드로 염색된 1 % 아가로스 겔상에서 볼 수 있다. 이후 Coomassie Blue로 염색시키는 동일한 겔상에서 검출된 AP205 VLPs 단백질 밴드의 동시이동은 패킹을 입증하는 것이었다. MelanA 16-35 A/L 펩티드와의 커플링 효율을 16 % PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE 분석에 의해 예측할 수 있다(여기에서 다중 커플링 밴드는 잔여 AP205 VLP 모노머 서브유닛보다 저속으로 이동하고, 펩티드와 반응하지 않는 것은 가시화될 수 있다). 커플링 효율을 Q β -G8-8-33 VLPs에 대하여 수득한 커플링 효율과 비교하였다. MelanA 16-35 A/L과의 커플링 후 AP205 VLPs의 G8-8 올리고뉴클레오타이드 함량 분석은 TBE/우레아 겔 전기영동상에 가시화될 수 있다.

실시에 13

VLPs내로의 번역자극 구아노신 측면에 위치하는 올리고뉴클레오타이드 패킹

실시에 9에서 기술한 바와 같은 낮은 이온 조건(20 mM Hepes pH 7.4)하에서 Qbx33 VLPs(펩티드 p33과 커플링된 Q β VLPs, 참조 실시에 9)를 RNaseA로 처리하여 Qbx33 VLP의 RNA 내용물을 가수분해하였다. 20 mM Hepes pH 7.4에 대하여 투석시킨 후 Qbx33 VLPs를 구아노신 측면에 위치하는 올리고뉴클레오타이드 (표 2: G10-PO, 표 3: G3-6, G7-7, G8-8, G9-9 또는 G6, 10 mM Tris pH 8중 1 mM 올리고뉴클레오타이드 스톱으로부터)와 혼합하고 실시에 12에 기술된 바와 같이 인큐베이션시켰다. 이어서, Qbx33 VLPs를 벤조나아제로 처리하고 300.000 MWCO 관에서 투석시켰다. 올리고 G7-7, G8-8 및 G9-9을 포함하는 샘플을 3일에 걸쳐 4회에 걸쳐 완충액 교환을 하면서 철저히 투석시켜 유리 올리고를 제거하였다. 패킹은 1 % 아가로스 겔에서 분석하고 프로테아제 K 분해 후, TBE/우레아 겔상에서 실시에 7에 기술한 바와 같이 분석하였다.

표 3. 실시에에서 사용되는 번역자극 핵산 서열

ISS 명칭	5'-3' 서열	서열번호
	GACGATCGTC	1
G3-6	GGGGACGATCGTCGGGGGG	2
G4-6	GGGGGACGATCGTCGGGGGG	3
G5-6	GGGGGGACGATCGTCGGGGGG	4
G6-6	GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG	5
G7-7	GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG	6
G8-8	GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG	7
G9-9	GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG	8
G6	GGGGGGCGGACGACGATCGTCGTCGGGGGGGG	9
G10-PO	GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG	41

RNaseA 처리된 Qbx33 VLPs내 G3-6, G6, G8-8 올리고뉴클레오타이드의 패킹은 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 올리고뉴클레오타이드 패킹시 참고의 비처리된 처리된 Q β VLP보다 미세하게 저속으로 이동하는 형광 밴드는 에티디움 브로마이드로 염색된 1 % 아가로스 겔에서 가시화되었고, 이는 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 것이다. 벤조나아제 처리 후에도 시그날을 유지되었고, 이는 Qbx33 VLPs내 올리고뉴클레오타이드의 패킹을 나타내는 것이다. TBE/우레아 겔 전기영동으로부터 패킹 효율을 예측할 수 있다. 패킹된 G3-6 올리고뉴클레오타이드의 양(대략 4 nmol/100 μ g Qbx33 VLPs)은 패킹된 G8-8 올리고뉴클레오타이드의 양(대략 1 nmol/100 μ g Qbx33 VLPs)보다 현저히 많았다. 이는 CpG 모티프 측면에 위치하는 구아노신 뉴클레오타이드 테일의 길이에 의존하는 패킹 능력을 나타내는 것이다.

실시에 14

VLPs내로의 리보핵산 패키징

ZnSO₄ 의존 VLP의 핵산 내용물 분해

Q β VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4 또는 4 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH 7.4) 조건하에서 실시예 11에 기술된 바와 같이 ZnSO₄로 처리하였다. 20 mM Hepes pH 7.4 또는 20 mM Hepes, 1 mM Tris, pH 7.4중 AP205 VLP (1 mg/ml)를 50℃에서 48시간동안 2.5 mM ZnSO₄와 함께 Eppendorf Thermomixer 컴포트 at 550 rpm에서 처리하였다. Q β VLPs 및 AP205 VLPs 샘플을 실시예 11에서와 같이 정화시키고 실시예 12에 기술된 바와 같이 20 mM Hepes, pH 7.4에 대하여 투석하였다.

ZnSO₄-처리된 VLPs내로의 폴리 (I : C)의 패키징:

면역자극 리보핵산 폴리 (I : C), (cat. nr. 27-4732-01, 폴리(I) 폴리 (C), Pharmacia Biotech)를 PBS (Invitrogen cat. nr. 14040) 또는 물에 용해시켜 농도가 4 mg/ml(9 μ M)이 되도록 하였다. 폴리 (I : C)를 10분동안 60℃에서 인큐베이션시키고 37℃로 냉가시켰다. 인큐베이션된 폴리 (I : C)를 10-배 물 과량으로 ZnSO₄-처리된 Q β 또는 AP205 VLPs (1-1.5 mg/ml)에 가하고 혼합물을 3시간동안 37℃에서 씨모믹서에서 650 rpm에서 인큐베이션시켰다. 연속하여, 과량의 유리 폴리 (I : C)를 씨모믹서내 300 rpm으로 3시간동안 37℃에서 2 mM MgCl₂의 존재하에 1ml VLP당 125 U 벤조나제와 인큐베이션시켜 효소적으로 가수분해하였다. 벤조나제 가수분해시 샘플을 14000 rpm에서 원심분리하고 상등액을 300.000 MWCO Spectra/Por^R 투석 튜브(Spectrum, cat. nr. 131 447)에서 2h에서 4℃에서 우선 20 mM Hepes, pH 7.4 에 대하여 투석하고 완충액을 교환한 후, 밤새도록 동일한 완충액에 대하여 투석하였다. 투석 후 샘플을 실시예 11에서와 같이 정화시키고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다.

면역원성 펩티드와 폴리(I: C) 패키징된 VLPs의 커플링

폴리(I: C)로 패키징된 Q β VLPs(1 mg/ml)를 유도화시키고 실시예 12에 기술된 바와 같이 p33 펩티드 (KAVYNFATM-GGC) (서열번호: 82), 또는 MelanA 펩티드 (MelanA 16-35A/L CGHGHSTTTAEELAGIGILTV) (서열번호: 55)와 커플링시켜 각각 Q β -pIC-33 및 Q β -pIC-MelanA VLPs를 수득하였다. MelanA 펩티드와 커플링시키기 위하여 패키징된 Q β VLP를 0.5h동안 25℃에서 2.1배 물 과량의 SMPH (Pierce)로 유도화시킨 후 4℃에서 20 mM HEPES, pH 7.4에 대하여 2개의 투석 단계를 수행하고 반응하지 않은 SMPH를 제거하였다. 펩티드를 2.1배 물 과량에 추가하고 25℃에서 씨모믹서에서 1.5h동안 반응시켰다. 3 h동안 4℃에서 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 300.000 MWCO Spectra/Por^R CE Dispo Dialyzer에서 샘플을 투석시키고 완충액을 교환한 후 밤새도록 동일한 완충액에 대하여 투석시켰다. 투석후 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화시키고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. 펩티드 p33 및 펩티드 MelanA와 Q β 의 커플링은 16% PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 1% 아가로스 겔상에서 패키징을 분석하고, 실시예 7에 기술된 바와 같이 프로테아제 K 분해후, TBE/우레아 겔상에서 분석하였다.

Q β -pIC-MelanA VLPs를 수득시키는 ZnSO₄ 처리된 Q β VLP내로의 폴리(I: C)의 패키징 및 MelanA 펩티드와 커플링을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 핵산의 존재를 나타내는, 에티디움 브로마이드로 염색된 1 % 아가로스 겔상에서 가시화된 형광 시그널은 겔의 Coomassie Blue 염색시 가시화되는 단백질과 함께 이동을 하고, 이는 패키징을 입증하는 것이다. MelanA 펩티드의 커플링 효율은 16 % PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE 분석에 의해 예측하였다. 펩티드와 반응하지 않는 Q β VLP 모노머 서브유닛보다 저속으로 이동하는 밴드와 같이 다중 커플링 산물은 가시화되었다. MelanA의 커플링 효율은 비록 미세하기 낮기는 하지만, Q β -G8-8-33 VLPs (실시예 12)에 대하여 수득된 커플링 효율과 전반적으로 유사하였다. Q β -pIC-MelanA로의 패키징 효율은 TBE/우레아 겔로부터 예측할 수 있고; Q β 내 폴리(I: C)의 패키징된 양은 대략 25 pmol이고, MelanA 커플링시 동일하게 유지되었다.

폴리(I: C)로 패키징된 AP205 VLPs (1 mg/ml)를 유도화하고 N-말단 C 확장(cGHGHSTTTAE ELAGIGILTV) (서열번호: 55)을 포함하는 MelanA 16-35 A/L과 커플링시켜 AP205-G8-8-MelanA VLPs를 수득하였다. 20 mM Hepes, pH 7.4에서 AP205 VLPs를 25℃에서 0.5h동안 20배 물 과량의 SMPH로 유도화한 후 4℃에서 20 mM HEPES, pH 7.4에 대하여 2개의 투석 단계를 수행하고 반응하지 않은 SMPH를 제거하였다. 펩티드를 10배 물 과량으로 투석시킨 유도화 혼합물

에 가하고 25℃에서 썬모믹서에서 2h동안 반응시켰다. 2 h동안 4℃에서 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 10.000 MWCO 투석관에서 샘플을 투석시키고 완충액을 교환한 후 밤새도록 동일한 완충액에 대하여 투석시켰다. 투석후 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화시키고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. 펩티드 MelanA 16-35 A/L과 AP205의 커플링 효율을 PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 폴리 (I: C) 패키징은 1% 아가로스 겔상에서 분석하고, 실시예 7에 기술된 바와 같이 프로테아제 K 분해후, TBE/우레아 겔상에서 분석하였다.

ZnSO₄ 처리된 Qβ VLP내로의 폴리(I: C)의 패키징 및 MelanA와의 커플링 후 커플링 산물 AP205-pIC-MelanA는 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. MelanA 펩티드의 커플링 효율은 16 % PAGE Tris-글리신 겔상에서 SDS-PAGE 분석 후 펩티드와 반응하지 않는 Qβ VLP 모노머 서브유닛보다 저속으로 이동하는 밴드와 같은 다중 커플링 산물의 겔보기로 부터 예측한다. 패키징 효율은 TBE 겔로부터 예측할 수 있다.

실시예 15

HBcAg VLPs내로의 번역자극 구아노신 측면에 위치하는 올리고뉴클레오타이드의 패키징

실시예 9에 기술된 바와 같이 HBcAg VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4) 조건하에서 RNase A로 처리하여 VLP의 RNA 내용물을 가수분해하였다. 20 mM Hepes pH 7.4에 대하여 투석시킨 후 VLPs를 구아노신 측면에 위치하는 올리고뉴클레오타이드 (표 3: G3-6, G7-7, G8-8, G9-9 또는 G6, 10 mM Tris pH 8중 1 mM 올리고뉴클레오타이드 저장액 으로부터)와 혼합하고 실시예 12에 기술된 바와 같이 인큐베이션시켰다. 연속하여, VLPs를 벤조나제로 처리하고 300.000 MWCO 튜브에서 투석하였다. 패키징을 1% 아라고스 겔상에서 확인하고, 단백질 분해 효소 K 분해 후 TBE/우레아 상에서 분석하였다.

실시예 16

GA VLPs내로의 번역자극 구아노신 측면에 위치하는 올리고뉴클레오타이드의 패키징

실시예 9에 기술된 바와 같이 GA VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4) 조건하에서 RNase A로 처리하여 VLP의 RNA 내용물을 가수분해하였다. 20 mM Hepes pH 7.4에 대하여 투석시킨 후 VLPs를 구아노신 측면에 위치하는 올리고뉴클레오타이드 (표 3: G3-6, G7-7, G8-8, G9-9 또는 G6, 10 mM Tris pH 8중 1 mM 올리고뉴클레오타이드 저장액 으로부터)와 혼합하고 실시예 12에 기술된 바와 같이 인큐베이션시켰다. 연속하여, VLPs를 벤조나제로 처리하고 300.000 MWCO 튜브에서 투석하였다. 패키징을 1% 아라고스 겔상에서 확인하고, 단백질 분해 효소 K 분해 후 TBE/우레아 상에서 분석하였다.

