(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0027211
(43) 공개일자 2014년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/08 (2006.01) *A61K 39/13* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7029186
(22) 출원일자(국제) 2012년04월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년11월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/032190
(87) 국제공개번호 WO 2012/138774
국제공개일자 2012년10월11일
(30) 우선권주장
61/471,553 2011년04월04일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 아이오와 리써치 파운데이션
미국 52242-5500 아이오와주 아이오와 씨티 길모어 홀 6 캐피톨 스트리트 112 엔.
(72) 발명자
비숍, 게일
미국 52242-5500 아이오와주 아이오와 시티 유니버시티 캐피톨 센터 2660 아이오와 센터스 포 엔터프라이즈
반덴 부쉬, 토니
미국 52242-5500 아이오와주 아이오와 시티 유니버시티 캐피톨 센터 2660 아이오와 센터스 포 엔터프라이즈
(74) 대리인
김영, 양영준

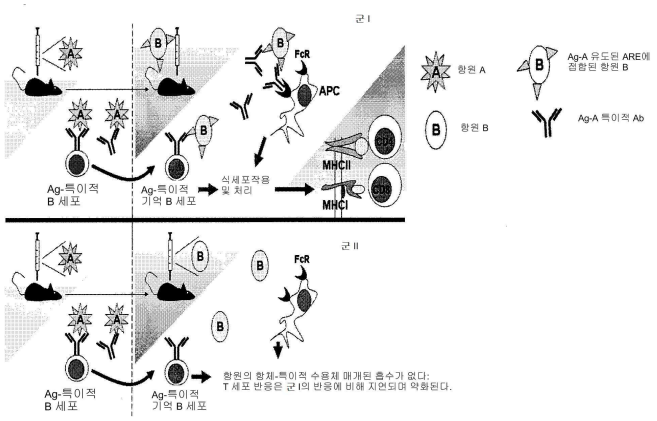
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **백신 면역원성의 개선 방법**

(57) 요 약

본 발명은 기존 체액 반응을 활용하여 백신 효능을 향상시키는 "면역 뱅킹"으로 지칭되는 과정을 제공한다. 상기 과정은 기존 항체 반응에 의해 인식되는 분자 마커를 사용하여 신규한 항원을 태그하는 것을 포함한다. 태그된 백신 성분의 이러한 인식은 신규한 백신에 대한 후천성 면역 반응을 향상시킨다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함하는, 길이가 약 11-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프.

청구항 2

제1항에 있어서, 길이가 약 18-28개 아미노산이고, IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함하는 VP-1 에피토프.

청구항 3

제1항에 있어서, 본질적으로 IPALTAVETGA (서열: 1)로 이루어진 VP-1 에피토프.

청구항 4

제1항에 있어서, IPALTAVETGA (서열: 1)로 이루어진 VP-1 에피토프.

청구항 5

ALTAVETGAT (서열: 3)을 포함하는, 길이가 약 11-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프.

청구항 6

제5항에 있어서, 길이가 약 18-28개 아미노산이고, ALTAVETGAT (서열: 3)을 포함하는 VP-1 에피토프.

청구항 7

제5항에 있어서, 본질적으로 ALTAVETGAT (서열: 3)로 이루어진 VP-1 에피토프.

청구항 8

제5항에 있어서, ALTAVETGAT (서열: 3)로 이루어진 VP-1 에피토프.

청구항 9

제5항에 있어서, 길이가 18-28개 아미노산이고, AHSKEIPALTAVETGATA (서열: 2)를 포함하는 VP-1 에피토프.

청구항 10

제5항에 있어서, 본질적으로 AHSKEIPALTAVETGATA (서열: 2)로 이루어진 VP-1 에피토프.

청구항 11

제5항에 있어서, AHSKEIPALTAVETGATA (서열: 2)로 이루어진 VP-1 에피토프.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합되어 있는 적어도 1개의 항원을 포함하는 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 항원이 알파-Gal 연결의 수단에 의해 ARE에 결합된 것인 화합물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 항원이 링커 분자의 수단에 의해 ARE에 결합된 것인 화합물.

청구항 15

제14항에 있어서, 링커 분자가 포름알데하이드, 글루타르알데하이드, MBS (m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신

이미드 에스테르) 및/또는 술포-MBS인 화합물.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 감염원 항원인 화합물.

청구항 17

제16항에 있어서, 감염원이 박테리아제, 진균제, 기생충제, 바이러스제 또는 프리온제인 화합물.

청구항 18

제17항에 있어서, 감염원이 박테리아제인 화합물.

청구항 19

제17항에 있어서, 감염원이 바이러스제인 화합물.

청구항 20

제12항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 암 항원인 화합물.

청구항 21

제12항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 추가로 항체와 결합하여 항체:항원 복합체를 형성한 것인 화합물.

청구항 22

제21항에 있어서, 항체가 인간 항체 또는 인간화 항체인 화합물.

청구항 23

제22항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 화합물.

청구항 24

제23항에 있어서, 항체가 완전히 인간화 항체인 화합물.

청구항 25

제21항에 있어서, 항체가 단일쇄 Fv 또는 scFv 단편인 화합물.

청구항 26

제12항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 합텐이 항원에 작동가능하게 연결되어 합텐화된 항원을 형성한 것인 화합물.

청구항 27

제26항에 있어서, 합텐이 추가의 항원에 작동가능하게 연결된 것인 화합물.

청구항 28

접합 분자에 작동가능하게 연결된 제12항 내지 제27항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 복합체.

청구항 29

제28항에 있어서, 접합 분자가 항원 또는 ARE이 아닌 펩티드, 핵산 또는 폴리사카라이드이 복합체.

청구항 30

제12항 내지 제27항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제28항 또는 제29항의 복합체, 및 생리학상-허용되는 비-독성 비히클을 포함하는 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 32

제30항 또는 제31항의 조성물을 사전-면역화 동물 내로 도입시키는 단계를 포함하는, 사전-면역화 동물에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 조성물의 도입이 사전-면역화 후 적어도 15일 후에 발생하는 것인 방법.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 제30항 또는 제31항의 제2 조성물을 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 반복 용량의 제30항 또는 제31항의 조성물을 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 인간인 방법.

청구항 37

제30항 또는 제31항의 조성물을 사전-면역화 동물 내로 도입시키는 단계를 포함하는, 사전-면역화 동물에서 항원에 특이적인 항체를 생성하는 방법.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 용량의 제30항 또는 제31항의 조성물을 동물 내로 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제30항 또는 제31항의 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법.

청구항 40

제30항 또는 제31항의 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 감염 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료 방법.

청구항 41

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 정제된 항원을 포함하는, 감염원 또는 암의 예방적 또는 치유적 치료에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 42

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 정제된 항원을 포함하는, 포유동물에서의 감염원 또는 암의 치료에 유용한 의약의 제조를 위한 화합물.

청구항 43

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 항원을 포함하는 화합물로서, 여기서, 항원이 인플루엔자 A H5N1 (A/인도네시아/5/2005(H5N1)) 진뱅크 단백질 등록번호 #ABI36003로부터의 뉴클레오캡시드 단백질 (NP)이고, ARE가 NP에 직접 공유 결합되어 있는 것인 화합물.

청구항 44

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 항원을 포함하는 화합물로서, 여기서, 항원이 인플루엔자 A H1N1 (A/푸에르토 리코/8-V24/1934 (H1N1)) 진뱅크 등록번호 ADY00024.1로부터의 뉴클레오캡시드 단백질 (NP)이고, ARE가 NP에 직접 공유 결합되어 있는 것인 화합물.

청구항 45

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 항원을 포함하는 화합물로서, 여기서, 항원이 인플루엔자 A H1N1 (A/푸에르토 리코/8-V24/1934(H1N1)) 진뱅크 등록번호 ADY00020.1로부터의 헤마글루티닌 단백질 (HA)이고, ARE가 NP에 직접 공유 결합되어 있는 것인 화합물.

청구항 46

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 항원을 포함하는 화합물로서, 여기서, 항원이 B형 간염 바이러스로부터의 B형 간염 표면 항원 (HBsAg)이고, ARE가 NP에 직접 공유 결합되어 있는 것인 화합물.

청구항 47

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프인 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 1종 이상의 항원을 포함하는 화합물로서, 여기서, 항원이 인플루엔자 A H5N1 (A/인도네시아/5/2005(H5N1)) 진뱅크 단백질 등록번호 #ABI36003으로부터의 뉴클레오캡시드 단백질 (NP)이고, ARE가 TNP에 직접 공유 결합되어 있는 것인 화합물.

청구항 48

항원을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 VP-1 에피토프를 코딩하는 핵산.

청구항 49

제48항의 핵산에 인접하여 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트.

청구항 50

제49항에 있어서, 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 발현 카세트.

청구항 51

제49항에 있어서, 프로모터가 유도성 프로모터인 발현 카세트.

청구항 52

제49항에 있어서, 프로모터가 CMV, RSV, EFa-1 또는 T7 프로모터인 발현 카세트.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항의 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 54

제53항에 있어서, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터인 벡터.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **본 발명의 우선권**

[0002] 본원은 2011년 4월 4일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/471,553을 우선권으로 주장한다. 이 가출원의 전체 내

용은 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] **발명의 배경**

[0004] 면역계는 매우 복잡하며, 유기체가 감염성 병원체 및 암 세포와 싸우기 위한 매우 다양한 경로를 포함한다. 일반적으로, 면역계는 체액성 면역 반응 (HIR) 및/또는 세포-매개 면역 반응 (CMI)을 시작할 수 있는 것으로 여겨진다. HIR은 B 림프계의 세포 (B-세포)에서 생성된 항체의 생성 및 분비를 포함한다. 분비된 항체는 침윤 미생물 (예컨대 바이러스 또는 박테리아)의 표면에서 항원에 결합한다. 이어서, 항체-결합된 항원은 면역계에서 다양한 세포에 의해 파괴된다. 또한, 체액성 면역은 항체 생성 및 그를 동반하는 부수적인 방법을 의미한다. 또한, 이는 항체의 이펙터 기능을 의미하며, 이는 병원체 및 독소 중화, 고전적인 보체 활성화, 및 식세포작용 및 병원체 제거의 옵소닌 촉진을 포함한다.

[0005] 제2 유형의 면역 반응은 세포-매개 면역 (CMI)이다. CMI는 항체 또는 보체를 포함하지 않는 대신 다양한 면역세포, 예컨대 대식세포, 자연 킬러 세포 (NK), 항원-특이적 세포독성 T-림프구의 활성화, 및 항원에 대한 반응에서의 다양한 시토카인의 방출을 포함하는 면역 반응이다. 세포 면역은 항원-특이적 T-림프구의 활성화에 의해 몸체를 보호할 수 있다. 이들 세포는 외래 항원의 에피토프를 그의 표면에 내보이는 몸체 세포, 예컨대 바이러스-감염된 세포, 세포내 박테리아로 감염된 세포, 및 종양 항원을 내보이는 암 세포에서의 아폽토시스를 유도한다. T 세포는 대식세포 및 자연 킬러 세포를 활성화하여, 이들이 세포내 병원체를 파괴할 수 있도록 하며, 세포가 후천성 및 선천성 면역 반응에 연루되는 다른 세포의 기능에 영향을 미치는 다양한 시토카인을 분비하는 것을 자극한다. 주로, 세포-매개 면역은 식세포에서 생존하는 미생물 및 비-식세포를 감염시키는 미생물을 겨냥한다. 이는 바이러스-감염된 세포의 제거에 가장 효과적이나, 진균, 원충, 암 및 세포내 박테리아에 대한 방어에도 관여한다.

[0006] 전통적으로, 세계 보건 기구에 의해 정의된 것과 같이, 백신은 항체의 생성을 자극하여 질환에 대한 면역을 생성하도록 하는 임의의 제조물이다. 백신에는 예를 들어 사멸 또는 약독화된 미생물의 현탁액, 또는 미생물의 생성물 또는 유도체가 포함된다. 백신을 투여하는 가장 흔한 방법은 접종에 의한 것이지만, 일부는 구강 또는 비강 스프레이에 의해 주어진다.

[0007] 현재의 백신 기법은 큰 용량의 항원 및/또는 재-백신접종 (증강 주사(booster shot))에 의존하며, 모든 감염원에 대한 보호를 부여하지는 않는다. 그러므로, 현재 효과적인 백신이 없는 감염원에 대한 보호를 부여하기 위한 신규한 백신에 대한 필요가 존재한다. 또한, 투여하기에 보다 안전하고/거나, 제조하기에 저비용이고/거나, 증강 주사를 요구하지 않는 신규한 백신에 대한 필요가 존재한다. 증강 주사의 배제는 면역화 순응성을 증가시킬 것이다. 마지막으로, 일부 인간 집단, 예컨대 중장년층 집단은 백신접종에 대해 전반적으로 보다 약한 반응을 얻으며, 보다 효과적인 백신은 이러한 백신 수용자의 성장 카테고리를 보다 잘 보호할 수 있다.

발명의 내용

[0008] **발명의 개요**

[0009] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체-인식 에피토프 (ARE, 또한 "항체 인식 요소" 또는 "항체 반응성 에피토프"로도 지칭됨)에 공유 결합되어 있는 적어도 1개의 항원을 포함하는 화합물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함하는, 길이가 약 11-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프를 제공한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 길이가 약 18-28개 아미노산이고, IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 IPALTAVETGA (서열: 1)로 본질적으로 이루어져 있거나, 또는 IPALTAVETGA (서열: 1)로 이루어져 있다.

[0010] 특정 실시양태에서, 에피토프는 길이가 약 11-28개 아미노산이고, ALTAVETGAT (서열: 3)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 ALTAVETGAT (서열: 3)을 포함하는, 길이가 약 18-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프를 제공한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 ALTAVETGAT (서열: 3)으로 본질적으로 이루어져 있거나, 또는 ALTAVETGAT (서열: 3)으로 이루어져 있다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 길이가 18-28개 아미노산이고, AHSKEIPALTAVETGATA (서열: 2)를 포함하거나, AHSKEIPALTAVETGATA (서열: 2)로 본질적으로 이루어져 있거나, 또는 AHSKEIPALTAVETGATA (서열: 2)로 이루어져 있다.

[0011] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합되어 있는 적어도 1개의 항원을 포함하는

화합물을 제공하며, 여기서 ARE는 상기 기재된 VP-1 에피토프이다. 특정 실시양태에서, 항원은 알파-Gal 연결의 수단에 의해 ARE에 결합된다. 특정 실시양태에서, 항원은 링커 분자의 수단에 의해 ARE에 결합된다. 특정 실시양태에서, 링커 분자는 포름알데하이드, 글루타르알데하이드, MBS (m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르) 및/또는 술포-MBS이다. 특정 실시양태에서, 항원은 감염원 항원이다. 특정 실시양태에서, 감염원은 박테리아제, 진균제, 기생충제, 바이러스제 또는 프리온제이다. 특정 실시양태에서, 감염원은 박테리아제 또는 바이러스제이다. 특정 실시양태, 항원은 암 항원이다.

[0012] 특정 실시양태에서, 항원은 추가로 항체와 접합되어, 항체:항원 복합체를 형성한다. 본원에서 사용되는 용어 "항체"에는 scFv, 인간화, 완전 인간 또는 키메라 항체, 단일쇄 항체, 디아바디, 및 항체의 항원-결합 단편 (예를 들어, Fab 단편)이 포함된다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일쇄 Fv 또는 scFv 단편이다.

[0013] 특정 실시양태에서, 합텐은 항원에 작동가능하게 연결되어, 합텐화된 항원을 형성한다. 특정 실시양태에서, 합텐은 추가의 항원에 작동가능하게 연결된다.

[0014] 특정 실시양태에서, 본 발명은 접합 분자에 작동가능하게 연결된 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 접합된 적어도 1개의 항원을 포함하는 화합물을 포함하는 복합체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 접합 분자는 항원 또는 ARE가 아닌 펩티드, 핵산 또는 폴리사카라이드이다.

[0015] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체-인식 에피토프 (ARE)에 접합된 적어도 1개의 항원을 포함하는 화합물 및 생리학상-허용되는 비-독성 비히클을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 아주반트를 추가로 포함한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 조성물을 사전-면역화 동물 내로 도입시키는 단계를 포함하는, 사전-면역화 동물에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 조성물의 도입은 사전-면역화 후 적어도 15일 후에 발생한다. 특정 실시양태에서, 방법은 상기 기재된 제2 조성물의 도입을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 방법은 반복 용량의 조성물을 도입시키는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 동물은 인간이다.

[0017] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 조성물 또는 복합체를 동물 내로 도입시키는 단계를 포함하는, 항원에 특이적인 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 방법은 제2 용량의 조성물 또는 복합체를 동물 내로 도입시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 조성물 또는 복합체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법을 제공한다.

[0019] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 조성물 또는 복합체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 감염 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0020] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체-인식 에피토프 (ARE)에 접합된 적어도 1개의 항원을 포함하는, 감염원 또는 암의 예방적 또는 치유적 치료에서 사용하기 위한 화합물을 제공한다.

[0021] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체-인식 에피토프 (ARE)에 접합된 적어도 1개의 항원을 포함하는, 포유동물에서의 감염원 또는 암의 치료에 유용한 의약의 제조를 위한 화합물을 제공한다.

[0022] 본 발명은 항체-인식 에피토프 (ARE)에 공유 결합된 적어도 1개의 항원을 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서 항원은 인플루엔자 A H5N1 (A/인도네시아/5/2005(H5N1)) 진뱅크 단백질 등록 번호 #ABI36003로부터의 뉴클레오캡시드 단백질 (NP)이고, ARE는 IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함하는, 길이가 약 11-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프이며, NP에 직접 공유 결합한다.

[0023] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항원을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 상기 기재된 VP-1 에피토프를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0024] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항원을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 상기 기재된 VP-1 에피토프를 코딩하는 핵산에 인접하여 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 조직-특이적 프로모터이다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 CMV, RSV, EFa-1 또는 T7 프로모터이다.

[0025] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 벡

터는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1. Ab-인식 요소 (ARE) 접합된 Ag에 대한 향상된 세포 면역 반응의 제안된 메카니즘. 마우스 군 I 및 II는 Ag-A에 대한 체액 반응을 갖는다. 이어서, 군 I은 Ag-A 유도된 ARE에 접합된 Ag-B로 면역화된다. 반면, 군 II는 비-접합된 Ag-B에 대해 면역화된다. ARE 접합된 Ag-B를 인식하는 Ag-A 특이적 체액 반응은 군 II의 B-특이적 후천성 면역 반응에 비해 군 I의 B-특이적 후천성 면역 반응을 향상시킨다.

도 2는 기억 CD8 T 세포 반응을 나타낸다.

도 3은 마우스에 항원을 주사한 때의 시각표, 및 혈액이 Ag1 및 합텐-특이적 항체에 대한 시험을 위해 수집되는 일자를 나타낸다.

도 4는 분비된 Ig의 역할을 시험하기 위한 시험관내 실험 설계 및 향상된 면역 반응에서의 가용성 Ig의 역할에 대한 생체내 실험 설계를 나타낸다.

도 5는 순차적 ARE-접합 백신접종 및 동시적 ARE-접합 백신접종에 대한 시각표를 나타낸다.

도 6은 ARE 합텐, 2,4,6, 트리니트로페닐 (TNP)에 대한 기존 Ab 반응의 활용인 면역 뱅킹(Immune Banking)이 인플루엔자 유도된 사망에 대한 보호를 제공함을 나타낸다.