실시예 17

HBcAg VLPs내로의 리보핵산 패키징

HBcAg VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4 또는 4 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH 7.4) 조건하에서 실시예 11에 기술된 바와 같이 ZnSO₄로 처리하고 실시예 12에 기술된 바와 같이 20 mM Hepes pH 7.4에 대하여 투석시켰다. 폴리 (I: C)를 10-배 물 과량으로 HBcAg VLPs (1-1.5 mg/ml)에 가하고 실시예 14에 기술된 바와 같이 혼합물을 3시간동안 37℃에서 썬모믹서에서 650 rpm에서 인큐베이션시켰다. 연속하여, 과량의 유리 폴리 (I: C)를 썬모믹서내 300 rpm으로 3 시간동안 37℃에서 2 mM MgCl₂의 존재하에 1ml VLP당 125 U 벤조나제와 인큐베이션시켜 효소적으로 가수분해하였다. 실시예 11에 기술된 바와 같이 벤조나제 가수분해후 샘플을 정화시키고 실시예 14에 기술된 바와 같이 투석시켰다. 투석 후 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화시키고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. 폴리 (I: C)로 패키징된 HBcAg VLPs(1 mg/ml)를 유도화하고 MelanA와 커플링하고 실시예 14에 기술된 바와 같이 투석시켰다.

실시예 18

GA VLPs내로의 리보핵산 패키징

GA VLPs를 낮은 이온 강도(20 mM Hepes pH 7.4 또는 4 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH 7.4) 조건하에서 실시예 11에 기술된 바와 같이 ZnSO₄로 처리하고 실시예 12에 기술된 바와 같이 20 mM Hepes pH 7.4에 대하여 투석시켰다. 폴리 (I:

C)를 10-배 물 과량으로 GA VLPs (1-1.5 mg/ml)에 가하고 실시예 14에 기술된 바와 같이 혼합물을 3시간동안 37℃에서 써모믹서에서 650 rpm에서 인큐베이션시켰다. 연속하여, 과량의 유리 폴리 (I: C)를 써모믹서내 300 rpm으로 3시간동안 37℃에서 2 mM MgCl₂의 존재하에 1ml VLP당 125 U 벤조나제와 인큐베이션시켜 효소적으로 가수분해하였다. 실시예 11에 기술된 바와 같이 벤조나제 가수분해후 샘플을 정화시키고 실시예 14에 기술된 바와 같이 투석시켰다. 투석 후 실시예 11에 기술된 바와 같이 샘플을 정화시키고 상등액중 단백질 농도를 Bradford 분석에 의해 측정하였다. 폴리(I: C)로 패킹된 GA VLPs(1 mg/ml)를 유도화하고 MelanA와 커플링하고 실시예 14에 기술된 바와 같이 투석시켰다.

실시예 19

올리고뉴클레오타이드의 Q β 디셈블리 리셈블리 및 패킹

Q β VLP의 디셈블리 및 리셈블리

디셈블리: PBS (20 mM 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.5)중 45 mg Q β VLP (Bradford 분석에 의해 측정)를 교반 조건하에 RT에서 15분동안 100mM DDT로 환원시켰다. 교반 조건하에 RT에서 15분동안 2차로 인큐베이션시킨 후 염화마그네슘을 최종 농도 700 mM로 가하여 RNA를 침전시켰다. 용액을 10분동안 4000 rpm으로 4℃에서(Eppendorf 5810 R, 고정각 원통 A-4-62, 이후 모든 단계에서 사용)) 원심분리하여 펠릿중 침전된 RNA를 분리하였다. 상등액중 디셈블리된 Q β 코트 단백질 다imer를 크로마토그래피 정제 단계에 직접 사용하였다.

양이온 교환 크로마토그래피 및 크기배제 크로마토그래피에 의한 디셈블리된 Q β 코트 단백질의 2단계 정제 방법: 디셈블리된 코트 단백질 및 잔여 RNA를 포함하는 디셈블리된 반응의 상등액을 SP-Sepharose FF 칼럼(xk16/20, 6ml; Amersham pharmacia biotech)상에 적용시켰다. 5ml/분의 유속으로 RT에서 이동(Run)시키면서 260nm 및 280nm 흡광도에서 조사하였다. 칼럼을 20mM 인산나트륨 완충액 pH 7, 150 mM NaCl으로 평형화시켰다; 샘플을 물중 1: 15로 희석시켜 10mS/cm 이하의 전도도로 조절하여 칼럼에 코트 단백질이 적절하게 결합할 수 있도록 하였다. 결합 코트 단백질의 용출은 20mM 인산나트륨 내지 500mM 염화나트륨의 단계적 구배로 수행하고 대략 25ml의 분획 용량으로 단백질을 수거하였다. 칼럼은 0.5M NaOH로 재생시켰다.

투석에 의한 리셈블리: 2 mg/ml 농도의 정제된 Q β 코트 단백질 다imer의 저장액을 올리고데옥시뉴클레오타이드 G8-8 또는 G10-PO의 존재하에 Q β VLP의 리셈블리를 위해 사용하였다. 리셈블리 혼합물중 올리고데옥시뉴클레오타이드 농도는 10 μ M이었다. 리셈블리 혼합물중 코트 단백질 다imer의 농도는 40 μ M(대략 1.13mg/ml)이었다. 우레아 및 DTT 저장액을 용액에 가하여 최종 농도가 1M 우레아 및 5mM의 DTT가 되도록 하였다. 최종 성분으로서 올리고데옥시뉴클레오타이드를 H₂O와 함께 가하여 리셈블리 반응의 최종 부피는 3ml이 되도록 하였다. 이 용액을 72 h동안 4℃에서 20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0을 포함하는 1500 ml 완충액에 대하여 투석하였다. 투석된 리셈블리 혼합물을 14 000 rpm에서 10 분동안 4℃에서 원심분리하였다. 극소량의 침전물을 버리고, 상등액은 리셈블리되고 패킹된 VLPs를 포함하였다. 리셈블리되고 패킹된 VLPs를 원심식 필터 장치(Millipore, UFV4BCC25, 5K NMWL)로 농축시켜 최종 단백질 농도를 3 mg/ml 이 되도록 하였다. 단백질 농도는 Bradford 분석에 의해 측정하였다.

크기 배제에 의한 리셈블리되고 패킹된 VLPs의 정제:

총 10mg 이하의 단백질을 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4로 평형화된 Sepharose CL-4B 칼럼(xk16/70, Amersham Biosciences)상에 로딩하였다. 0.4 ml/분의 유속으로 실온에서 크로마토그래피를 수행하였다. 260 nm 및 280nm에서의 흡광도를 조사하였다. 2개의 피크가 관찰되었고, 0.5ml 크기의 분획에서 수거하고 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 리셈블리되고 정제된 Q β 캡시드내 디설파이드-결합 패권을 비환원 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 5 μ g의 지정된 캡시드 샘플을 환원제를 포함하지 않는 완충액(SDS 포함)과 혼합시키고 16% Tris-글리신 겔상에 로딩시켰다. 모두 이동을 마친 후 겔을 Coomassie blue로 염색시켰다. E. coli로부터 정제된 "완전(intact)" 캡시드와 비교할 때 리셈블리된 Q β VLP는 Q β 코트 단백질의 다imer, 트리머, 테트라머, 펜타머, 및 헥사머에 상응하는 밴드와 동일한 디설파이드 결합 패턴을 나타내었다. E. coli로부터 고도로 정제되고 완전한 Q β 캡시드의 칼럼 보정을 통해 주요 제 1 피크의 겔보기 분자량이 Q β 캡시드와 일치하는 것이 밝혀졌다.

여과(diafiltration)에 의한 리셈블리 (최상의 방법): 20ml의 정제된 코트 단백질 저장액(1.5 mg/ml)을 우레아, DTT, 올리고데옥시뉴클레오타이드 G10-PO 및 물 저장액과 혼합하였다. 최종 성분으로서 올리고데옥시뉴클레오타이드를 가하였다. 혼합물의 용량은 30ml이고 성분의 최종 농도는 35 μ M 다imer 코트 단백질 (1 mg/ml 반영), 35 μ M 올리고데옥시뉴클레오타이드, 1M 우레아 및 2.5 mM DTT이다. Pellicon XL 막 카트리지 (Biomax5K, Millipore)를 사용하여 RT에서 접선 흐름 여

과 기기에서 300ml의 20 mM 인산나트륨/250 mM 염화나트륨, pH 7.2에 대하여 혼합물을 여과시켰다. 전체 유속을 10ml/분으로 세팅하고 투과 유속은 2.5ml/분으로 세팅하였다. 여과 단계 종결 후 H₂O₂를 용액에 가하여 최종 농도는 7mM으로 하고 용액을 추가로 60분동안 RT에서 인큐베이션시켜 형성된 VLPs내 구조적 디설파이드 형성을 가속화시켰다. Pellicon XL 막 카트리지 (PLCMK 300K, Millipore)를 사용하여 600ml의 20 mM 인산나트륨/250 mM 염화나트륨, pH 7.2에 대하여 2차 여과하여 혼입되지 않은 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 코트 단백질을 제거하였다.

올리고데옥시뉴클레오타이드 존재하에 리셈블리된 Q β VLPs의 분석:

A) A) 리셈블리된 캡시드의 유체역학적 크기: 올리고데옥시뉴클레오타이드 G8-8의 존재하에 리셈블리된 Q β 캡시드를 동적광산란(DLS)에 의해 분석하고 E. coli.로부터 정제된 완전한 Q β VLPs와 비교하였다. 리셈블리된 캡시드는 완전한 Q β VLPs와 유사한 유체역학적 크기(질량 및 구조에 의존)를 나타내었다.

B) 리셈블리된 캡시드에서 디설파이드 결합 형성: 리셈블리된 Q β VLPs를 비-환원성 SDS-PAGE에 의해 분석하고 E. coli.로부터 정제된 완전한 Q β VLPs와 비교하였다. 리셈블리된 캡시드는 완전한 Q β VLPs와 동일하게 펜타머 및 헥사머가 존재하는 디설파이드 결합 패턴을 나타내었다(상기와 기술한 바와 동일).

C) 변성 폴리아크릴아미드에 의한 올리고데옥시뉴클레오타이드의 존재하에 리셈블리된 Q β VLPs의 핵산 내용물 분석: G8-8 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리셈블리된 Q β VLPs(0.4mg/ml)를 2 mM MgCl₂의 존재하에 1ml의 Q β VLPs당 125U의 벤조나제로 2시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 연속하여 벤조나제 처리된 Q β VLPs를 단백질 분해 효소 K (PCR-grade, Roche Molecular Biochemicals, cat. No. 1964364) 실시예 7에 기술된 바와 같이 처리하였다. 반응물을 TBE-우레아 샘플 완충액과 혼합하고 15% 폴리아크릴아미드 TBE-우레아 겔(Novex Invitrogen cat. No. EC6885)상에 로딩하였다. 질적 및 양적 기준으로서 리셈블리 반응에서 사용된 1 pmol, 5pmol, 및 10 pmol의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 동일한 겔상에서 로딩하였다. 이 겔을 10% 아세트산, 20% 메탄올로 고정시키고, 중성 pH로 평형화시키고 SYBR^R Gold (Molecular Probes cat. No. S-11494)로 염색하였다. SYBR^R Gold 염색은 리셈블리된 Q β 캡시드가 리셈블리 반응에서 사용된 올리고데옥시뉴클레오타이드와 함께 이동하는 핵산을 포함하고 있음을 나타내었다. 동시에, 올리고데옥시뉴클레오타이드의 존재하에 리셈블리된 Q β VLPs의 핵산 내용물의 벤조나제 분해에 대한 내성 및 단백질 분해 효소 K 분해에 의해 정제된 입자로부터의 올리고데옥시뉴클레오타이드의 분리를 통해 올리고데옥시뉴클레오타이드의 패키징이 입증되었다.

실시예 20

MelanA 악성흑색종 항원으로부터 유래된 펩티드와 Q β 의 커플링

표 4. 하기 MelanA 펩티드 부위를 화학적으로 합성하였다:

약어*	서열**	서열번호
	ELAGIGILTV	50
	GHGHSYTTAE ELAGIGILTV	51
	SYTTAEELAGIGILTV ILGVL	52
	ELAGIGILTVILGVL	53
MelanA 16-35	c GHGHSYTTAE EAAGIGILTV	54
MelanA 16-35 A/L	c GHGHSYTTAE ELAGIGILTV	55
MelanA 26-35	cgg EAAGIGILTV	56
MelanA 26-35 A/L	cgg ELAGIGILTV	57
MelanA 20-40 A/L	c SYTTAEELAGIGILTV ILGVL	58
MelanA 26-40 A/L	cgg ELAGIGILTVILGVL	59
MelanA 26-35-C A/L	ELAGIGILTV ggc	60
CSPKSL-MelanA 26-35 A/L	CSPKSLELAGIGILTV	92
MelanA 26-40-C A/L	ELAGIGILTVILGVLGGC	93

* A/L은 야생형 MelanA 펩티드와 비교하여 알라닌의 리신으로의 교환을 나타낸다.

** 링커 서열로부터의 아미노산을 소문자로 나타낸다.

하기 방법을 사용하여 MelanA 펩티드 부위를 Q β VLPs에 커플링시켰다:

펩티드 MelanA 16-35, MelanA 16-35 A/L 및 MelanA 26-35-C A/L의 경우: 20 mM Hepes, pH 7.2중 2ml의 3.06 mg/ml Q β VLP 용액을 진동 진탕기에서 30분동안 25°C에서 18.4 μ l의 DMSO중 50 mM SMPH(숙신이미딜-6- (β-말레이미도프로피오노아미도 헥사노에이트, Pierce) 용액과 반응시켰다. 이어서 반응 용액을 4°C에서 2시간동안 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2회에 걸쳐 투석시켰다. 2ml의 투석된 반응 혼합물을 진동 진탕기에서 2시간동안 25°C에서 18.4 μ l의 50 mM 펩티드 저장액(DMSO중)과 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 4°C에서 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2x 2 시간동안 투석시켰다. 커플링된 산물을 Q β -MelanA 16-35 (서열번호: 54), Q β -MelanA 16-35 A/L (서열번호: 55) 및 Q β -MelanA 26-35-C A/L (서열번호: 60)로 명명하였다. MelanA 26-35의 경우 20 mM Hepes, pH 7.2중 2ml의 3.06 mg/ml Q β 캡시드 단백질을 진동 진탕기에서 30분동안 25°C에서 75.3 μ l의 DMSO중 50 mM SMPH 용액과 반응시켰다. 이어서 반응 용액을 4°C에서 2시간동안 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2회에 걸쳐 투석시켰다. 2ml의 투석된 반응 혼합물을 진동 진탕기에서 4시간동안 25°C에서 37.7 μ l의 50 mM 펩티드 저장액(DMSO중)과 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 4°C에서 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2x 2 시간동안 투석시켰다. 커플링된 산물을 Q β -MelanA 26-35로 명명하였다.

MelanA 26-35 A/L (서열번호: 57)의 경우 20 mM Hepes, pH 7.2중 2ml의 3.06 mg/ml Q β VLPs 용액을 진동 진탕기에서 30분동안 25°C에서 37.7 μ l의 DMSO중 50 mM SMPH 용액과 반응시켰다. 이어서 반응 용액을 반응 용액을 4°C에서 2 시간동안 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2회에 걸쳐 투석시켰다. 2ml의 투석된 반응 혼합물을 진동 진탕기에서 4 시간동안 25°C에서 18.4 μ l의 50 mM 펩티드 저장액(DMSO중)과 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 4°C에서 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2x 2 시간동안 투석시켰다. 커플링된 산물을 Q β -MelanA 26-35 A/L로 명명하였다.

MelanA 20-40 A/L (서열번호: 58): 20 mM Hepes, pH 7.2중 2ml의 3.06 mg/ml Q β VLPs 용액을 진동 진탕기에서 30 분동안 25°C에서 18.4 μ l의 DMSO중 50 mM SMPH 용액과 반응시켰다. 이어서 반응 용액을 반응 용액을 4°C에서 2시간 동안 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2회에 걸쳐 투석시켰다. 2ml의 투석된 반응 혼합물을 진동 진탕기에서 4시간 동안 25°C에서 18.4 μ l의 50 mM 펩티드 저장액(DMSO중)과 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 4°C에서 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2x 2 시간동안 투석시켰다. 커플링된 산물을 Q β -MelanA 20-40 A/L로 명명하였다.

MelanA 26-40 A/L (서열번호: 59)의 경우: 20 mM Hepes, pH 7.2중 2ml의 3.06 mg/ml Q β VLPs 용액을 진동 진탕기에서 30분동안 25°C에서 37.7 μ l의 DMSO중 50 mM SMPH 용액과 반응시켰다. 이어서 반응 용액을 반응 용액을 4°C에서 2시간동안 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2회에 걸쳐 투석시켰다. 2ml의 투석된 반응 혼합물을 진동 진탕기에서 4시간동안 25°C에서 18.4 μ l의 50 mM 펩티드 저장액(DMSO중)과 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 4°C에서 2 l의 20 mM Hepes, pH 7.2에 대하여 2x 2 시간동안 투석시켰다. 커플링된 산물을 Q β -MelanA 26-40 A/L로 명명하였다.

SDS-PAGE 분석에 의해 커플링 효율을 조사하였다. 도 1은 Q β -MelanA VLPs의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

MelanA-펩티드는 Q β VLPs와 커플링하였다. 최종 산물을 샘플 완충액과 혼합하고 125 V에서 1.5시간동안

16 %Novex^R 트리스-글리신 겔상에서 환원조건하에 분리시켰다. Coomassie 블루 용액에 겔을 침지시켜 분리된 단백질을 염색하였다. 50 % 메탄올, 8% 아세트산으로 겔을 세척하여 배경 염색을 제거하였다. 분자량 마커 (P 77085, New England BioLabs, Beverly, USA)를 Q β -MelanA 이동 속도(라인 1)에 대한 참고용으로서 사용하였다. 14 μ g의 Q β 만(라인 2) 또는 SMPH로 유도화된 Q β (라인 3)를 로딩하고 최종 산물: Q β -MelanA 16-35 (라인 4), Q β -MelanA 16-35 A/L (라인 5), Q β -MelanA 26-35 (라인 6) 및 Q β - MelanA 26-35 A/L (라인7)와 비교하였다.

MelanA 16-35 A/L 펩티드는 세포 독성 T 림프구 (CTL) 에피토프 MelanA 26-35를 포함하였고, Q β -MelanA 16-35 A/L에 대하여 시험관내 및 생체내에서 그의 면역원성에 대하여 추가로 연구하였다.

실시예 21

Q β MelanA 16-35 A/L VLPs를 가지세포에 의해 프로세싱하고 시험관내에서 T 세포에 제시하였다.

시험관내에서의 MelanA-특이 T 세포 제조

Q β -MelanA 16-35 A/L 백신의 면역원성을 평가하기 위하여 시험관내에서MelanA-특이 T 세포를 제조하였다. HLA-A2 건강한 지원자로부터의 미성숙한 단핵구-유도된 가지세포 (DC)를 상기 기술한 바(Salusto, F. et al. 1994, J. Exp. Med. 179: 1109)와 같이 제조하였다. DC(0.5x10⁶/웰)을 모의로 또는 0 μ g/ml Q β -MelanA 16-35 A/L 을 사용하여 2h동

안 37°C에서 펄싱하였다. MelanA- 특이 CTL 전구체의 빈도를 증가시키기 위하여 자기 분리기(magnetic 분류)(Miltenyi Biotect)에 의해 PBMC로부터 자가 CD8 T 세포를 분리시켰다. 1×10^6 /웰 CD8 T 세포를 항원-펄싱된 DC에 가하였다. 10 U/ml의 농도로 3일째 세포 배양액에 IL- 2를 보충하고 12일까지 50 U/ml이하로 증가시켰다.

앞서 기술된 바와 같이(Romero, P. et all, 1998, J. Exp. Med. 1998,188 : 1641) MelanA 26-35 펩티드 (HLA-A2-MelanA-PE)와 함께 로딩된 HLA-A2로 제조된 피코에트린 (PE)-표지된 테트라머로 염색하여 세포주내 MelanA-특이 CD8 T 세포의 확장을 평가하였다. 1시간동안 실온에서 세포를 HLA-A2-MelanA 26-35-PE로 표지한 후 항-CD8-FITC 항체(BD PharMingen, San Jose, USA)를 얼음에서 30분간 가하였다. 세척한 후, 세포를 세포 Quest 소프트웨어를 사용하여 FACS Calibur상에서 분석하였다. 세포를 전향 스캐터 산란 및 측면 산란에서 수득하고 림프구를 게이트로 제어하였다(gate). 이 림프구 군집으로부터 CD8 양성 T 세포만을 추가의 분석을 위해 선별하였다. MelanA-특이 CD8+ T 세포의 양을 CD8+ 림프구중 HLA-A2-MelanA 양성 세포 퍼센트로서 산출하였다. Q β -MelanA 16-35 A/L 백신은 MelanA 26-35 A/L-특이 CTL의 증식을 유도하였고(CD8 T 세포의 9.7%) 이는 백신이 효과적으로 처리되고 CTL 에피토프 (MelanA 26-35 A/L)로 프로세싱되고 인간 DC를 T 세포에 제시한다는 것을 입증하는 것이다.

FACS 분류 (FACSVanTage, Becton Dickenson)에 의해 MelanA CTL를 농축시키고 (Knuth, A. 1989, PNAS, 86: 2804)에 앞서 기술된 바와 같이 제한 희석에 의해 배양하였다. HLA-A2-MelanA-PE 테트라머로 염색된 양성에 대하여 CTL 클론을 선별하였다. 피토헤마글루티닌(phytohaemagglutinin)-활성화된 이중 조사된 PBMC에 의해 CTL를 주조직적으로 다시 예측하였다.

CTL 클론에 의한 항원 인식 평가

MelanA CTL 클론의 작용 활성을 분석하기 위하여 51 Cr 유리 에세이를 수행하였다. APC를 1.5h동안 10-6M MelanA 26-35 A/L 펩티드와 함께 또는 음성 대조군으로서 10-6M 인플루엔자 MI 펩티드와 인큐베이션시켰다. APC를 Cr 51 과 함께 인큐베이션시켜 펩티드 펄싱 시간에 방사능뉴클레오타이드의 비특이적 흡수를 측정하였다. 철저히 세척하여 잔여 항원 및 방사능을 제거한 후 10^4 /웰 APC를 5h동안 다양한 갯수의 MelanA-특이 T 세포와 함께 인큐베이션시켰다. 상등액을 수거하고 MelanA-특이 T 세포에 의한 MelanA-제시 APC의 특이적 분해율을 하기 식에 따라 산출하였다:

특이적 분해율(%) = ((실험상의 cpm - 야생형의 cpm) / (최대 cpm - 야생형의 cpm))x 100(여기에서, 실험상의 cpm는 실험용 샘플에서 측정된 방사능 계수이고, 야생형의 cpm는 T 세포를 가하지 않고 51 Cr로 펄싱된 APC로부터 수득한 계수이고, 최대 cpm는 1% NP-40로 분해된 51 Cr로 펄싱된 APC로부터 수득한 계수이다).

관련없는 MI 펩티드를 제외하고 MelanA 26-35 A/L와 함께 로딩된 APC는 CTL에 의해 효율적으로 분해되었고(특이적 분해 70-85%) 이로써, CTL 클론의 항원 특이성이 확인되었다.

실시에 22

시험관내에서의 인간 세포를 활성화시키는 면역자극 서열(ISS)의 능력

Q β -MelanA 백신에 로딩되는 최적의 ISS를 선별하기 위하여 인간 CD8 T 세포상의 CD69를 상향조절하는 그의 능력 및 인간 PBMC에서 IFN 알파 및 IL-12의 분비 유도에 대한 그의 능력에 대하여 상이한 갯수의 측면에 위치하는 Gs 또는 더블 스트랜드 RNA, 예로서, 폴리(I: C)를 갖는 일련의 CpG를 시험하였다.

인간 PBMC를 백혈구연층로부터 분리하고 18h동안 10% FCS를 포함하는 RPMI 배지내 지정된 ISS로 처리하였다. 상등액 중 IFN 알파를 PBL Biomedical Laboratories로부터 제공받는 항체 세트를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 마우스 항-인간 CD8-FITC, 마우스 항-인간 CD19-PE 및 항-인간 CD69-APC로 PBMC를 염색하고 흐름세포측정에 의해 분석하였다. IFN 알파 분비 유도시 G10-PO가 가장 활성적이었다(도 2A). G9-9 및 G8-8은 고도한 수준으로 IFN 알파 분비를 유도하였지만, G10- PO보다는 다소 덜 활성적이었다. 다른 올리고뉴클레오타이드에서 측면에 위치하는 Gs의 수를 감소 시킴으로써 IFN 알파 분비를 저하시켰다. PBMC로부터의 폴리(I: C) -처리된 T 및 B 세포는 CD69를 상향조절하였지만 폴리 (I: C)-처리된 PBMC는 어떤 IFN 알파도 방출시키지 못했다(도 2B). 폴리(I: C)는 또한 PBMC로부터의 IL-12 분비 및 단핵구-유도 DC를 유도하였다.