도 7은 향상된 반응에서의 가용성 Ag-특이적 이뮤노글로불린의 역할을 나타낸다. KLH 또는 KLH-TNP 면역화된 마우스로부터의 혈청을 TNP 접합된 난백알부민과 함께 인큐베이션하였다. 난백알부민-TNP 및 마우스 혈청 또는 난백알부민-TNP:항체 복합체를 함유하는 생성된 혼합물을 미감작 마우스에 주사하였다 (군 당 3회). 난백알부민 주사 7일 후 ova-특이적 비장 CD8 T 세포의 %를 세포내 시토카인 염색에 의해 측정하였다. ARE로서 TNP를 사용한 면역 복합체의 주사가 백신에 대한 세포 반응을 향상시킨다는 것에 주목한다.

도 8은 ARE 변형된 펩티드 백신의 효능의 측정을 나타낸다. ARE 특이적 항체를 갖는 마우스는 백신접종 및 인플루엔자 접종 이후 보다 낮은 이환율을 나타낸다. 마우스를 가상 백신접종하거나 (명반 + PBS), 또는 인간 백신을 사용하여 B형 간염에 대해 면역화하였다 (명반 중의 HBsAg). 시험 군에서의 HBsAg로의 혈청-전환 직후에, 두 군의 마우스에 간염 ARE 태그 부착된 인플루엔자 핵단백질 백신 (인플루엔자의 핵단백질 -NP-에 공유 연결된 HepPep-)을 투여하였다. 이어서, 두 군에 병독성 인플루엔자를 접종하고, 체중감소에 의해 이환율을 측정하였다. HepPep-ARE 태그 부착된 백신 군은 대조군 군에 비해 보다 낮은 이환율을 나타낸다.

도 9는 HBsAg에 화학적으로 연결되며 면역 복합체로서 주어지는 VP-1 ARE의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 서브유닛 백신의 면역원성을 증가시키는 기술의 개발은 건강 전문가, 군인 및 일반 대중의 주요 관심사이다. 항원의 면연원성을 증가시키는 능력은 현행 백신을 개선하고, 신규한 백신의 개발을 향상시켜, 감염 관련 이환율 및 사망률을 감소시킨다. 감염성 질환과 싸우는 것뿐만 아니라, 백신 개발의 진보는 각각 면역요법 및 면역개입을 통해 암 환자 및 화학물질 의존성을 겪는 이들에게 유익하다 (예를 들어, 코카인과 같은 활성 화학물질에 대한 백신접종).

[0028] 성공적인 면역화는 B 림프구 ("B 세포"로도 지칭됨)를 비롯한 후천성 면역 세포를 활성화시킨다. B 세포 활성화는 클론 확장 및 오래 생존하는 Ab 생성 세포 (형질 세포) 및 기억 B 세포로의 분화를 유도한다. 따라서, 면역화된 개체는 가용성 Ab를 발현하고, 기억 B 세포를 유지하며, 이들 각각은 원래의 백신 내에 함유된 특정 Ag를 인식할 수 있다.

[0029] 특정 실시양태에서, 본 발명은 기존 체액 반응을 활용하여 백신 효능을 향상시키는 "면역 뱅킹"으로 지칭되는 과정을 제공한다. 면역 뱅킹 과정은 개체 내 기존 항체 반응에 의해 이미 인식된 분자 마커를 사용하여 신규한 항원을 태그하는 것을 포함한다. 태그된 백신 성분의 이러한 인식은 신규한 백신에 대한 후천성 면역 반응을 향상시킨다. 이전 백신 기술은 고용량의 항원 및/또는 재-백신접종 (증강 주사)에 의존하였고, 모든 감염원에 대한 보호를 제공하지 않았다. 면역 뱅킹 과정은 백신의 효능을 향상시킬 수 있으므로, 이를 이용하여 현행 백신에 대한 용량 요건을 낮춰 제조 비용을 감소시킬 수 있으며, 증강 주사에 대한 필요성을 감소시킬 수 있다 (이는 면역화 순응도를 증가시킴). 또한, 면역 뱅킹 과정은, 아직 백신이 존재하지 않는 최근 발생한 감염원 및 암과 싸우는 신규한 백신의 생성을 가능하게 한다. 또한, 이 과정은 연구용 또는 임상 치료용 모노클로날

및 폴리클로날 항체의 생산을 향상시킨다. 따라서, 면역 뱅킹 기술은, 인간 및 동물 둘 다에 대한 백신 생산자, 실험 연구용 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 생산하는 생명공학 회사, 및 질환 치료용 모노클로날 항체를 생산하는 제약 회사가 큰 관심을 갖는 기술이다.

[0030] 특정 실시양태에서, 본 발명은 백신 반응의 효능을 확대하여 특정 백신에 반응하는 사람의 수를 많게 한다. 또한, 이는 신생아에서 백신의 유효성을 증가시킨다. 이 과정을 이용하여, 다가 백신접종 또는 "증강 주사"를 위한 요건, 고용량의 백신 성분 요구, 신생아 백신접종 불가, 특정 감염원에 대해 보호하는 효과적인 백신 생산의 어려움, 및 암에 대항하여 보호하는 백신 제조를 위한 도전을 비롯한 현행 백신 사용에서의 여러 문제점을 극복한다. 여러 연구에서, 항원 (Ag)을 면역 세포에 대해 표적화하거나 지정하여 백신의 효능을 증가시키는 것이 상기 문제의 해결을 도울 것이라는 점이 제시되었다. 면역 세포에 대한 항원 표적화는 실험실 환경에서 Ag와 세포-특이적 리간드 또는 세포-특이적 항체와의 접합에 의해 수행되었지만, 이러한 백신의 대규모 생산 및 개발은 비용 면에서 꺼려지며, 상당한 기술적 장벽에 직면하게 된다. 따라서, 백신 항원을 항원 제시 세포 (APC)에 대해 표적화하는 간단하고, 효과적이며, 비용 효율적인 방식이 최선이다. 면역 뱅킹 과정은 기존의 체액성 면역 반응을 이용하여 백신 항원을 면역 세포에 대해 표적화거나 지정함으로써 백신에 대한 면역 반응을 향상시켜 상기 목표를 달성한다.

[0031] 본 발명의 특정 실시양태에서, 동물 (예를 들어, 인간)은 공지된 항원에 대해 사전-면역화되어 초기 면역 반응을 일으킨다 (즉, 백신이 투여되고, 동물의 면역계는 면역 반응을 시작함). 이어서, 사전-면역화된 동물에게 항체-인식 에피토프 (ARE)에 접합된 1종 이상의 항원을 포함하는 화합물을 투여한다. 면역 뱅킹은, 동물 및 인간이 모두 통상 공지된 항원으로 백신접종되었다는 사실을 기반으로 한다. 특정 실시양태에서, 면역 뱅킹 백신은 합텐화된 항원으로 변형되고, 특정 상황에서 면역 뱅킹 백신은 이에 접합된 추가 항원을 갖는다. 특정 실시양태에서, ARE는 IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함하는, 길이가 약 11-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프이다. 특정 실시양태에서, ARE는 알파-Gal 연결에 의해 항원에 접합된다.

[0032] **기존 체액 반응을 활용한 백신 면역원성의 개선**

[0033] 백신 면역원성의 증가는 현재 이용가능한 백신을 개선하고, 신규한 백신의 개발을 촉진시켜 감염 관련 이환율 및 사망률을 감소시킨다. Ag와 항원-제시 세포 (APC)-특이적 리간드 또는 Ab와의 접합에 의한 APC 표적화 백신은 증가된 면역원성을 나타낸다. 그러나, 이러한 백신의 대규모 생산 및 개발은 비용 및 기술적 장벽에 직면하게 된다. 백신 Ag를 APC에 대해 표적화하는 간단하고, 효과적이며, 비용 효율적인 방식이 존재하지 않는다. 성공적인 면역화는 B 세포를 활성화시켜 클론 확장 및 오래 생존하는 Ab 생성 형질 세포 및 기억 B 세포로의 분화를 유도한다. 따라서, 면역화된 개체는 가용성 Ab 및 기억 B 세포를 가지며, 이들 각각은 원래의 백신으로부터의 Ag를 인식할 수 있다. 본 발명자들은 하나의 면역화로부터의 ARE를 이용하여 신규한 Ag를 변형함으로써, 기존의 B 기억 반응을 활용하여 이를 APC에 대해 표적화한다. APC에 대해 표적화된 특이적 Ag는 기존의 체액성 면역 반응을 이용하고, 백신의 면역원성을 개선한다. 이는 백신 효능을 증가시키고, 반복 면역화에 대한 필요성을 감소시킨다.

[0034] 기존의 Ab에 의한 신규한 Ab 반응의 조절, 즉 Ab 피드백 조절로 공지된 현상은 1892년에 에밀 본 베르힝(Emil von Berhing)에 의해 최초 기재되었다 (문헌 [Hjelm, F., et al. 2006. Scand J Immunol 64:177-184]). 실험 모델에 따라 신규한 Ab 반응의 조절은 양성 (향상됨) 또는 음성 (저해됨)일 수 있다 (문헌 [Heyman, B. 2000. Annu Rev Immunol 18:709-737]). 완전히 알려지지는 않았지만, 향상 메카니즘은 Ab:Ag 복합체의 FcR 매개 흡수, 및 이어서 APC에 의한 Ag의 CD4 T 세포로의 제시에 의존적인 것으로 여겨진다. 이어서, 이들 T 세포는 신규한 Ag-특이적 B 세포에 "도움"을 제공할 수 있고, 이로써 Ab 반응을 향상시킨다 (문헌 [Heyman, B. 2000. Annu Rev Immunol 18:709-737]; [Getahun, A., and B. Heyman. 2006. Immunol Lett 104:38-45]). 흥미롭게도, T 림프구가 관여하는 것으로 100여년에 걸쳐 논의되고 여겨졌지만, CD4 및 CD8 T 세포 반응에 대한 Ab 피드백 조절의 효과는 측정되지 않았다. 본원에 약술된 실험은 신규한 Ag에 대해 발생하는 T 세포 반응에 대한 기존의 체액 반응의 효과 및 신규한 면역화 향상 전략으로서의 잠재적 유용성을 평가한다.

[0035] **도 1**은 ARE 접합된 Ag에 대한 향상된 세포 면역 반응의 제안된 메카니즘을 제공한다. 마우스 군 I 및 II는 Ag-A에 대해 체액 반응을 갖는다. 군 I은 Ag-A 유래 ARE에 접합된 Ag-B로 면역화된다. 군 II는 비-접합된 Ag-B에 대해 면역화된다. ARE-접합된 Ag-B를 인식하는 Ag-A 특이적 체액 반응은 군 II에 비해 군 I의 림프구-특이적 후천성 면역 반응을 향상시킨다.

[0036] **표 1** 및 **도 2**는, ARE에 대한 기존의 체액 반응이 ARE-접합된 신규 면역원에 대한 CD8 T 세포 반응을 향상시켰음을 나타낸다.

[0037] <표 1>

1차 면역화

2차 면역화	KLH	KLH-TNP
Ova	검출되지 않음	검출되지 않음
Ova-TNP	검출되지 않음	**양성 반응**

[0038]

[0039] **신규한 Ag에 대한 후천성 면역 반응을 향상시키는데 있어서 기존의 Ab 반응의 역할**

[0040] 먼저, 체액성 면역-향상된 T 및 B 세포 반응의 동역학을 측정한다. 백신 효능의 척도인 지속적인 Ag-특이적 Ab는 B 세포 활성화로 인한 것이며, 이는 오래 생존하는 Ab 생성자를 발생시킨다. Ab는 Ag의 옵소닌화를 통해 부분적으로 면역 보호를 제공하고, 이는 FcR을 발현하는 면역 세포에 의해 그의 식세포작용을 용이하게 한다. 내재화된 Ag는 처리되어 T 림프구에 대해 제시된다. 백신접종에 대한 미감작 B 세포의 1차 반응을 정량화하기 위해서, 5마리의 C57Bl/6 마우스 군을 TNP-KLH 또는 대조군 Ag (KLH, KLH-NP, BSA-TNP)로 주사하였다. 제0일에 혈청을 수집한 후, 접합된 또는 비-합텐화된 Ag - KLH, KLH-NP, KLH-TNP, BSA-TNP 또는 PBS 단독으로 복강내 (i.p.) 면역화하고, 제14일에 증강 면역화한다. 제14일에 시작하여 3일 마다 혈청을 수집하고, 사전-면역화 혈청과 함께 합텐 및 담체 특이적 IgM 및 IgG에 대해 시험한다 (하기 "일반적 방법" 참조). Ag-특이적 Ab가 2차 면역화 후에 생성되지 않았다면, 3차 Ag 주사를 제28일에 제공한 후, 3일 마다 혈청에서 Ag 특이적 Ab를 측정한다 (**도 3** 참조).

[0041] **도 2**는 신규한 Ag에 대한 T 세포 반응이 기존의 Ab 반응에 의해 인식될 때 향상된다는 것을 나타낸다 (**도 1** 모델). 향상된 면역 반응의 동역학 및 표현형을 대조군 면역화를 받은 마우스의 것과 비교한다. 체액-향상 반응 대 체액-비-향상 반응의 Ag-특이적 반응 및 동역학의 두 피크 수준을 비교하기 위해서, KLH-TNP 또는 대조군 Ag로 사전-면역화된 마우스에 ova-TNP를 복강내 (i.p.) 투여한다. ova-면역화 후 2일 마다 혈청을 수집하여 ova-특이적 Ab를 평가하고 (ELISA), 혈청 시토카인을 모니터링한다 (시토카인 멀티플렉스). 순환하는 Ag-특이적 T 세포의 수준이 복강내 (i.p.) 면역화 후 비교적 낮아지므로, 배액 기관기관지 (TB) LN을 3마리의 마우스/군/시간으로부터 단리하여 T 림프구 반응을 평가하는데 사용한다. LN 세포를 6 및 24시간 동안 CD4 및 CD8 면역우성 펩티드 (표 2, 하기 "일반적 방법" 참조)의 존재 또는 부재 하에 배양한다. 6시간 동안 인큐베이션한 세포를, T 림프구 반응을 나타내는 계통 특이적 마커 (CD4 및 CD8) 및 세포내 IFN-γ에 대해 유동 세포측정법으로 분석한다. 24시간 샘플로부터의 상등액을 루미넥스(Luminex)® 멀티플렉스를 이용하여 다수의 시토카인에 대해 분석한다.

[0042] 체액 향상 반응을 유도하는 독특한 ARE 면역화와 신규한 Ag에 대한 노출 사이에 필요한 최소 시간을 측정한다. 상기 모델을 이용하여, TNP-특이적 Ab가 KLH-TNP 면역화 마우스의 혈청에서 발견된 후 제1일에 Ova-TNP를 사용한 면역화를 시작한다. 항-TNP Ab 반응이 피크에 도달할 때까지 사전-면역화 마우스를 제15일에 출발하여 3일 마다 Ova-TNP 주사 시간에 기초하여 군으로 나눈다. 향상된 반응을 관찰하는데 필요한 합텐-증강 및 2차 Ag 주사 사이의 최소 시간을 측정하여 최적의 백신접종 전략을 개발한다.

[0043] **향상된 반응에서 가용성 Ag-특이적 이뮤노글로불린의 역할**

[0044] T 세포 반응에 대한 체액 반응의 기여는 명확하게 알려지지 않았다. Ag에 대한 활성 체액 반응은 원래의 면역원에 접합된 신규한 Ag에 대한 CTL 반응을 향상시킨다 (**도 2**). 이러한 향상된 T 세포 반응은 Ig 의존성 메카니즘를 통한 증가된 Ag 흡수에 기인한 것일 가능성이 크다: 즉 1) APC (DC 및 mϕ) 상의 FcR을 통한 Ig:Ag 복합체 흡수 및 2) 원래의 Ag에 특이적인 기억 B 세포에 의한 Ag 흡수.

[0045] 시험관내 분비된 Ig의 역할을 시험하기 위해서, 합텐-특이적 또는 사전-면역화 혈청을 변형된 형광색소 PE (피코에리트린) 또는 대조군 (TNP-PE, PE 또는 DP-PE; 비-특이적 합텐)과 함께 인큐베이션한다 (**도 4**). WT 및 FcγR-/- 마우스로부터의 BMDC (골수 유래 DC) (문헌 [Takai, T., et al. 1994. Cell 76:519-529])를 PE 분자로 처리한다. BMDC와 결합된 형광 Ag를 유동 세포측정법을 이용하여 정량화한다. MHC:SIINFEKL (서열: 3) 특이적 Ab를 사용하여 MHC:ova-펩티드 발현에 대해 BMDC를 염색하여 Ova 교차 제시를 측정한다. 혈청-흡수된 ova를 마우스에 복강내 (i.p.) 주사하고, 림프구 반응을 모니터링하여 생체내 향상된 면역 반응에서 가용성 Ig의 역할을

측정한다. 혈청 및 TB-LN을 단리하고, 상기 기재된 바와 같이 ova-특이적 Ab, 시토카인 및 계통 특이적 마커에 대해 시험한다. 가용성 Ig의 역할을 FcγR-/- 마우스에서의 면역화를 통해 측정하고, 여기서 FcγRI 및 III은 비기능성이며 (문헌 [Takai, T., et al. 1994. Cell 76:519-529]), 이는 합텐-접합된 또는 Ab-옵소닌화된 Ag의 APC 식균작용을 심하게 손상시킨다 (문헌 [Wernersson, S., et al. 1999. J Immunol 163:618-622]). 반대로, 막 IgM 트랜스제닉 (tg) 마우스 CB-17은 분비될 수 없는 tg IgM H 쇄를 유지한다 (문헌 [Hannum, L. et al. 2000. J Exp Med 192:931-942]). CB-17은 H-쇄 Ig-tg이므로, Ab 레퍼토리가 감소된다. 그러나, λ L 쇄와 함께 H-쇄 mIgM의 발현은 합텐 NP의 인식을 제공하여, 2 내지 4%의 NP 특이적 B 세포를 생성한다 (문헌 [Hannum, L. et al. 2000. J Exp Med 192:931-942]; [Levine, M. et al. 2000. Proc Natl Acad Sci U S A 97:2743-2748]). CB-17을 이용하여 체액-향상 면역화에서 APC로서의 Ag-특이적 B 세포의 역할을 측정한다. 각 경우에, 돌연변이체 마우스 및 대조군을 초기에 KLH-NP 면역화한 후에, Ova-NP 면역화하고, Ova-특이적 반응을 분석한다. CB-17 마우스는 Ab를 분비하지 않으므로 혈청 Ig에 대해 시험되지 않는다. CB-17 및 FcγR-/- 마우스는 둘 다 상업적으로 입수가능하다.

[0046] **ARE-변형된 신규한 Ag를 사용한 반복 면역화의 면역 효과의 측정**

[0047] ARE Ab의 지속적인 생성은 조절 B 세포 분화/증대, 억제 FcγRIIb와의 상호작용, 또는 면역-복합체 제거를 통한 신규한 ARE 접합된 Ag에 대한 차폐 반응으로 인해 유해할 수 있다. 이들 실험은 동시에 또는 연속적으로 신규한 ARE 접합된 Ag에 대한 체액-향상 반응의 잠재적 한계를 확인한다 (**도 5**). 마우스를 KLH-TNP에 대해 1차 면역하고 (상기 기재된 바와 같음), 이어서 최대 T 세포 반응이 측정된 시점에 Ova-TNP에 대해 면역화한다. 다음에, BSA-TNP, 및 이어서 HEL-TNP가 면역원이 된다. 각각의 신규한 Ag 후에, 투여된 모든 면역원에 대한 T 세포 반응을 모니터링하고, 미감작 대조군 면역화된 마우스와 3일 간격으로 비교한다. ova에 대한 Ag-특이적 T 세포 반응은 규정된 MHC 클래스 I 및 II 펩티드를 이용한 세포내 염색 (ICS)으로 측정한 반면에, B6 마우스에 대한 PCC 및 HEL 면역우성 펩티드는 공지되지 않아, PCC 및 HEL-특이적 T 세포의 계수는 Ag 제시 BMDC를 이용한다. 다가 백신은 1회 투여량으로 다수의 병원체에 대한 보호를 제공한다. 모든 ARE-변형된 Ag에 대한 향상된 후천성 면역이 다수의 ARE-접합된 Ag가 동시에 제공되는 경우에 관찰되는지 여부를 측정한다. KLH-TNP로 면역화한 후, 마우스에 Ova-TNP, HEL-TNP 및 PCC-TNP를 함유한 다가 백신을 투여한다. 대조군에는 비-접합된 Ova, HEL 및 PCC에 대한 백신을 투여한다. 반응의 ARE-독립적인 증폭에 대한 추가 대조군으로서, KLH-TNP 면역화된 마우스의 군에 Ova-TNP, PCC-TNP 및 비-접합된 HEL을 함유한 다가 백신을 투여한다. 상기 군으로부터의 HEL 특이적 면역 반응과 다른 두 군과의 비교는, 다가 ARE-접합된 백신이 제공되는 경우 ARE-독립적인 후천성 면역 향상이 있는지 여부를 나타낸다.