G10-PO, G9-9 및 G8-8로 PBMC를 처리하였을 때 CD8 T 세포의 세포막상의 CD69는 상향조절되어 거의 유사하게 확장되었다. 다른 올리고뉴클레오티드에서 측면에 위치하는 Gs의 수를 감소(7 미만)시킴으로써 IFN 알파 분비(도 2 A)를 유도하는 활성 및 T 세포상의 CD69 상향조절(도 2B) 활성을 저하시켰다. 이들 데이터를 통해 G10-PO, G9-9 및 G8-8은 인간 세포에 대하여 유사한 고도의 활성을 갖고, 따라서, Q β -MelanA 백신에서 ISS로서 사용될 수 있음이 입증되었다.

실시예 23

MelanA-특이 T 세포의 시험관내 확장은 G10-PO에 의해 증가된다.

MelanA 특이 CTL의 시험관내 증식을 유도하는 Q β -MelanA VLPs의 능력을 G10-PO의 존재 또는 부재하에 시험하였다. 미성숙한 인간 단핵구-유도 DC(0.5×10^6 /웰)을 실시예 21에서와 같이 Q β -MelanA 16-35 A/L 또는 MelanA 26-35 A/L 펩티드, 또는 모의로 펄싱하였다. 인간 단핵구-유도 DC는 톨-양 수용체-9 (TLR-9) -음성이고, 따라서, CpG에 대항 반응하지 못한다. B 세포 및 인간 PBMC에 존재하는 형질세포모양(plasmacytoid) DC는 TLR-9 양성이고 사이토카인(IFN 알파, IL-12)로 처리된 CpG에 반응한다. 단핵구-유도 DC의 항원-제시 능력에 대한 G10-PO의 기능을 조사하기 위하여 항원-펄싱 DC를 세척하고 2h동안 2 μ M G10-PO의 존재 또는 부재하에 1×10^6 자가 PBMC와 함께 인큐베이션시켰다. 자기 분류에 의해 분리된 자가 CD8 T 세포 (1×10^6)를 APC에 가하고 실시예 21에 기술된 바와 같은 세포 배양 조건을 사용하여 12일동안 인큐베이션시켰다. HLA-A2-MelanA-PE 테트라머 염색 및 흐름세포측정 분석에 의해 MelanA-특이 CTL를 검출하였다. G10-PO를 Q β -MelanA-펄싱된 DC에 가하여 특이 CTL 빈도를 증가시키고(10%으로부터 14%), 이는 CpG 자극으로부터 생성된 사이토카인 환경(cytokine milieu)이 시험관내에서의 CTL 확장에 더욱 바람직하다는 것을 나타낸다.

실시예 24

G3-6, G6, G10-PO 또는 폴리(I: C)와 함께 로딩된 Qbx33 VLPs는 p33-재조합 백시나 바이러스 시험감염에 대한 보호를 유도한다

Qbx33 단독으로, 또는 G3-6 또는 G6 또는 폴리(I: C)와 함께 로딩된 Qbx33를 사용하여 B6 마우스를 피하주사하여 면역화시켰다(참조 실시예 12 및 14). 8일후, 마우스에 LCMV-p33 항원을 발현시키는 1.5×10^6 pfu의 재조합 백시나 바이러스로 시험감염시켰다. 4일 후 마우스를 희생시키고 난소내 바이러스 역가를 앞서 기술된 바와 같이 측정하였다 (Bachmann et al, Eur. J.Immunol. 1994,24 : 2228). 도 3에 도시한 바와 같이 G3-6 또는 G6 또는 폴리(I: C)와 함께 로딩된 Qbx33를 투여받은 마우스는 바이러스 시험감염으로부터 보호되었다. 반대로 원(naive) 마우스를 및 Qbx33 단독으로 면역화된 마우스는 난소로부터 바이러스를 제거하지 못했다. 이 데이터를 통해 VLP 만으로 보호적 CTL 면역 반응을 유도하는 데는 충분하지 않은 반면, CpG 또는 폴리(I: C)와 함께 로딩된 VLP는 원(naive) CTL을 초회감작시키는데 유효하다는 것이 입증되었다.

유사하게, G10-PO와 함께 로딩된 Qbx33로 마우스를 면역화시킨 경우 특이 CTL을 초회감작시켰고 (6.2% +/-1.4% 대 0.2% +/-0.1 % 원 마우스에서), 재조합 백시나 바이러스 시험감염으로부터 보호를 유도하였다.

실시예 25

Q β -MelanA 16-35 A/L VLPs를 프로세싱하고 인간 MHC 부류 I 대립형질 HLA-A0201에 의해 제시하고 HLA-A2 형질 전환된 마우스에서 작용성 MelanA-특이 CD8+ T 세포의 확장을 유도한다.

HHD 마우스는 Db a3 영역과 융합된 A2 a1 및 a2 영역의 N-말단에 공유결합된 인간 β 2-작은글로불린과 함께 키메라 단일쇄 부류 I을 발현시킨다(Firat, H. et al 1999, Eur. J. Immunol. , 29: 3112). 이 마우스에서의 HLA-A2 트랜스진 발현을 통해 프로세스되고 CTL 에피토프 MelanA 26-35로서 제시되고 생체내에서 CTL을 초회감작시키는 능력에 대하여 조사할 수 있었다. 추가로, ISS와 같이 애주버트 효능을 생체내에서 연구할 수 있다.

HHD 마우스를 처리하지 않고 남겨두거나 100 μ g의 Q β -MelanA 16-35 A/L 또는 Q β -pIC-MelanA 16-35 A/L를 피하주사하여 면역화시켰다. 8일 후 지라세포를 분리하고, FACS 완충액 (PBS, 2% FCS, 5mM EDTA, pH 8.2)에 재현탁시키고 실온에서 30분동안 HLA-A2-MelanA-PE 표지된 테트라머로 염색하였다. 2차 단계에서 래트 항-마우스 CD8-APC

(BD PharMingen, San Jose, USA) 및 항 마우스 Mel14-FITC (BD PharMingen, San Jose, USA)를 30분동안 4℃에서 가하였다. 세척한 후, 적혈구를 BD-Lyzing 용액(BD Biosciences, San Jose, USA)을 사용하여 10분동안 실온에서 분해하였다. 마지막으로 지라 세포를 세포Quest 소프트웨어를 사용하여 FACS Calibur상에서 분석하였다. 무엇보다도, 세포를 전향 스캐터 산란 및 측면 산란에서 수득하고 림프구를 게이트로 제어하였다(gate). 이 림프구 군집으로부터 CD8 양성 T 세포만을 추가의 분석을 위해 선별하였다. HLA-A2-MelanA-PE 및 Mel14-FITC 표지된 세포를 각각 FL2 및 FL1로 측정하였다. MelanA-특이, 활성화된 CD8+ T 세포의 양을 전체 CD8+ 림프구상의 HLA-A2-MelanA 양성, Mel14 음성 세포의 퍼센트로 산출하였다.

흐름세포측정 분석을 통해 놀랍게도 Qβ-pIC-MelanA 16-35 A/L는 MelanA-특이 활성화된 CD8+ Mel14-T 세포 (2.43% 및 0.73%)의 고도한 확장을 유도하였고, 이는 비처리된 동물(0.22% 및 0.37%)과 비교하여 고도한 수준이었음이 밝혀졌다. Qβ- MelanA를 폴리(I: C)와 함께 로딩할 때에만 백신의 능력은 현저히 증가하였다는 것을 주목하여야 한다.

단백질이 키메라성이 있기 때문에 상기 사용된 바와 같은 인간 HLA-A2-MelanA 테트라머는 마우스 MelanA-특이 T 세포에 매우 효율적으로 결합하지 못한다. 따라서, 마우스에서 더욱 고도한 항원 특이 T 세포를 가정할 수 있다.

유사한 실험에서 본 발명자는 CpG 및 IFA와 혼합된 펩티드로 백신화된 생체내에서 CTL을 초회감작시키는 Qβ-G10-MelanA 16-35 A/L의 효율에 대하여 분석하였다. HHD 마우스를 200μg Q-G10-MelanA 16-35 A/L 또는 20 nmol CpG 및 불완전 Freud's 애주번트 (IFA)와 혼합된 50μg MelanA 16-35 A/L 또는 비처리된로 면역화시켰다. 8일 후 가시화된 림프구를 지라로부터 분리하고 MelanA-특이 CD8+ T 세포에 대하여 염색하였다. 1.5h동안 37℃에서 FACS 완충액중 MelanA 26-35 펩티드와 함께 로딩된 키메라성 HLA-A2ala2Kba3 MHC 부류 I 분자에 특이적인 PE-표지된 테트라머를 사용하여 염색을 수행하였다. 2차 단계에서, 래트 항- 마우스 CD8-APC (BD PharMingen, San Jose, USA) 및 항 마우스 Mel14-FITC (BD PharMingen, San Jose, USA)를 30분동안 4℃에서 가하였다. 최종적으로 지라 세포를 세포 Quest 소프트웨어를 사용하여 FACS Calibur 상에서 분석하였다.

흐름세포측정 분석은 비처리 동물(2%) 또는 20 nmol CpG 및 IFA와 혼합된 동량의 MelanA A/L 16-35 를 투여받는 동물 (2.0 %)과 비교하여 더욱 고도하게 Qb-G10-MelanA 16-35 A/L이 MelanA-특이 활성화된 CD8Mel14-T 세포의 확장 (18.2 %) 유도한다는 것을 나타낸다. Qβ-MelanA이 G10-PO와 함께 로딩되었을 때만 백신의 능력이 증가한다는 것에 주목하여야 한다.

유사한 실험 세팅에서 Qβ-MelanA 16-35 A/L 또는 G8-8 또는 G10 PO와 함께 로딩된 Qβ-MelanA 26-35 A/L로 HHD 마우스를 면역화시켰을 때 HLA-A2-MelanA-양성 및 Mel14 음성 CD8 T 세포를 확장시켰다.

이러한 발견을 통해 외부 및 자기 항원에 대하여 CTL을 매우 효율적으로 초회감작시키는 ISS 로딩된 Qβ-펩티드 백신의 능력이 입증되었다.

실시예 26

장기간 지속되는 메모리 CD8+ T 세포 반응을 유도하기 위하여 동종 및 이종 초회-추가접종 용법에서 CpG와 함께 로딩된 Qbx33를 사용하였다.

150μg Qbx33/NKCpG로 마우스를 면역화시키고 8일 후 p33-특이 T 세포는 원마우스에서의 0.4 % +/-0.2 %로부터 항원으로 면역화된 동물에서의 7.5% +/-2.2%로 증가되었다. 20일 후 펩티드 특이 CD8+ T 군집은 1.6% +/-0.7% 이하로 감소하였다. 1차 면역화후 30일째 150μg Qbx33/NKPS로 이들 마우스를 2차 면역화시켜 메모리 T 세포 반응을 8.4% +/-1.9% 특이 T 세포까지 증진시킬 수 있다. 이 반응은 서서히 하락하였지만, 1차 면역화후 4개월째 150μg Qbx33/NKPS를 사용하여 T 세포 수준이 23.8% +/-5.2 %에 도달할 수 있도록 증진시킬 수 있다.

3마리의 마우스를 20 nmol NKPS 및 IFA와 함께 혼합된 50μg의 p33 펩티드로 초회감작시켰을 때 면역화 후 8일째까지 0.6 % +/- 0.4% 특이 CD8+ T 세포가 유도화될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이 저속 반응은 7일 후에 Qbx33/NKPS를 사용하여 28.5% +/-9.8%의 수준으로 효과적으로 증진시킬 수 있다.

1 x 10⁶ exp6 플라크 형성 유닛의 p33-펩티드를 발현시키는 재조합 백신나 바이러스 면역화는 T 세포 반응을 유도하기는 어렵지만(1.1% +/-0.5%) 6개월 후 150μg의 Qbx33/NKPS를 사용하여 T 세포 수준을 28.1 +/- 4.2%까지 증진시킬 수 있다.

이들 결과는 CpG와 함께 로딩된 Q β 는 이중 및 동중 초회감작 추가 요법에서 미리-존재하는 T 세포의 반응을 매우 효율적으로 증진시킨다는 것을 나타낸다. Q β /NKPS는 펩티드 또는 재조합 바이러스로 초회감작된 T 세포 반응을 매우 비효율적으로 증진시킬 수 있다는 것에 주목하여야 한다. 또한, Q β x33/NKPS으로 강력한 T세포 반응이 형성될 때 본 발명자는 면역학적 유효량의 이중 백신 예로서, p33 펩티드 단독으로, p33를 발현시키는 재조합 바이러스, 또는 VLP에 융합되거나 그와 커플링된 p33을 사용하여 이 반응을 증진시킬 수 있었다. 후자의 경우, 사용된 VLP는 RNA 파지로부터 유래된 VLP가 아니고 예를 들면, AP205로부터 유래된 VLP 또는 HBcAg이었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 바이러스-양 입자(virus-like particle);

(b) 바이러스-양 입자에 결합하고 있는 적어도 하나의 면역자극 물질; 및

(c) 바이러스-양 입자에 결합하고 있는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기(여기에서, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는, 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된다)를 포함하는 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기가 적어도 하나의 공유 결합에 의해 바이러스-양 입자에 결합하고, 바람직하게 공유 결합은 비펩티드 결합인 조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기가 바이러스-양 입자에 융합된 조성물.

청구항 4.

제 1항 내지 제 3항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가 MHC와 유효하게 결합할 수 있도록 하는 조성물.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가 상응하는 정상 MelanA 펩티드와 관련하여 2개, 바람직하게 단일의 아미노산 치환을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6.

제 1항 내지 제 4항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가 프로테아제 또는 펩티다아제 매개 분해로부터 보호되는 조성물.

청구항 7.

제 1항 내지 제 4항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가

- (a) LAGIGILTV (서열번호:84);
- (b) MAGIGILTV (서열번호: 85);
- (c) EAMGIGILTV (서열번호: 86);
- (d) ELAGIGILTV (서열번호: 50);
- (e) EMAGIGILTV (서열번호: 87);
- (f) YAAGIGILTV (서열번호: 88); 및
- (g) FAAGIGILTV (서열번호: 89)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산을 갖는 조성물.

청구항 8.

제 1항 내지 제 4항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가 서열 ELAGIGILTV (서열번호: 50)을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된 조성물.

청구항 9.

제 1항 내지 제 8항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자는 적어도 하나의 제 1 결합부를 포함하고, 항원 또는 항원 결정기는 추가로

- (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적으로 발생된 것이 아닌 결합부;
- (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적으로 발생된 결합부로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 제 2 결합부를 포함하고, 항원 또는 항원 결정기와 바이러스-양 입자의 결합은 제 1 결합부와 제 2 결합부 사이의 결합 (association)을 통해 수행되며, 바람직하게 결합은 적어도 하나의 비-펩티드 결합인 조성물.

청구항 10.

제 9항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기 및 바이러스-양 입자가 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성하는 조성물.

청구항 11.

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 제 1 결합부가 아미노 그룹 또는 리신 잔기를 포함하거나, 바람직하게 그로 구성되는 조성물.

청구항 12.

제 9항 내지 제 11항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부가 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기를 포함하거나, 바람직하게 그로 구성되는 조성물.

청구항 13.

제 9항 내지 제 12항중 어느 한 항에 있어서, 제 1 결합부가 리신 잔기이고 제 2 결합부가 시스테인 잔기인 조성물.

청구항 14.

제 9항 내지 제 13항중 어느 한 항에 있어서, 제 1 결합부가 아미노 그룹이고 제 2 결합부가 설프하이드릴 그룹인 조성물.

청구항 15.

제 9항 내지 제 14항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가

(a) CGHGHSTTTAEELAGIGILTV(서열번호: 55);

(b) CGGELAGIGILTV(서열번호: 57);

(c) CSYTTAEELAGIGILTVILGTL(서열번호: 58);

(d)CGGELAGIGILTVILGVL(서열번호: 59);

(e) ELAGIGILTVGGC(서열번호: 60);

(f) CSPKSLELAGIGILTV(서열번호: 92); 및

(g) ELAGIGILTVILGVLGGC(서열번호: 93)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 조성물.

청구항 16.

제 9항 내지 제 14항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가 CGHGHSTTTAEELAGIGILTV(서열번호: 55)의 아미노산 서열을 갖는 조성물.

청구항 17.

제 1항 내지 제 16항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자에 리포프로테인-포함 인벨럽이 결합되어 있는 조성물.

청구항 18.

제 1항 내지 제 17항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자는 재조합 바이러스-양 입자이고, 바람직하게, 바이러스-양 입자는

(a) B형 간염 바이러스의 재조합 단백질;

(b) 홍역 바이러스(measles virus)의 재조합 단백질;

(c) 신드비스 바이러스(Sindbis virus)의 재조합 단백질;

- (d) 로타바이러스(Rotavirus)의 재조합 단백질;
- (e) 구제 질환 바이러스(Foot-and-Mouth-Disease virus)의 재조합 단백질 ;
- (f) 레트로바이러스의 재조합 단백질 ;
- (g) 노르워크 바이러스(Norwalk virus)의 재조합 단백질;
- (h) 인간 파필로마바이러스(Papilloma virus)의 재조합 단백질;
- (i) BK바이러스의 재조합 단백질;
- (j) 박테리오파지의 재조합 단백질 ;
- (k) RNA-파지의 재조합 단백질 ;
- (l) Ty의 재조합 단백질 ;
- (m) (a) 내지 (l)의 재조합 단백질중 어느 것의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 19.

제 1항 내지 제 18항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자가 B형 간염 바이러스 코어 단백질 또는 BK 바이러스 VP 1 단백질인 조성물.

청구항 20.

제 19항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가 바람직하게 링크 서열에 의해 B형 간염 바이러스 코어 단백질 또는 BK 바이러스 VP 1 단백질의 C-말단에 융합된 조성물.

청구항 21.

제 1항 내지 제 20항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자가 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되고, 바람직하게 RNA-파지가

- a) 박테리오파지 Q β ;
- b) 박테리오파지 R17 ;
- c) 박테리오파지 fr;
- d) 박테리오파지 GA;
- e) 박테리오파지 SP;
- f) 박테리오파지 MS2;
- g) 박테리오파지 M11 ;

- h) 박테리오파지 MX1 ;
- i) 박테리오파지 NL95;
- j) 박테리오파지 f2 ;
- k) 박테리오파지 PP7; 및
- l) 박테리오파지 AP205로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 22.

제 1항 내지 제 21항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자가 박테리오파지 Q β 또는 박테리오파지 AP205의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되는 조성물.

청구항 23.

제 1항 내지 제 22항중 어느 한 항에 있어서, 면역자극 물질이 톨-양 수용체 활성화 물질 또는 사이토카인 분비 유도 물질이고, 바람직하게 톨-양 수용체 활성화 물질은:

- (a) 면역자극 핵산;
- (b) 펩티도글리칸;
- (c) 리포폴리사카라이드;
- (d) 리포테이콘산산;
- (e) 이미다조퀴놀린 화합물;
- (f) 플라젤린;
- (g) 리포프로테인;
- (h) 면역자극 유기 물질;
- (i) 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드;
- (j) (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및/또는 (i)중 적어도 하나의 물질의 혼합물로 구성되거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 24.

제 23항에 있어서, 면역자극 핵산이

- (a) 리보핵산;
- (b) 데옥시리보핵산;

(c) 키메라성 핵산; 및

(d) (a), (b) 및/또는 (c)의 적어도 하나의 핵산의 혼합물로 구성되거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 25.

제 24항에 있어서, 리보핵산이 폴리-(I:C) 또는 그의 유도체인 조성물.

청구항 26.

제 24항에 있어서, 데옥시리보핵산이

(a) 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드;

(b) 비메틸화 CpG 모티프가 결합되어 있는 올리고뉴클레오티드로 구성되거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 27.

제 1항 내지 제 24항 및 제 26항중 어느 한 항에 있어서, 면역자극 물질이 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드인 조성물.

청구항 28.

제 27항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 서열:

5'X₁X₂CGX₃X₄ 3'(여기에서, X₁, X₂, X₃, 및 X₄는 모든 뉴클레오티드이다)을 포함하는 조성물.

청구항 29.

제 28항에 있어서, 뉴클레오티드 X₁, X₂, X₃, 및 X₄중 적어도 하나는 포스페이트 백본 변형을 갖는 조성물.

청구항 30.

제 1항 내지 제 29항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 앞뒤역순상동서열(palindromic sequence)을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된 조성물.

청구항 31.

제 27항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 표 2에 기술되어 있는

(a) TCCATGACGTTTCCTGAATAAT (서열번호: 35);

(b) TCCATGACGTTTCCTGACGTT (서열번호: 37);

(c) GGGGTCAACGTTGA GGGGG (서열번호: 39);

(d) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (서열번호: 41);

(e) "dsCyCpG-253" (서열번호: 49)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 서열을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되고, 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트 백본에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형을 포함하거나, 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본의 각 포스페이트 부위가 포스포로티오에이트 변형인 조성물.

청구항 32.

제 27항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가 서열GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG(서열번호: 41)을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되는 조성물.

청구항 33.

제 1항 내지 제 32항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가 포스페이트 백본에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형을 포함하거나, 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본의 각 포스페이트 부위가 포스포로티오에이트 변형인 조성물.

청구항 34.

제 1항 내지 제 33항중 어느 한 항에 있어서, 면역자극 물질이 바이러스-양 입자에 비-공유 결합되어 있는 조성물.

청구항 35.

제 1항 내지 제 34항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가 바이러스-양 입자에 비-공유 결합되어 있는 조성물.

청구항 36.

제 1항 내지 제 35항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가 약 6개 내지 약 100,000개의 뉴클레오타이드, 바람직하게 약 6개 내지 약 2000개의 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게 약 20개 내지 약 500개의 뉴클레오타이드, 더욱더 바람직하게 약 20개 내지 약 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는 조성물.

청구항 37.

제 1항 내지 제 36항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가

- (a) 재조합 올리고뉴클레오타이드 ;
- (b) 유전자 올리고뉴클레오타이드;
- (c) 합성 올리고뉴클레오타이드;
- (d) 플라스미드-유도된 올리고뉴클레오타이드;
- (e) 싱글-스트랜드 올리고뉴클레오타이드; 및
- (f) 더블-스트랜드 올리고뉴클레오타이드로부터 선택되는 조성물.

청구항 38.

제 30항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 GACGATCGTC (서열번호: 1)를 포함하거나, 다르게는, 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되는 조성물.

청구항 39.

제 38항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 적어도 3개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열이 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치하는 조성물.

청구항 40.

제 38항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 적어도 4개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열이 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치하는 조성물.

청구항 41.

제 38항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 적어도 5개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열이 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치하는 조성물.

청구항 42.

제 38항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가

- (a) GGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 2);
- (b) GGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 3);
- (c) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 4);
- (d) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 5);
- (e) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 6);

(f) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (서열번호: 7);

(g) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (서열번호: 8);

(h) GGGGGGCGACGACGATCGTCGTCGGGGGGG (서열번호: 9); 및

(i) GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (서열번호: 41)으로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는 조성물.

청구항 43.

제 27항 또는 제 38항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타드가 서열번호: 7 또는 서열번호: 41의 핵산 서열을 갖는 조성물.

청구항 44.

제 1항 내지 제 43항중 어느 한 항에 있어서, 세포 독성 T 세포 에피토프, Th 세포 에피토프, 또는 상기 두개의 에피토프의 배합물을 포함하고, 적어도 두개의 에피토프는 직접 또는 링크 서열에 의해 결합하고, 바람직하게 세포 독성 T 세포 에피토프는 바이러스 또는 중앙 세포독성 T 세포 에피토프인 조성물.

청구항 45.

제 44항에 있어서, 항원이 적어도 하나의 세포 독성 T 세포 에피토프 및 적어도 하나의 Th 세포 에피토프의 배합물을 포함하고, 배합물은 MelanA (1- 118 A/L) (서열번호: 94)인 조성물.

청구항 46.

(a) 바이러스-양 입자(virus-like particle);

(b) 바이러스-양 입자에 결합하고 있는 적어도 하나의 면역자극 물질; 및

(c) 바이러스-양 입자에 결합하고 있는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기(여기에서, 항원은 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체를 포함하거나, 다르게는, 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된다)를 포함하는 조성물을 동물 내로 도입하는 것을 포함하는, 동물에서 면역 반응을 증진시키는 방법.

청구항 47.

제 46항에 있어서, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기가 적어도 하나의 공유 결합에 의해 바이러스-양 입자에 결합하고, 바람직하게 공유 결합은 비펩티드 결합인 방법.

청구항 48.

제 46항에 있어서, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기가 바이러스-양 입자에 융합된 방법.

청구항 49.

제 46항 내지 제 48항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가 MHC와 유효하게 결합할 수 있도록 하는 방법.

청구항 50.

제 46항 내지 제 49항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가 상응하는 정상 MelanA 펩티드와 관련하여 2개, 바람직하게 단일의 아미노산 치환을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.

제 46항 내지 제 50항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가 프로테아제 또는 펩티다아제 매개 분해로부터 보호되는 방법.

청구항 52.