[0048] 상기 실험은 ARE-접합된 Ag를 인식하는 마우스와 그렇지 않은 마우스 사이의 후천성 면역 반응을 비교한다. **도 2**는 기존의 Ab 반응이 신규한 Ag-접합된 ARE에 대한 CD8 T 세포 반응을 향상시킨다는 것을 나타낸다.

[0049] **ARE 변형된 펩티드 백신의 효능 측정**

[0050] 상기 ARE 전략은 합텐:담체 접합체를 이용한 면역화 또는 이전 면역화로부터 인식되는 에피토프의 사용을 필요로 한다. 다수의 소아 백신의 Ig-면역우성 에피토프는 공지되어 있고, 신규한 Ag에 접합된 ARE로서의 가능성을 갖는다. 다음의 실험은 ARE 접합된 백신 대 비-ARE 백신의 보호 수준 및 관련 인간 ARE 대 합텐의 유용성을 시험한다.

[0051] ARE 변형된 인플루엔자 관련 펩티드의 면역원성. 상기 기재된 모델을 사용하여 마우스를 KLH, KLH-TNP, KLH-파상풍 톡소이드 (TT) 또는 TT 단독으로 면역화한다. 이어서, 각 군을 나누고, TNP 또는 TT-접합된 인플루엔자 단백질 A로 면역화한다. 이어서, 상대적 면역 반응을 인플루엔자-특이적 Ab 역가 (ELISA), 및 Ag-특이적 T 세포 반응으로 측정한다.

[0052] 인플루엔자 감염에 대한 백신-유도된 보호. 치사 비강내 인플루엔자 감염 으로부터의 보호를 위한 전통적인 백신접종과 비교하여 ARE-변형된 것을 시험한다. 1.0X LD50의 H1N1/마우스를 비강내 전달한다. 2일 간격으로, TB-LN으로부터의 T 세포를 인플루엔자 NP Ag로부터의 면역우성 펩티드와의 상호작용 후에 ICS로 모니터링한다 (방법). 폐 바이러스 역가를 조직 g 당 계산한다 (문헌 [Legge, K. L., and T. J. Braciale. 2005. Immunity 23:649-659]). NP-특이적 T 세포 활성 및 Ab에 대해 측정된 향상된 후선성 면역 반응은 TNP 또는 TT 접합된 KLH로 면역화된 마우스에서 예상된다.

[0053] **반복 면역화에 대한 필요성 감소에 있어 ARE 전략의 유효성의 측정**

[0054] ARE 변형으로 유도된 향상된 면역은 증강 주사에 대한 필요성을 감소시켜, 보다 높은 면역화 순응도를 제공할

수 있다. 이는 개체가 종종 백신접종을 위해 장거리 이동을 하는 개발도상국에서 특히 중요하다. 하기 실험은 전통적인 증강 면역화로 얻어진 면역 반응과 ARE 변형된 백신을 사용한 단일 면역화로 얻어진 면역 반응을 비교한다. B형 간염 표면 Ag (HBsAg)를 면역원으로 사용한다. Hep B 백신 (HBsAg 함유)을 이용한 면역화는 3회의 주사를 필요로 한다 (0일, 30일 및 180일). 주사 요법 순응도는 약 68%이고 (문헌 [Trevisan, A., et al. 2006. Am J Infect Control 34:465-466]), 이는 부분적으로 백신접종 사이의 시간으로 인한 것이다.

[0055] 마우스를 상기 기재된 바와 같이 KLH-TNP로 면역화한다. 혈청전환 후, 마우스에 합텐화된 HBsAg 백신 또는 동량의 비-합텐화된 HBsAg 백신을 투여한다. 면역화 후 5일 마다 HBsAg에 대한 B 및 T 세포 반응에 대해 마우스를 모니터링한다. CD4 T 세포 반응은 전체-Ag 맥동(pulsed) BMDC에 대한 ICS로 모니터링한다. CD8 T 세포 반응은 구체적으로 MHC 클래스 I 특이적 펩티드를 사용하여 측정한다.

[0056] T 세포 반응에 대한 ARE 변형된 Hep B 백신의 효과에 관한 정보가 중요하지만, Ab 역가가 Hep B 감염에 대한 보호와 관련이 있어 Ag-특이적 Ab 생산에 중점을 둔다.

[0057] 전통적인 Hep B 면역화에서 필요한 3회의 면역화와 대조적으로, 단일 ARE-접합된 백신 후에 측정가능한 Hep B 특이적 체액 및 세포 반응이 예상된다. 1 내지 2회의 ARE-접합된 Hep B 백신접종 후의 후천성 면역의 수준은 전통적인 전략으로 각각 3회의 백신접종에 의해 생성된 반응과 비교된다.

[0058] **향상된 반응에서 가용성 Ag-특정한 이뮤노글로불린의 역할**

[0059] 요컨대, KLH 또는 KLH-TNP 면역화된 마우스로부터의 혈청을 TNP 접합된 난백알부민과 함께 인큐베이션하였다 (**도 7**). 난백알부민-TNP 및 마우스 혈청 또는 난백알부민-TNP:항체 복합체를 함유하는 생성된 혼합물을 미감작 마우스 (군 당 3마리)에 주사하였다. 난백알부민 주사 7일 후, ova-특이적 비장 CD8 T 세포의 %를 세포내 시토카인 염색으로 측정하였다. ARE로서 TNP를 사용한 면역 복합체의 주사가 백신에 대한 세포 반응을 향상시킨다는 것에 주목한다.

[0060] **ARE 변형된 펩티드 백신의 효능 측정**

[0061] ARE 특이적 항체를 갖는 마우스는 백신접종 및 인플루엔자 항원투여 후 보다 낮은 이환율을 나타낸다 (**도 8**). 마우스를 (명반 + PBS) 가상 백신접종하거나 또는 인간 백신 (명반 중의 HBsAg)을 사용하여 B형 간염에 대해 면역화하였다. 시험 군에서 HBsAg로의 혈청-전환 후, 마우스 군 둘 다에 간염 ARE 태그된 인플루엔자 핵단백질 백신 (인플루엔자의 핵단백질 -NP-에 공유 연결된 HepPep-)을 투여하였다. 이어서, 상기 두 군을 악성 인플루엔자로 항원투여하고, 체중감소로 이환율을 측정하였다. HepPep-ARE 태그된 백신 군이 대조군보다 낮은 이환율을 나타낸다.

[0062] **ARE-Ag 접합된 화합물**

[0063] 본 발명은 ARE 및 항원의 접합체인 화합물을 제공하며, 이는 링커 모이어티에 의해 임의로 작동가능하게 연결된다.

[0064] A. 항체 인식 요소 (ARE)

[0065] ARE (항체 인식 요소)는 임의의 면역원의 B 세포 에피토프이다. 상업적 이용을 위해, ARE가 넓은 범위의 잠재적 수용자에 의해 인식되는 것이 중요하다. 그러므로, 각각의 수용자 군에 대한 이전 백신접종 또는 자연 발생 감염으로부터 유래한 흔히 사용되는 인식 요소로부터 유도된 ARE가 최상이다.

[0066] 본 발명의 ARE는 펩티드이다. 한 실시양태에서, ARE는 IPALTAVETGA (서열: 1)을 포함하는, 길이가 약 11-28개 아미노산인 소아마비의 VP-1 에피토프이다. 또 다른 실시양태에서, ARE는 아미노산 서열 상에 RAGG (서열: 10)의 N-말단 부가물을 함유한 상기 HBsAg 에피토프의 변이체이다. 또 다른 실시양태에서, ARE는 그것이 스페이서 또는 반응성 기로 사용되는 다른 아미노산을 함유한다는 점에서 HBsAg 에피토프의 변이체이다.

[0067] B. 항원

[0068] ARE에 연결된 항원에는 공지된 인간 및 동물 감염원, 예컨대 박테리아, 진균, 기생충, 프리온 및 바이러스의 단백질성 성분, 또는 암 항원이 포함된다. ARE에 연결될 수 있는 항원의 예는 다음을 비롯하여 인간에게 영향을 미치는 다양한 감염성 질환으로부터의 항원이다:

[0069] 박테리아 감염성 질환

[0070] 탄저병

[0071] 박테리아성 수막염

[0072] 보툴리눔독소증

[0073] 브루셀라증

[0074] 캄필로박터증

[0075] 묘소병

[0076] 콜레라

[0077] 디프테리아

[0078] 유행성 발진티푸스

[0079] 임질

[0080] 농가진

[0081] 레기오넬라증

[0082] 나병 (한센병)

[0083] 렙토스피라증

[0084] 리스테리아증

[0085] 라임병

[0086] 유비저

[0087] MRSA 감염

[0088] 노카르디아증 (노카르디아 아스테로이데스(*Nocardia asteroides*) 또는 노카르디아 브라실리엔시스(*Nocardia brasiliensis*))

[0089] 페르투시스 (백일해)

[0090] 흑사병

[0091] 폐렴구균성 폐렴

[0092] 앵무새병

[0093] Q 열

[0094] 록키산 홍반열

[0095] 살모넬라증

[0096] 성홍열

[0097] 시겔라증

[0098] 매독

[0099] 파상풍

[0100] 트라코마

[0101] 결핵

[0102] 야토병

[0103] 장티푸스열

[0104] 발진티푸스

[0105] 요로 감염 : 방광염 또는 신우신염

[0106] 진균 감염성 질환

[0107] 아스페르길루스증 : 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 또는 폐 아스페르길루스종 또는 침습성 아스페르길루스증.