제 46항 내지 제 51항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA 펩티드 유사체가

- (a) LAGIGILTV (서열번호:84);
- (b) MAGIGILTV (서열번호: 85);
- (c) EAMGIGILTV (서열번호: 86);
- (d) ELAGIGILTV (서열번호: 50);
- (e) EMAGIGILTV (서열번호: 87);
- (f) YAAGIGILTV (서열번호: 88); 및
- (g) FAAGIGILTV (서열번호: 89)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산을 갖는 방법.

청구항 53.

제 46항 내지 제 51항중 어느 한 항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가 서열 ELAGIGILTV (서열번호: 50)을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된 방법.

청구항 54.

제 46항 내지 제 53항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자는 적어도 하나의 제 1 결합부를 포함하고, 항원 또는 항원 결정기는 추가로

- (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적으로 발생된 것이 아닌 결합부;
- (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적으로 발생된 결합부로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 제 2 결합부를 포함하고, 항원 또는 항원 결정기와 바이러스-양 입자의 결합은 제 1 결합부와 제 2 결합부 사이의 결합 (association)을 통해 수행되며, 바람직하게 결합은 적어도 하나의 비-펩티드 결합인 방법.

청구항 55.

제 54항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기 및 바이러스-양 입자가 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성하는 방법.

청구항 56.

제 54항 또는 제 55항에 있어서, 제 1 결합부가 아미노 그룹 또는 리신 잔기를 포함하거나, 바람직하게 그로 구성되는 방법.

청구항 57.

제 54항 내지 제 56항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부가 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기를 포함하거나, 바람직하게 그로 구성되는 방법.

청구항 58.

제 54항 내지 제 57항중 어느 한 항에 있어서, 제 1 결합부가 리신 잔기이고 제 2 결합부가 시스테인 잔기인 방법.

청구항 59.

제 54항 내지 제 58항중 어느 한 항에 있어서, 제 1 결합부가 아미노 그룹이고 제 2 결합부가 설프하이드릴 그룹인 방법.

청구항 60.

제 54항 내지 제 59항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가

(a) CGHGHSTTTAEELAGIGILTV(서열번호: 55);

(b) CGGELAGIGILTV(서열번호: 57);

(c) CSYTTAEELAGIGILTVILGTL(서열번호: 58);

(d)CGGELAGIGILTVILGVL(서열번호: 59);

(e) ELAGIGILTVGGC(서열번호: 60);

(f) CSPKSLELAGIGILTV(서열번호: 92); 및

(g) ELAGIGILTVILGVLGGC(서열번호: 93)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 61.

제 54항 내지 제 59항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부를 포함하는 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가 CGHGHSYTTAEELAGIGILTV(서열번호: 55)의 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 62.

제 46항 내지 제 61항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자는 재조합 바이러스-양 입자이고, 바람직하게, 바이러스-양 입자는

- (a) B형 간염 바이러스의 재조합 단백질;
- (b) 홍역 바이러스(measles virus)의 재조합 단백질;
- (c) 신드비스 바이러스(Sindbis virus)의 재조합 단백질;
- (d) 로타바이러스(Rotavirus)의 재조합 단백질;
- (e) 구제 질환 바이러스(Foot-and-Mouth-Disease virus)의 재조합 단백질 ;
- (f) 레트로바이러스의 재조합 단백질 ;
- (g) 노르워크 바이러스(Norwalk virus)의 재조합 단백질;
- (h) 인간 파필로마바이러스(Papilloma virus)의 재조합 단백질;
- (i) BK바이러스의 재조합 단백질;
- (j) 박테리오파지의 재조합 단백질 ;
- (k) RNA-파지의 재조합 단백질 ;
- (l) Ty의 재조합 단백질 ;
- (m) (a) 내지 (l)의 재조합 단백질중 어느 것의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 63.

제 46항 내지 제 62항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자가 B형 간염 바이러스 코어 단백질 또는 BK 바이러스 VP 1 단백질인 방법.

청구항 64.

제 63항에 있어서, 인간 악성흑색종 MelanA/MART-1 펩티드 유사체가 바람직하게 링크 서열에 의해 B형 간염 바이러스 코어 단백질 또는 BK 바이러스 VP 1 단백질의 C-말단에 융합된 방법.

청구항 65.

제 46항 내지 제 64항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자가 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되고, 바람직하게 RNA-파지가

- a) 박테리오파지 Q β ;
- b) 박테리오파지 R17 ;
- c) 박테리오파지 fr;
- d) 박테리오파지 GA;
- e) 박테리오파지 SP;
- f) 박테리오파지 MS2;
- g) 박테리오파지 M11 ;
- h) 박테리오파지 MX1 ;
- i) 박테리오파지 NL95;
- j) 박테리오파지 f2 ;
- k) 박테리오파지 PP7; 및
- l) 박테리오파지 AP205로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 66.

제 46항 내지 제 65항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스-양 입자가 박테리오파지 Q β 또는 박테리오파지 AP205의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되는 방법.

청구항 67.

제 46항 내지 제 66항중 어느 한 항에 있어서, 면역자극 물질이 톨-양 수용체 활성화 물질 또는 사이토카인 분비 유도 물질 이고, 바람직하게 톨-양 수용체 활성화 물질은:

- (a) 면역자극 핵산;
- (b) 펩티도글리칸;
- (c) 리포폴리사카라이드;
- (d) 리포테이콘산산;
- (e) 이미다조퀴놀린 화합물;
- (f) 플라젤린;
- (g) 리포프로테인;
- (h) 면역자극 유기 물질;

(i) 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드;

(j) (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및/또는 (i)중 적어도 하나의 물질의 혼합물로 구성되거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 68.

제 67항에 있어서, 면역자극 핵산이

(a) 리보핵산;

(b) 데옥시리보핵산;

(c) 키메라성 핵산; 및

(d) (a), (b) 및/또는 (c)의 적어도 하나의 핵산의 혼합물로 구성되거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 69.

제 68항에 있어서, 리보핵산이 폴리-(I:C) 또는 그의 유도체인 방법.

청구항 70.

제 68항에 있어서, 데옥시리보핵산이

(a) 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드;

(b) 비메틸화 CpG 모티프가 결여되어 있는 올리고뉴클레오타이드로 구성되거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 71.

제 46항 내지 제 68항 및 제 70항중 어느 한 항에 있어서, 면역자극 물질이 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드인 방법.

청구항 72.

제 71항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타이드가 서열:

5'X₁X₂CGX₃X₄ 3'(여기에서, XX₁, X₂, X₃, 및 X₄는 모든 뉴클레오타이드이다)을 포함하는 방법.

청구항 73.

제 72항에 있어서, 뉴클레오타이드 X₁, X₂, X₃, 및 X₄중 적어도 하나는 포스페이트 백본 변형을 갖는 방법.

청구항 74.

제 46항 내지 제 73항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 앞뒤역순상동서열(palindromic sequence)을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성된 방법.

청구항 75.

제 71항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 표 2에 기술되어 있는

(a) TCCATGACGTTTCCTGAATAAT (서열번호: 35);

(b) TCCATGACGTTTCCTGACGTT (서열번호 : 37);

(c) GGGGTCAACGTTGA GGGGG (서열번호 : 39);

(d) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (서열번호 : 41);

(e) "dsCyCpG-253" (서열번호: 49)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 서열을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되고, 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드는 포스페이트 백본에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형을 포함하거나, 올리고뉴클레오티드의 포스페이트 백본의 각 포스페이트 부위가 포스포로티오에이트 변형인 방법.

청구항 76.

제 71항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 앞뒤역순상동 서열이고, 바람직하게 앞뒤역순상동 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 서열이 서열 GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG(서열번호 : 41)을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되는 방법.

청구항 77.

제 46항 내지 제 76항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 포스페이트 백본에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형을 포함하거나, 올리고뉴클레오티드의 포스페이트 백본의 각 포스페이트 부위가 포스포로티오에이트 변형인 방법.

청구항 78.

제 46항 내지 제 77항중 어느 한 항에 있어서, 면역자극 물질이 바이러스-양 입자에 비-공유 결합되어 있는 방법.

청구항 79.

제 46항 내지 제 78항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오티드가 바이러스-양 입자에 비-공유 결합되어 있는 방법.

청구항 80.

제 46항 내지 제 79항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타드가 약 6개 내지 약 100,000개의 뉴클레오타드를 포함하고, 바람직하게 면역자극 핵산, 및 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타드는 약 20개 내지 약 100개의 뉴클레오타드를 포함하는 방법.

청구항 81.

제 46항 내지 제 80항중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 면역자극 물질, 및 바람직하게 면역자극 핵산, 및 더욱더 바람직하게 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타드가

- (a) 재조합 올리고뉴클레오타드 ;
- (b) 유전자 올리고뉴클레오타드;
- (c) 합성 올리고뉴클레오타드;
- (d) 플라스미드-유도된 올리고뉴클레오타드;
- (e) 싱글-스트랜드 올리고뉴클레오타드; 및
- (f) 더블-스트랜드 올리고뉴클레오타드로부터 선택되는 방법.

청구항 82.

제 74항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 GACGATCGTC (서열번호: 1)포함하거나, 다르게는 필수적으로 그로 구성되거나, 다르게는 그로 구성되는 방법.

청구항 83.

제 82항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 적어도 3개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열이 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치하는 방법.

청구항 84.

제 82항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 적어도 4개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열이 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치하는 방법.

청구항 85.

제 82항에 있어서, 앞뒤역순상동 서열이 적어도 5개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 5'-말단 측면에 위치하고 앞뒤역순상동 서열이 적어도 6개 및 최대로 10개의 구아노신 엔티티에 의해 그의 3'-말단 측면에 위치하는 방법.

청구항 86.

제 82항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타드가

- (a) GGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 2);
- (b) GGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 3);
- (c) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 4);
- (d) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열번호: 5);
- (e) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (서열번호: 6);
- (f) GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (서열번호: 7);
- (g) GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (서열번호: 8);
- (h) GGGGGGCGACGACGATCGTCGTCGGGGGGG (서열번호: 9); 및
- (i) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (서열번호: 41)으로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는 방법.

청구항 87.

제 71항 또는 제 82항에 있어서, 비메틸화 CpG-포함 올리고뉴클레오타드가 서열번호: 7 또는 서열번호: 41의 핵산 서열을 갖는 방법.

청구항 88.

제 46항 내지 제 87항중 어느 한 항에 있어서, 세포 독성 T 세포 에피토프, Th 세포 에피토프, 또는 상기 두개의 에피토프의 배합물을 포함하고, 적어도 두개의 에피토프는 직접 또는 링크 서열에 의해 결합하고, 바람직하게 세포 독성 T 세포 에피토프는 바이러스 또는 종양 세포독성 T 세포 에피토프인 방법.

청구항 89.

제 46항 내지 제 87항중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 증진된 B 세포 반응 또는 증진된 T 세포 반응이고, 바람직하게 T 세포 반응은 CTL 반응 또는 Th 세포 반응이고, 더욱더 바람직하게 Th 세포 반응은 Th1 세포 반응인 방법.

청구항 90.

제 46항 내지 제 89항중 어느 한 항에 있어서, 동물이 포유동물이고, 바람직하게 포유동물이 인간인 방법.

청구항 91.

제 46항 내지 제 90항중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 피하, 근육내, 정맥내, 비강내 또는 림프절로 직접 동물에 도입시키는 방법.

청구항 92.

약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 면역학적 유효량의 제 1항 내지 제 45항중 어느 한 항의 조성물을 포함하고, 바람직하게 추가로 애주번트를 포함하는 백신.

청구항 93.

면역학적 유효량의 제 92항의 백신을 동물에 투여하는 것을 포함하는, 동물을 면역화시키거나 치료하는 방법.

청구항 94.

제 93항에 있어서, 동물이 포유동물이고, 바람직하게 포유동물이 인간인 방법.

청구항 95.

면역학적 유효량의 제 92항의 백신을 동물에 투여하여 동물에서 T 세포 반응을 초기감작(priming)시키는 것을 포함하는, 동물을 면역화시키거나 치료하는 방법.

청구항 96.

제 95항에 있어서, 바람직하게 면역학적 유효량의 제 92항의 백신 또는 면역학적 유효량의 이중 백신(여기에서, 더욱 바람직하게 이중 백신은 DNA 백신이다)을 투여하여 수행되는 동물에서의 면역 반응 증진(boosting) 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 97.