[0108] 블라스토미세스증

[0109] 칸디다증

[0110] 콕시디오이데스진균증

[0111] 크립토코쿠스증

[0112] 히스토플라스마증

[0113] 족부 백선

[0114] 기생충 감염 질환

[0115] 아프리카 트리파노소마증

[0116] 아메바증

[0117] 회충증

[0118] 바베시아증

[0119] 샤가스병

[0120] 간흡충증

[0121] 크립토스포리디움증

[0122] 낭미충증

[0123] 열두조충증

[0124] 메디나충증

[0125] 포충증

[0126] 요충증

[0127] 간질증

[0128] 비대흡충증

[0129] 사상충증

[0130] 자유-생활 아메바 감염 (네글레리아 파울러리(*Naegleria fowleri*) 및 가시아메바(*Acanthamoeba*)로 인함)

[0131] 편모충증

[0132] 악구충증

[0133] 왜소조충증 (왜소조충(*Hymenolepis nana*) 또는 축소조충(*Hymenolepis diminuta*))

[0134] 포자충증

[0135] 말라리아

[0136] 요코가와흡충증

[0137] 구더기증

[0138] 회선사상충증

[0139] 이감염증

[0140] 옴

[0141] 조충증

[0142] 톡소카라증

[0143] 톡소플라스마증

[0144] 선모충증

[0145] 편충증

[0146] 트리코모나스증

[0147] 트리파노소마증

[0148] 프리온 감염성 질환

[0149] 알퍼스 증후군

[0150] 크로이츠펠트-야콥병

[0151] 치명적 가족성 불면증

[0152] 쿠루병

[0153] 전염성 해면상 뇌병증

[0154] 바이러스 감염 질환

[0155] AIDS

[0156] 수두 (바리셀라)

[0157] 감기 (급성 바이러스성 비인두염)

[0158] 시토메갈로바이러스 감염

[0159] 콜로라 진드기 열

[0160] 뎅기열

[0161] 에볼라 출혈성 열

[0162] 수족구병 (콕삭키 A 바이러스)

[0163] 간염

[0164] 단순 헤르페스

[0165] 대상 포진

[0166] HPV

[0167] 인플루엔자 (플루)

[0168] 라사 열

[0169] 홍역

[0170] 마르부르크 출혈성 열

[0171] 감염성 단핵구증

[0172] 멈프스

[0173] 회색질척수염

[0174] 진행성 다병소성 백질뇌병증

[0175] 광견병

[0176] 풍진

[0177] SARS

[0178] 천연두 (두창) : 대두창 및 소두창으로 인함.

[0179] 바이러스성 뇌염

[0180] 바이러스성 위장염

[0181] 바이러스성 수막염

[0182] 바이러스성 폐렴

[0183] 웨스트 나일 질환

[0184] 황열

[0185] 본 발명의 항원은 또한 가축 기원의 것일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Veterinary Microbiology 2nd Edition; Hirsh, DC; MacLachlan, NJ; and Walker, RL.; Blackwell Publishing]을 참조한다.

[0186] 특정 실시양태에서, 인플루엔자 A H5N1 (A/인도네시아/5/2005(H5N1))로부터의 뉴클레오캡시드 단백질 (NP) 진뱅크 단백질 등록 번호 #ABI36003이 항원으로 사용된다.

[0187] C. 커플러/링커

[0188] ARE-항원 커플링은 직접 수행되거나, 통상의 실시에 따른 화학적 링커를 사용하여 수행된다.

[0189] 특정 실시양태에서, ARE와 항원 분자는 화학적 가교제를 사용하여 공유 연결된다. 다수의 상이한 가교제가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 가교제는 길이가 약 400-1000 달톤 또는 약 3-12 옹스트롬이다. 본 발명에서 유용한 가교-링커는, 이들이 2개의 분자 (ARE 내지 항원 분자)와 공유 연결할 수 있도록 적어도 2가이어야 한다. 특정 실시양태에서, 가교-링커는 트리스-숙신이미딜 아미노트리아세테이트 (TSAT); 비스(술포숙신이미딜)수베레이트 (BS3); 디숙신이미딜 수베레이트 (DSS); 비스(2-[술포숙신이미딜옥시카르보닐옥시]에틸술폰) (BOSCOES); 비스(2-[숙신이미딜옥시카르보닐옥시]에틸술폰) (술포-BOSCOES); 에틸렌 글리콜 비스-(숙신이미딜숙시네이트) (EGS); 에틸렌 글리콜 비스-(술포숙신이미딜숙신에이트) (술포-EBS); 또는 디메틸 3,3'-디티오비스-프로피온이미데이트 (DTBP)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 가교-링커는 BS3, 술포-BOSCOES, EGS, 술포-EBS 또는 DTBP와 같은 2가이다.

[0190] 가교-링커를 부착하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다 (문헌 [Hermanson, 1995 Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc. New York, pp. 728]; [Wong, 1991 Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking. CRC Press, pp. 340]; [Brinkley, 1992 A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and cross-linking reagents Bioconjugate Chem. 3:2-13] 참조).

[0191] 적합한 링커의 예에는 포름알데하이드, 글루타르알데하이드, MBS (m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르) 및/또는 술포-MBS (MBS의 수용성 유사체) 등이 포함된다. 커플러/링커의 예는 웹 사이트; www.solulink.com/white_papers/peptide, www.piercenet.com 및 www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=020306에 상세하게 기재되어 있다.

[0192] **일반적 방법 및 절차**

[0193] Ag 접합. KLH-TNP 및 ova-TNP는 상업적으로 입수가능하다 (바이오서치 테크놀로지즈(Biosearch Technologies)). 추가의 접합체는, 백신 Ag의 존재하에 TNP-e-아미노카프로일-O-Su (바이오서치)를 사용하여 환원시켜 제조한다. T 세포 활성을 ICS에 의해 모니터링한다. 상기에 기재된 바와 같이, 복막 배액 TB-LN을 수집한다. LN을 균질화시키고, 세포 수/LN를 계산한다. 브레펠딘 A의 존재하에, 세포 현탁액을 Ag-특이적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 제한된 펩티드 (표 2)로 또는 상기 없이 처리하고 (표 2), 6시간 동안 인큐베이션한다.

[0194] <표 2>

마우스 계통	항원	MHC 클래스 I 에피토프	MHC 클래스 II 에피토프
CH57BI/6	난백알부민	SIINFEKL (서열: 3)	ISQAVHAAHAEINEAGR (서열: 6)
CH57BI/6	인플루엔자 - NP	ASNENMETM (서열:34)	QVYSLIRPNENPAHK (서열: 7)
CH57BI/6	인플루엔자 - NP	미지 (Unknown)	RSALILRGSVAHKSC (서열: 8)
CH57BI/6	PCC	미지	미지
CH57BI/6	HEL	미지	미지
CH57BI/6	HBsAg	IPQSLDSWWTSL (서열: 5)	CTTPAQGNSMFPSCCCTKPTD GNC (서열: 9)

[0195]

[0196] 샘플을 T 세포 하위세트의 표면 발현 마커에 대해 염색하고, 고정하고, 투과시키고, 세포내 IFN-γ에 대해 염색한다. 유동 세포측정법은 IFN-γ+ (Ag-반응성) CD4+ 및 CD8+ T 세포의 %를 측정한다 (문헌 [Kraus, Z. J., et al. 2008. J Immunol 181:7800-7809]). MHC 클래스 I 및 클래스 II의 면역우성 펩티드가 미지인 경우 (**표 2**), 동계 BMDC를 생성하고, APC로서 사용한다 (문헌 [Breckpot, K., et al. 2004. J Gene Med 6:1175-1188]; [Sudowe, S., et al. 2003. Mol Ther 8:567-575]; [Bros, M., et al. 2009. J Immunol Methods 343:13-20]). Ag-특이적 CD4 T 세포를 자극하기 위해서, BMDC를 24시간 동안 Ag로 맥동시켜, MHC 클래스 II를 통해 세포가 처리되고 제시되게 한다. CD8+ T 세포 Ag가 세포내 공급원으로부터 더 효율적으로 생성되기 때문에, 원하는 Ag를 코딩하는 DNA로 BMDC를 형질감염시킴으로써 MHC 클래스 I의 로딩을 달성한다. 형질감염 후에, BMDC가 36시간 동안 Ag를 생성하고, 처리하고, 제시하게 한다. 이어서, 이들 BMDC은 비맥동-BMDC와 함께 TB-LN으로부터 유도된 T 세포의 자극을 위해 APC로서 사용된다.

[0197] 체액 반응 분석은 Ag-특이적 혈청 Ab를 측정함으로써 수행된다. Ag-특이적 ELISA는 상기 기재된 바와 같다 (문헌 [Xie, P., et al. 2007. Immunity 27:253-267]; [Stunz, L. et al. 2004. Immunity 21:255-266]). 마우스 IgM 및 IgG에 대한 20개의 Ab가 Ag-특이적 혈청 Ab를 검출하기 위해 사용된다. 상기 배경기술의 2배 초과의 OD 판독치는 양성으로 간주된다 (문헌 [Xie, P., et al. 2007. Immunity 27:253-267]; [Stunz, L. et al. 2004. Immunity 21:255-266]). 시토카인은 멀티플렉스 루미넥스를 사용하여 혈청 및 세포 배양액에서 측정된다. 혈청 샘플은 LN 수거 동안에 수집된다. TB-LN으로부터 단리된 세포는 기재된 바와 같은 펩티드로 자극된다. 상청액은 24시간 후에 수집되고, 멀티플렉스 시토카인 검정에 적용된다.

[0198] **면역 뱅킹**

[0199] 현행 아주반트 시스템은 염증, 조직 손상 또는 심지어 자가면역 질환-유사 증후군을 초래할 수 있는 전반적인 비-특이적 면역 활성을 유도한다. 면역 뱅킹 과정의 신규한 이점 중 하나는 확실한 면역 반응을 유도할 수 있는, 내인성 아주반트로서의 기존 항체의 사용이다. 그러나, 현행 아주반트와는 대조적으로, 상기 반응은 면역화된 항원에 매우 특이적이고, 전반적인 비-특이적 면역을 초래하지 않는다. 면역 뱅킹이 활용하는 기존 면역 반응은 외래 생체분자에 대한 자연 방어로서 수용자에 의해 만들어지고 유지되기 때문에, 상기 기술은 아주반트 부작용을 감소시키고, 수용자에게 내약성이 더 좋다.

[0200] 한 예에서, 면역 뱅킹은 ARE 합텐 (TNP)에 대한 기존 Ab 반응을 활용하고, 인플루엔자 유도 사망에 대한 보호를 제공하였다. 명반 단독으로, 명반 중의 KLH로, 또는 명반 중의 KLH-TNP로 백신접종된 마우스는 인플루엔자의 TNP-합텐화된 재조합 뉴클레오캡시드 단백질 (NP)을 사용하여 인플루엔자에 대하여 면역화되었다 (도. 6). 이어서, 마우스를 치사량의 인플루엔자로 감염시키고, 질환에 대해 모니터링하였다. KLH-TNP로 면역화된 마우스는, 0% 생존율을 갖는 대조군과 비교하여 66% 생존율을 나타내었다.

[0201] **항원으로의 ARE의 연결**

[0202] 특정 실시양태에서, VP-1 ARE를 HBsAg에 화학적으로 연결하고, 면역 복합체로서 투여하였다. 다시 말해서, HBsAg을 VP-1 ARE에 화학적으로 연결한 후, ARE을 인식하는 항체와 혼합하였다. 이어서, ARE-태그된 HBsAg와 항체의 복합체를 백신으로서 주사하고, 항체가 없는 HBsAg와 비교하였다. 결과는 HBsAg-특이적 항체의 생성에 의해 측정된 바와 같이, HBsAg에 대한 확실한 면역 반응을 보였다.

[0203] 특정 실시양태에서, ARE는 재조합 DNA 기술을 통해 항원에 연결되었고, 즉 ARE로서 효과적으로 작용하는 융합 단백질로서의 구축물이 제조되었다.

[0204] **본 발명의 백신**

[0205] 특정 실시양태에서, 본 발명은 감염원의 콜로니화 및/또는 감염에 대하여 포유동물을 보호하거나, 또는 암을 치료하는 데 사용하기 위한 백신을 제공한다.

[0206] "합텐"은 스스로 면역 반응을 유도할 수 없지만, 일단 담체 분자에 부착되면 면역 반응을 유도하는 저분자량의 유기 화합물을 지칭한다. 본 발명의 접합 화합물, 조성물 및 방법에서 사용되는 예시적인 합텐에는 약물, 호르몬 및 독소가 포함되나, 이들 특정한 합텐에 제한되지는 않는다.

[0207] 용어 "에피토프"는 개별적 항체 또는 T-세포 수용체에 의한 기초 성분 또는 최소 인식 단위를 지칭하고, 따라서 상기 항체 또는 T-세포 수용체가 결합하는 특정한 도메인, 영역 또는 분자 구조를 지칭한다. 전형적으로 합텐은 에피토프를 거의 가지지 못할 수 있는 반면, 항원은 다수의 에피토프로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용된 "본질적으로 상응하는"은 천연 에피토프에 의해 생성된 반응과 적어도 실질적으로 동등한 면역학적 반응을 유도하는 에피토프를 지칭한다. 조성물 또는 백신에 대한 면역학적 반응은 관심있는 폴리펩티드 또는 백신에 대한 세포성 및/또는 항체-매개 면역 반응의 숙주를 발생시키는 것이다. 보통, 그러한 반응은 관심있는 조성물 또는 백신에 포함된 항원 또는 항원들에 특이적으로 지정된 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 억제 T 세포 및/또는 세포독성 T 세포를 생성하는 대상체로 이루어진다. 본 발명의 백신은 또한 면역 반응을 향상시는 것으로 알려진 유효량의 면역학적 아주반트를 포함할 수 있다. "유효량"은 목적하는 생물학적 효과를 실현하는 데에 필수적이거나 충분한 양을 지칭한다. 조성물의 유효량은 이러한 선택된 결과를 달성하는 양일 것이고, 그러한 양은 당업자에 의해 통상적인 문제로서 결정될 수 있다. 예를 들어, 면역계 결핍을 치료하기 위한 유효량은 면역계의 활성화를 야기하는 데 필수적인 양일 수 있으며, 이는 항원에 노출시 항원 특이적 면역 반응의 발생을 초래한다. 상기 용어는 또한 "충분량"과 동의어이다. 임의의 특정 적용에 대한 유효량은 치료할 질환 또는 병태, 투여될 특정 조성물, 대상체의 크기 및/또는 질환 또는 병태의 중증도와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 당업자는 과도한 실험을 필요로 하지 않으면서 본 발명의 특정 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

[0208] 본원에서 사용된 용어 "아주반트"는 면역 반응의 비-특이적 자극물질 또는 숙주에서 데포를 생성하도록 하는 물질을 지칭하고, 이는 본 발명의 백신 및 제약 조성물과 각각 조합되는 경우, 훨씬 더 향상된 면역 반응을 제공할 수 있다. 다양한 아주반트가 사용될 수 있다. 예로는 완전한 및 불완전한 프로인트 아주반트, 수산화알루미늄 및 개질된 뮤라밀디펩티드가 있다. 추가의 아주반트는 미네랄 겔, 예를 들어 수산화알루미늄, 표면 활성 물질, 예를 들어 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다가음이온, 펩티드, 오일 에멀젼, 키홀 림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 인간 아주반트, 예를 들어 BCG (바실 칼메트-게랑) 및 코리네박테리움 파르붐이 있다. 상기 아주반트는 또한 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 추가의 아주반트에는 모노포스포릴 지질 면역조절제, 아주박스(AdjuVax) 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, 알루미늄 염(명반), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 및 비로소말(Virosomal) 아주반트 기술이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 아주반트는 또한 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0209] 대상체를 면역화시키기 위해서, 조성물은 비경구적으로 투여되고, 대개 적절한 비히클 내의 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 그러나, 경구, 비강내 또는 피내 전달과 같은 다른 투여 방식도 또한 허용된다.

[0210] 백신 제제는 비히클 내에 유효량의 활성 성분을 함유할 것이고, 유효량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 것이다. 활성 성분은 전형적으로 조성물의 약 1% 내지 약 95% (w/w)의 범위일 수 있고, 또는 적절한 경우에 훨씬 더 높거나 낮을 수 있다. 투여되는 양은 백신접종에 고려되는 동물 또는 인간 대상체의 나이, 체중 및 신체 상태와 같은 인자에 따라 달라진다. 또한 상기 양은 항체를 합성하는 동물의 면역계 능력, 및 목적하는 보호의 정도에 따라 달라진다. 유효 투여량은 용량 반응 곡선을 확립하는 통상의 실험을 통해 당업자에 의해 쉽게 확립될 수 있다. 대상체는 바이오필름 펩티드 또는 그의 단편을 1회 이상의 용량으로 투여하여 면역화된다. 다중 용량은 관심있는 박테리아에 대한 면역 상태를 유지하는 데에 요구되는 만큼 투여될 수 있다.

[0211] 비강내 제제에는, 비점막에 자극을 일으키지 않거나 섬모 기능을 심각하게 방해하지 않는 비히클이 포함될 수 있다. 희석제, 예를 들어 물, 식염수 또는 다른 공지된 물질이 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 비강 제제는 또한 클로로부탄올 및 벤즈알코늄 클로라이드와 같은 보존제를 함유할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 계면활성제는 비점막에 의한 대상 단백질의 흡수를 향상시키기 위해 존재할 수 있다.

[0212] 경구 액제는, 예를 들어 수성 또는 유성 현탁액, 용액, 에멀젼, 시럽 또는 엘릭시르의 형태일 수 있거나, 또는 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로의 재구성을 위한 제품, 또는 건조된 정제 형태로 존재할 수 있다. 상기 액제는 현탁화제, 유화제, 비-수성 비히클 (식용 오일을 포함할 수 있음) 또는 보존제와 같은 통상의 첨가제

를 함유할 수 있다.

[0213] 백신을 제조하기 위해서, 정제된 조성물을 단리하고, 동결건조시키고, 안정화시킬 수 있다. 이어서, 조성물을 적합한 농도로 조정하고, 임의로 적합한 백신 아주반트와 조합하고, 사용을 위해 포장할 수 있다. 적합한 아주반트에는 계면활성제, 예를 들어 헥사데실아민, 옥타데실아민, 리소레시틴, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N'-N-비스(2-히드록시에틸-프로판 디-아민), 메톡시헥사데실-글리세롤 및 플루로닉 폴리올; 다가음이온, 예를 들어 피란, 덱스트란 술페이트, 폴리 IC, 폴리아크릴산, 카르보폴; 펩티드, 예를 들어 뮤라밀디펩티드, 디메틸글리신, 터프신, 오일 에멀젼, 명반, 및 그의 혼합물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 잠재적 아주반트에는 이. 콜라이(E. coli) 열 불안정성 독소 또는 콜레라 독소의 B 펩티드 서브유닛이 포함된다. 문헌 [McGhee, J.R., et al., "On vaccine development," Sem. Hematol., 30:3-15 (1993)]. 최종적으로, 면역원성 생성물은 백신 제제에서 사용하기 위해 리포솜 내로 혼입될 수 있거나, 또는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 또는 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 다른 중합체와 같은 단백질과 접합될 수 있다.