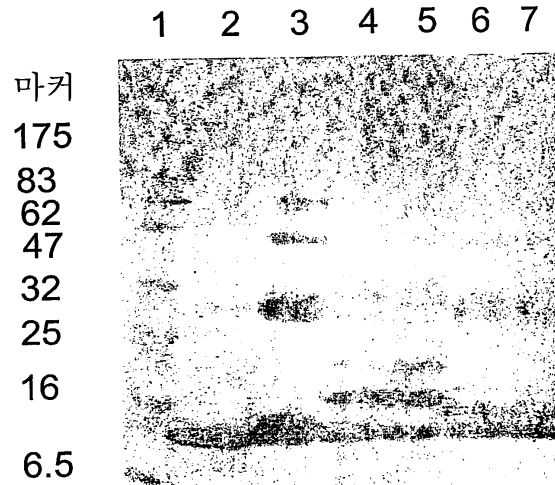
동물에서의 T 세포 반응 초기감작 단계, 및 면역학적 유효량의 제 92항의 백신을 투여하여 수행되는 동물에서의 T 세포 반응 증진 단계를 포함하는, 동물을 면역화시키거나 치료하는 방법.

청구항 98.

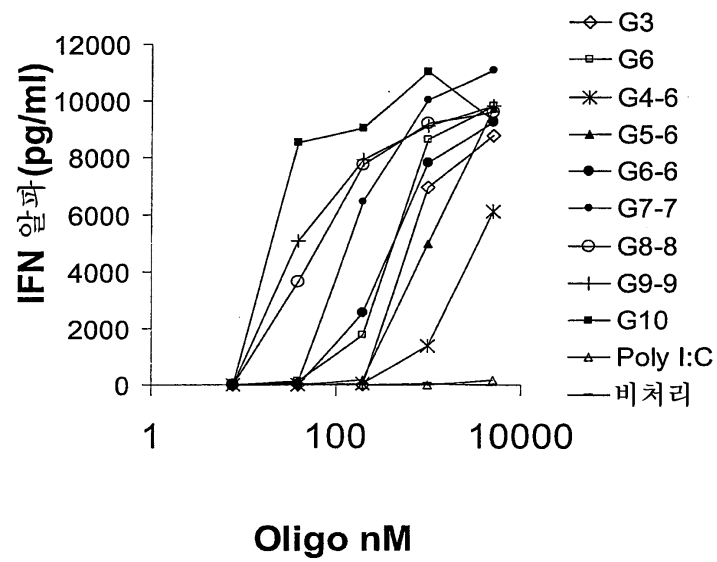
제 97항에 있어서, 초기감작은 면역학적 유효량의 제 92항의 백신 또는 면역학적 유효량의 이중 백신(여기에서, 더욱 바람직하게 이중 백신은 DNA 백신이다)을 투여하여 수행되는 방법.

도면

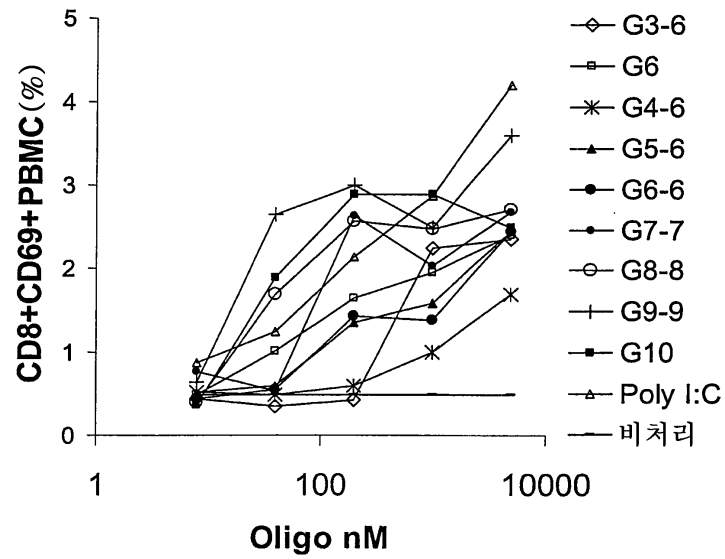
도면1



도면2a

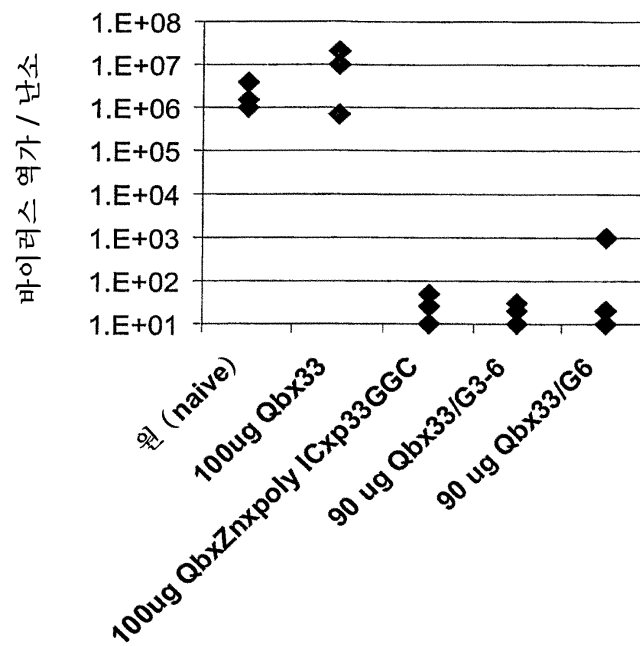


도면2b



도면3

백시나 보호 에세이



SEQUENCE LISTING

<110> Cytos Biotechnology AG
 Bachmann, Martin
 Manolova, Vania
 Meijerink, Edwin
 Proba, Karl
 Schwarz, Katrin

<120> MelanA-Peptide Analogue-Carrier-Conjugates

<130> PA058WO
 <150> US 60/457,348
 <151> 2003-03-26
 <160> 94
 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide ISS

<400> 1
 gacgatcgtc 10

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide G3-6

<400> 2
 ggggacgatc gtcggggggg 19

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide G4-6

<400> 3
 gggggacgat cgtcggggggg 20

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide G5-6

<400> 4
gggggggacga tcgtcggggg g 21

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide G6-6

<400> 5
gggggggacg atcgtcgggg gg 22

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide G7-7

<400> 6
gggggggggac gatcgtcggg gggg 24

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide G8-8

<400> 7
gggggggggga cgatcgtcgg gggggg 26

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide G9-9

<400> 8
ggggggggggg acgatcgtcg ggggggggg 28

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide G6

<400> 9
 ggggggcgac gacgatcgtc gtcggggggg 30

<210> 10
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage Q-beta

<400> 10

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 11
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage Q-beta

<400> 11

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 130 135 140

Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro Gly
 145 150 155 160

Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu Val
 165 170 175

Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala Val
180 185 190

Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu Gly
195 200 205

Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr Phe
210 215 220

Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr Leu
225 230 235 240

Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu Gly
245 250 255

Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu Lys
260 265 270

Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His Ala
275 280 285

Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly Ala
290 295 300

Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile Gln
305 310 315 320

Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
325

<210> 12
<211> 362
<212> PRT
<213> BK virus

<400> 12

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Cys Pro Gly Ala Ala Pro Lys
1 5 10 15

Lys Pro Lys Glu Pro Val Gln Val Pro Lys Leu Leu Ile Lys Gly Gly
20 25 30

Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr Gly Val Asp Ala Ile Thr Glu Val
35 40 45

Glu Cys Phe Leu Asn Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Asp Asn Leu Arg
50 55 60

Gly Tyr Ser Gln His Leu Ser Ala Glu Asn Ala Phe Glu Ser Asp Ser
65 70 75 80

Pro Asp Arg Lys Met Leu Pro Cys Tyr Ser Thr Ala Arg Ile Pro Leu
85 90 95

Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Leu Leu Met Trp Glu
100 105 110

Ala Val Thr Val Lys Thr Glu Val Ile Gly Ile Thr Ser Met Leu Asn
115 120 125

Leu His Ala Gly Ser Gln Lys Val His Glu Asn Gly Gly Gly Lys Pro
130 135 140

Val Gln Gly Ser Asn Phe His Phe Phe Ala Val Gly Gly Asp Pro Leu
145 150 155 160

Glu Met Gln Gly Val Leu Met Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Gln Gly
165 170 175

Thr Ile Thr Pro Lys Asn Pro Thr Ala Gln Ser Gln Val Met Asn Thr
180 185 190

Asp His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Val Glu Cys
195 200 205

Trp Ile Pro Asp Pro Ser Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr
210 215 220

Tyr Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Val Thr Asn Thr
225 230 235 240

Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Gln Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys
245 250 255

Ala Asp Ser Leu Tyr Val Ser Ala Ala Asp Ile Cys Gly Leu Phe Thr
260 265 270

Asn Ser Ser Gly Thr Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ala Arg Tyr Phe Lys
275 280 285

Ile Arg Leu Arg Lys Arg Ser Val Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe
290 295 300

Leu Leu Ser Asp Leu Ile Asn Arg Arg Thr Gln Lys Val Asp Gly Gln
305 310 315 320

Pro Met Tyr Gly Met Glu Ser Gln Val Glu Glu Val Arg Val Phe Asp
325 330 335

Gly Thr Glu Gln Leu Pro Gly Asp Pro Asp Met Ile Arg Tyr Ile Asp
340 345 350

Arg Gln Gly Gln Leu Gln Thr Lys Met Val
355 360

<210> 13
<211> 130
<212> PRT
<213> Bacteriophage fr

<400> 13

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
115 120 125

Ile Tyr
130

<210> 14
<211> 130
<212> PRT
<213> Bacteriophage GA

<400> 14

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
115 120 125

Tyr Ala
130

<210> 15
<211> 594
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HBcAg containing p33 from LCMV

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(594)

<400> 15
atg gac att gac cct tat aaa gaa ttt gga gct act gtg gag tta ctc 48
Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

tcg ttt ttg cct tct gac ttc ttt cct tcc gtc aga gat ctc cta gac 96
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

acc gcc tca gct ctg tat cga gaa gcc tta gag tct cct gag cat tgc 144
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

tca cct cac cat act gca ctc agg caa gcc att ctc tgc tgg ggg gaa 192
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

ttg atg act cta gct acc tgg gtg ggt aat aat ttg gaa gat cca gca 240
Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

tcc agg gat cta gta gtc aat tat gtt aat act aac atg ggt tta aag 288
Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

atc agg caa cta ttg tgg ttt cat ata tct tgc ctt act ttt gga aga 336
 Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 100 105 110

gag act gta ctt gaa tat ttg gtc tct ttc gga gtg tgg att cgc act 384
 Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

cct cca gcc tat aga cca cca aat gcc cct atc tta tca aca ctt ccg 432
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

gaa act act gtt gtt aga cga cgg gac cga ggc agg tcc cct aga aga 480
 Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
 145 150 155 160

aga act ccc tcg cct cgc aga cgc aga tct caa tcg ccg cgt cgc aga 528
 Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
 165 170 175

aga tct caa tct cgg gaa tct caa tgt ctt ctc ctt aaa gct gtt tac 576
 Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys Leu Leu Leu Lys Ala Val Tyr
 180 185 190

aac ttc gct acc atg taa 594
 Asn Phe Ala Thr Met
 195

<210> 16
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HBcAg containing p33 from LCMV

<400> 16

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys Leu Leu Leu Lys Ala Val Tyr
180 185 190

Asn Phe Ala Thr Met
195

<210> 17

<211> 246

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> dsDNA fragment for packaging and stabilization of BKV

<400> 17

ggcgggtggtg tcagatctac aatgatcgtc atcaccttgg tgatgctgaa gaagaaacag 60

tacacatcca ttcatcatgg tgtgggtggag gttgacgccg ctgtcacccc agaggagcgc 120

cacctgtcca agatgcagca gaacggctac gaaaatccaa cctacaagtt ctttgagcag 180

atgcagaacg ctagctatcc atacgatgtc cctgattacg cctaacgcga attcgccagc 240

acagtg 246

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GGKGG Linker

<400> 18

Gly Gly Lys Gly Gly

1 5

<210> 19

<211> 128

<212> PRT

<213> Bacteriophage PP7

<400> 19

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu

1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val

20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn

35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp

50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg

65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr

85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala

100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
115 120 125

<210> 20
<211> 132
<212> PRT
<213> Bacteriophage Q-beta

<400> 20

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 21
<211> 132
<212> PRT

<213> Bacteriophage Q-beta

<400> 21

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 22

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriophage Q-beta

<400> 22

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 23
<211> 132
<212> PRT
<213> Bacteriophage Q-beta

<400> 23

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 24

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriophage Q-beta

<400> 24

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 25
<211> 184
<212> PRT
<213> Hepatitis B virus

<400> 25

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr
20 25 30

Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser
35 40 45

Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu
50 55 60

Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser
65 70 75 80

Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Ile
85 90 95

Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu
100 105 110

Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro
115 120 125

Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu
130 135 140

Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg
145 150 155 160

Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg
165 170 175

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180

<210> 26
<211> 213
<212> PRT
<213> Hepatitis B virus

<400> 26

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
20 25 30

Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
35 40 45

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
50 55 60

Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp
100 105 110

Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln
115 120 125

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
130 135 140

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser
195 200 205

Arg Glu Ser Gln Cys
210

<210> 27
<211> 188
<212> PRT
<213> Hepatitis B virus

<400> 27

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln
65 70 75 80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
85 90 95

Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln
100 105 110

His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser
145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Thr Asn Cys
180 185

<210> 28
<211> 185
<212> PRT
<213> Hepatitis B virus

<400> 28

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 29
<211> 152
<212> PRT
<213> Hepatitis B virus

<400> 29

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Lys Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val
85 90 95

Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr
100 105 110

Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp
115 120 125

Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser
130 135 140

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
145 150

<210> 30
<211> 3635
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> plasmid pAP283-58

<400> 30
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60
gctcgcccgg ggatcctcta gaatcttctg cgcacccatc ccgggtggcg cccaaagtga 120
ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt 180
gtggtcggat ccaactcggt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt 240
taaagttggt atagccgaac tgaataatgt ttcaggtcaa tatgtatctg tttataagcg 300
tcctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgctgtgtc attatgccga atgaaaacca 360
atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg 420
ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt 480
ccttgaccct actgcggcta tcgtatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata 540
gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgatata taaggttatg tattaattgt agccgcgttc 600
taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc 660

atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttgga cgaaccttct gagtttctgg	720
taacgccgtt ccgcaccccg gaaatgggtca ccgaaccaat cagcaggggtc atcgctagcc	780
agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcacccg cgcacacagt gcggttgctg	840
gcgctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga	900
gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttggggcgcca	960
tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cgggtgcttca acggcctcaa cctactactg	1020
ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatgggtgc actctcagta	1080
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat	1140
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc	1200
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agagggtttc	1260
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgcta	1320
tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg	1380
ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg	1440
ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt	1500
attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgccg cattttgcct tcctgttttt	1560
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg	1620
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa	1680
cgttttcaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgatt	1740
gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag	1800
tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt	1860
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga	1920
ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atggggggatc atgtaactcg ccttgatcgt	1980
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta	2040
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg	2100
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc	2160
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt	2220

atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat ctacacgacg 2280
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 2340
 attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 2400
 cttcattttt aattttaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa 2460
 atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 2520
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 2580
 ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 2640
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 2700
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg 2760
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2820
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2880
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgcgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 2940
 gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3000
 agggagcttc cagggggaaa cgcctgggtat ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc 3060
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3120
 agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 3180
 cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc 3240
 gctcgcgcga gccgaacgac gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc 3300
 caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tgtggtgtca 3360
 tggtcggtga tcgccagggt gccgacgcgc atctcgactg catggtgcac caatgcttct 3420
 ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggccgtgca ggtcgtaaat cactgcataa 3480
 ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatggt ttttgcgccg acatcataac 3540
 gggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag 3600
 tacgcaagtt cacgtaaaaa gggtatcgcg gaatt 3635

<210> 31
 <211> 131
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AP205 coat protein

<400> 31

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
115 120 125

Thr Thr Ala
130

<210> 32

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AP205 coat protein

<400> 32

Met Ala Asn Lys Thr Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
115 120 125

Thr Thr Ala
130

<210> 33

<211> 3607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> plasmid pAP281-32

<400> 33

cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60

gctcgcccg ggcacacct gattaaccca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag 120

acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaat aaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta 180

tcaactacat tttcagcaag tctgttacgc caacgtgtta aagttggtat agccgaactg	240
aataatgttt cagggtcaata tgtatctgtt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc	300
agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tttcagggtc	360
agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac	420
actcttcgcg agcggcaacg ccggtttggg tttccttgac cctactgcgg ctatcgtatc	480
gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaactgta tgtgtatgat	540
acataagggt atgtattaat ggtagccgcg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg	600
tgtagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaacgt ccgtcagagt	660
cggttgggtt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgcgg ttccgcaccc cggaaatggt	720
caccgaacca ttcagcaggg tcatcgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc	780
ccgcatcacc ggcgccacag gtgcggtgct ggcgccctata tcgccgacat caccgatggg	840
gaagatcggg ctcgccactt cgggctcatg atcgctgggt tccgcctggg tatggtggca	900
ggccccgtgg cccggggggac tgttggggcg catctccttg catgcacat tccttgcggc	960
ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa	1020
gggagagcgt cgatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc	1080
caactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg	1140
ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgcttc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg	1200
tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc	1260
ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat	1320
ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttct gggaaatgtg cgcggacccc ctattggttt	1380
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct	1440
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc	1500
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa	1560
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg	1620
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttca atgatgagca cttttaaggt	1680
tctgctatgt gtcgcggtat tatcccgat tgacgcggg caagagcaac tcggtcgccg	1740

catacactat tctcagaatg acttggtggt acctaccagt cacagaaaag catcttacgg	1800
atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg	1860
ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca	1920
tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa	1980
acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtac gaacggcaac aacgttgcg aaactattaa	2040
ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata	2100
aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat	2160
ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc	2220
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata	2280
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt	2340
actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga	2400
agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag	2460
cggtcagacc ccgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa	2520
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag	2580
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg	2640
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat	2700
acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta	2760
ccgggttga ctcaagacga taggtaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg	2820
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc	2880
gcgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaa ggcggacagg tatccggtaa	2940
gcggcagggg cggaacaaga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc	3000
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt	3060
cagggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct	3120
ttggctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttata ccctgattct gtggataacc	3180
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gacggcgag	3240
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg	3300

ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggt gatcgccagg gtgccgacgc 3360
gcatctcgac tgcattggtgc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg 3420
tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480
ctggataatg ttttttgcgg cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct 3540
ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600
cggaatt 3607

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> CyCpGpt

<400> 34
tccatgacgt tcctgaataa t 21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> CyCpG

<400> 35
tccatgacgt tcctgaataa t 21

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> B-CpGpt

<400> 36
tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> B-CpG

<400> 37

tccatgacgt tcctgacgtt

20

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> NKCPGpt

<400> 38

ggggtcaacg ttgaggggg

19

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> NKCPG

<400> 39

ggggtcaacg ttgaggggg

19

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> CyCPG-rev-pt

<400> 40

attattcagg aacgtcatgg a

21

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> g10gacga-PO (G10-PO)

<400> 41
 gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30

<210> 42
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> g10gacga-PS

<400> 42
 gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30

<210> 43
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> (CPG) 20OpA

<400> 43
 cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg aaatgcatgt caaagacagc 60
 at 62

<210> 44
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Cy (CpG) 20

<400> 44
 tccatgacgt tcctgaataa tcgcgcgcg cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg 60
 g 61

<210> 45
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Cy (CpG) 20-OpA

<400> 45
tccatgacgt tcctgaataa tcgcgcgcgcg gcgcgcgcgcg gcgcgcgcgcg gcgcgcgcgcg 60
gaaatgcatg tcaaagacag cat 83

<210> 46
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> CyOpA

<400> 46
tccatgacgt tcctgaataa taaatgcatg tcaaagacag cat 43

<210> 47
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> CyCyCy

<400> 47
tccatgacgt tcctgaataa ttccatgacg ttctgaata attccatgac gttcctgaat 60
aat 63

<210> 48
<211> 150
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Cy150-1

<400> 48
tccatgacgt tcctgaataa ttccatgacg ttctgaata attccatgac gttcctgaat 60
aattggatga cgttggtgaa taattccatg acgttctga ataattccat gacgttcctg 120
aataattcca tgacgttcct gaataattcc 150

<210> 49
<211> 253
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> dsCyCpG-253

<400> 49

ctagaactag tggatccccc gggctgcagg aattcgattc atgacttcct gaataattcc 60

atgacgttgg tgaataattc catgacgttc ctgaataatt ccatgacgtt cctgaataat 120

tccatgacgt tcctgaataa ttccatgacg ttctgaata attccatgac gttcctgaat 180

aattccatga cgttcctgaa taattccatg acgttcctga aaattccaat caagcttata 240

gataccgtcg acc 253

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Melan A 26-35 A/L

<400> 50

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Melan A 16-35 A/L

<400> 51

Gly His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile Gly

1 5 10 15

Ile Leu Thr Val

20

<210> 52

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> MelanA 20-40 A/L

<400> 52

Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10 15

Ile Leu Gly Val Leu
20

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MelanA 26-40 A/L

<400> 53

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val
1 5 10

<210> 54

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MelanA 16-35

<400> 54

Cys Gly His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile
1 5 10 15

Gly Ile Leu Thr Val
20

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> MelanA 16-35 A/L

<400> 55

Cys Gly His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile
1 5 10 15

Gly Ile Leu Thr Val
20

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MelanA 26-35

<400> 56

Cys Gly Gly Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MelanA 26-35 A/L

<400> 57

Cys Gly Gly Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 58

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> MelanA 20-40 A/L

<400> 58

Cys Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr
1 5 10 15

Val Ile Leu Gly Val Leu
20

<210> 59
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> MelanA 26-40 A/L

<400> 59

Cys Gly Gly Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> MelanA 26-35-C

<400> 60

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Gly Gly Cys
1 5 10

<210> 61
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sequence of vector pAb185

<400> 61
tctagattaa cccaacgcgt aggagtcagg ccatg 35

<210> 62
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N terminal glycine serine linkers

<220>

<221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> Glycine can be repeated from zero to five times

<220>

<221> REPEAT

<222> (3)..(3)

<223> Glycine can be repeated from zero to ten times

<220>

<221> REPEAT

<222> (4)..(4)

<223> Serine can be repeated from zero to two times

<220>

<221> REPEAT

<222> (5)..(9)

<223> These residues can be repeated from zero to three times as a group

<400> 62

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C terminal glycine serine linkers

<220>

<221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> Glycine can be repeated from zero to ten times

<220>

<221> REPEAT

<222> (2)..(2)

<223> Serine can be repeated from zero to two times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(7)
 <223> These residues can be repeated from zero to three times as a group

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (8)..(8)
 <223> Glycine can be repeated from zero to eight times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (10)..(10)
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<400> 63

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly
 1 5 10

<210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Glycine serine linker

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> N-terminal gamma1

<400> 65

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
 1 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal gamma 1

<400> 66

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Cys	Gly
1				5				10	

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal gamma 3

<400> 67

Cys	Gly	Gly	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala
1				5					10					15	

Pro

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal gamma 3

<400> 68

Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys Gly

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal glycine linker

<400> 69

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal glycine linker

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal glycine-lysine linker

<400> 71

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal glycine-lysine linker

<400> 72

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
1 5

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal linker 1

<400> 73

Cys Gly Lys Lys Gly Gly

1 5

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal linker 2

<400> 74

Cys Gly Asp Glu Gly Gly

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal liker

<400> 75

Gly Gly Lys Lys Gly Cys

1 5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal linker 2

<400> 76

Gly Gly Glu Asp Gly Cys

1 5

<210> 77
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> C-terminal linker 3

<400> 77

Gly Gly Cys Gly
 1

<210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met
 1 5

<210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81

Cys Gly Gly Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met
1 5 10

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met Gly Gly Cys
1 5 10

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Cys Gly Gly Gly Ser Glu Glu Ile Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala
1 5 10 15

Thr Leu

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Glu Ala Met Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

Glu Met Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

Tyr Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89

Phe Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe
1 5

<210> 91
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 91

Met Pro Arg Glu Asp Ala His Phe Ile Tyr Gly Tyr Pro Lys Lys Gly
1 5 10 15

His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile
20 25 30

Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu Ile Gly Cys Trp Tyr Cys
35 40 45

Arg Arg Arg Asn Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val
50 55 60

Gly Thr Gln Cys Ala Leu Thr Arg Arg Cys Pro Gln Glu Gly Phe Asp
65 70 75 80

His Arg Asp Ser Lys Val Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val
85 90 95

Val Pro Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser
100 105 110

Pro Pro Pro Tyr Ser Pro
115

<210> 92
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CSPKSL-MelanA 26-35 A/L

<400> 92

Cys Ser Pro Lys Ser Leu Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10 15

<210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MelanA 26-40-C A/L

<400> 93

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Gly
1 5 10 15

Gly Cys

<210> 94

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MelanA 1-118 A/L

<400> 94

Met Pro Arg Glu Asp Ala His Phe Ile Tyr Gly Tyr Pro Lys Lys Gly
1 5 10 15

His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile
20 25 30

Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu Ile Gly Cys Trp Tyr Cys
35 40 45

Arg Arg Arg Asn Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val
50 55 60

Gly Thr Gln Cys Ala Leu Thr Arg Arg Cys Pro Gln Glu Gly Phe Asp
65 70 75 80

His Arg Asp Ser Lys Val Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val
 85 90 95

Val Pro Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser
 100 105 110

Pro Pro Pro Tyr Ser Pro
 115