[0214] 정의

[0215] "결합된"은 공유될 수 있는 결합 또는 부착, 예를 들어 화학적 커플링에 의한 결합 또는 부착, 또는 비-공유될 수 있는 결합 또는 부착, 예를 들어 이온성 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합을 지칭한다. 공유 결합은 예를 들어 에스테르, 에테르, 포스포에테르, 아미드, 펩티드, 이미드, 탄소-황 결합, 탄소-인 결합 등일 수 있다. 용어 "결합된"은 "접합된", "커플링된", "융합된" 및 "부착된"과 같은 용어보다 광범위하고 이들을 포함한다.

[0216] 용어 "단백질", "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 교환가능하게 사용된다. 본 발명은 단리된 또는 실질적으로 정제된 단백질 조성물을 포함한다. 본 발명의 문맥에서, "단리된" 또는 "정제된" 폴리펩티드는 그의 천연 환경과 분리되어 존재하는 폴리펩티드이고, 따라서 천연 산물이 아니다. 폴리펩티드는 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 예를 들어 트랜스제닉 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에서 존재할 수 있다. 예를 들어, "단리된" 또는 "정제된" 단백질, 또는 그의 생물학적 활성 부분은 재조합 기술에 의해 제조되는 경우에는 다른 세포 물질 또는 배양 배지를 실질적으로 함유하지 않거나, 또는 화학적으로 합성되는 경우에는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질을 실질적으로 함유하지 않는다. 세포 물질을 실질적으로 함유하지 않는 단백질은 약 30%, 20%, 10%, 5% (건조 중량 기준) 미만의 오염 단백질을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드 제제를 포함한다. 본 발명의 단백질 또는 그의 생물학적 활성 부분이 재조합적으로 생산되는 경우에, 바람직하게는 배양 배지는 약 30%, 20%, 10% 또는 5% (건조 중량 기준) 미만의 화학적 전구체 또는 관심 단백질이 아닌 화학물질을 나타낸다. 그에 의해 코딩된 개시된 단백질 및 부분-길이 단백질의 단편 및 변이체가 또한 본 발명에 포함된다. "단편" 또는 "부분"은 전장 또는 전장 미만의 아미노산 서열의 폴리펩티드 또는 단백질을 의미한다.

[0217] "자연 발생"은 인공적으로 생산되는 것으로부터 구분되는 바와 같은 자연에서 발견될 수 있는 대상을 기재하는데 사용된다. 예를 들어, 자연에서의 공급원으로부터 단리될 수 있고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체 (바이러스 포함) 내에 존재하는 단백질 또는 뉴클레오티드 서열이 자연 발생의 것이다.

[0218] 분자의 "변이체"는 천연 분자의 서열과 실질적으로 유사한 서열이다.

[0219] "야생형"은 임의의 공지된 돌연변이 없이 자연에서 발견되는 정상 유전자 또는 유기체를 지칭한다.

[0220] "작동가능하게 연결된"은 한 분자의 기능이 다른 것에 의해 영향을 받도록 하는 분자의 연합을 지칭한다.

[0221] 펩티드와 관련하여 용어 "실질적 동일성"은 펩티드가 구체적인 비교 창에 걸쳐 참조 서열에 대해 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 또는 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89%, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94%, 또는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 최적의 정렬은 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘을 이용하여 수행된다. 2개의 펩티드 서열이 실질적으로 동일하다는 지표는 하나의 펩티드가 제2 펩티드에 대해 발생된 항체와 면역적으로 반응성이라는 것이다. 따라서, 펩티드는, 예를 들어 2개의 펩티드가 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우에, 제2 펩티드와 실질적으로 동일하다.

[0222] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열이 시험 서열과 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용하는 경우에, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요하다면, 하위서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 이어서 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 파라미터에 기초하

여, 참조 서열에 관한 시험 서열(들)에 대한 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.

[0223] "변이체" 폴리펩티드는 천연 단백질의 C-말단 및/또는 N-말단에 대한 하나 이상의 아미노산의 결실 (소위 말단 절단) 또는 부가; 천연 단백질 내 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 부가; 또는 천연 단백질 내 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산의 치환으로부터 유도된 폴리펩티드를 의도한다. 그러한 변이체는 예를 들어 유전자 다형성으로부터 또는 인간 조작으로부터 생성될 수 있다. 그러한 조작 방법은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

[0224] 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 말단절단 및 삽입을 비롯한 다양한 방법으로 변경될 수 있다. 그러한 조작 방법은 일반적으로 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체는 DNA에서의 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 뉴클레오티드 서열 변경 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985)]; [Kunkel et al., Meth. Enzymol., 154:367 (1987)]; 미국 특허 번호 4,873,192; [Walker and Gaastra, Techniques in Mol. Biol. (MacMillan Publishing Co. (1983)] 및 여기에 인용된 참고문헌을 참조한다. 관심 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 안내는 문헌 [Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found. 1978)]의 모델에서 발견될 수 있다. 보존적 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산과 교환하는 것이 바람직하다.

[0225] 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 자연 발생 단백질 뿐만 아니라 그의 변이체 및 변형된 형태를 포함한다. 그러한 변이체는 목적 활성을 계속 보유할 것이다. 본원에 포함된 폴리펩티드 서열의 결실, 삽입 및 치환은 폴리펩티드의 특성에 있어서 근본적인 변화를 생성하는 것으로 예상되지는 않는다. 그러나, 이렇게 하는 것에서 나아가 치환, 결실 또는 삽입의 정확한 효과를 예측하는 것이 어려운 경우에, 당업자는 그 효과가 통상의 스크리닝 검정에 의해 평가될 것임을 인지할 것이다.

[0226] 코딩된 서열 내 단일 아미노산 또는 작은 백분율의 아미노산 (전형적으로 5% 미만, 보다 전형적으로 1% 미만)을 변형, 부가 또는 결실시키는 개별적 치환, 결실 또는 부가는, 변경이 화학적으로 유사한 아미노산과 아미노산 치환을 생성하는 경우에, "보전적으로 변형된 변이"이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 널리 공지되어 있다. 다음의 5개 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: 지방족: 글리신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 이소류신 (I); 방향족: 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 황-함유: 메티오닌 (M), 시스테인 (C); 염기성: 아르기닌 (R), 리신 (K), 히스티딘 (H); 산성: 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E), 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q). 추가로, 코딩된 서열 내 단일 아미노산 또는 작은 백분율의 아미노산을 변형, 부가 또는 결실시키는 개별적 치환, 결실 또는 부가는 또한 "보전적으로 변형된 변이"이다.

[0227] 본원에 사용된 용어 "치료제"는 포유동물 수용자에 대한 유익한 효과를 갖는 임의의 작용제 또는 물질을 지칭한다. 따라서, "치료제"는 핵산 또는 단백질 성분을 갖는 치료 및 예방 분자 둘 다를 포함한다.

[0228] 본원에 사용된 "치료하는"은 소정의 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 완화, 치유 및/또는 그의 진행 예방을 지칭한다.

[0229] "항원"은 항체에 의해 결합될 수 있는 분자를 지칭한다. 항원은 추가로 면역계에 의해 인지될 수 있고/거나, B- 및/또는 T-림프구 활성화를 초래하는 체액성 면역 반응 및/또는 세포성 면역 반응을 유도할 수 있다. 항원은 하나 이상의 에피토프 (B- 및/또는 T-세포 에피토프)를 가질 수 있다. 본원에 사용된 항원은 또한 몇몇 개별적 항원의 혼합물일 수 있다. "항원 결정기"는 B- 또는 T-림프구에 의해 특이적으로 인지되는 항원의 부분을 지칭한다. 항원 결정기에 반응하는 B-림프구는 항체를 생산하는 반면, T-림프구는 세포성 및/또는 체액성 면역의 매개에 결정적인 이펙터 기능의 증식 및 확립에 의해 항원성 결정기에 대해 반응한다.

[0230] 본원에 사용된 용어 "항체"는 에피토프 또는 항원 결정기에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. 이 용어는 단일쇄 항체를 비롯한, 전체 항체 및 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 항원 결합 항체 단편이고, 이에 제한되지는 않지만, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$, Fd, 단일쇄 Fv (scFv), 단일쇄 항체, 디술피드-연결된 Fv (sdFv), 및 V_L 또는 V_H 도메인 중 어느 하나를 포함하는 단편을 포함한다. 항체는 조류 (예를 들어, 닭) 및 포유동물 (예를 들어, 인간, 뮤린, 토끼, 염소, 기니 피그, 낙타, 말 등)을 비롯한 임의의 동물 기원으로부터 존재할 수 있다. 본원에 사용된 "인간" 항체는 인간 이뮤노글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,939,598에 기재된 바와 같이 인간 이뮤노글로불린 라이브러리로부터, 또는 하나 이상의 인간 이뮤노글로불린에 대해 트랜스제닉이고 내인성 이뮤노글로불린을 발현하지 않는 동물로부터

단리된 항체를 포함한다.

[0231] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 군, 즉, 군을 구성하는 항체가 소량으로 존재하는 자연 발생 돌연변이체를 제외하고는 동종인 항체의 군으로부터 수득한 항체를 의미한다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 고도로 특이적이고 이와 상호작용한다. 추가로, 각 모노클로날 항체는, 전형적으로 각종 항원 결정기에 대한 다양한 항체를 함유하는 일반 폴리클로날 항체 제제와 비교하여, 항원 상의 단일 항원 결정기 (에피토프)를 표적화한다. 그의 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 다른 이뮤노글로불린으로 오염되지 않은 하이브리도마 배양물로부터 생산된다는 점에서 유리하다.

[0232] 형용사 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체의 군으로부터 수득한 항체의 특징을 나타내는 것이며, 특정한 방법에 의해 생산된 항체를 명시하는 것이 아니다. 예를 들어, 본 발명에서 사용할 모노클로날 항체는 예를 들어, 하이브리도마 방법 (문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975]) 또는 재조합 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 생산될 수 있다. 본 발명에 사용되는 모노클로날 항체는 또한 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다 (문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991]). 본 발명의 모노클로날 항체는 특히, 중쇄 (H) 및/또는 경쇄 (L)의 일부가 특정한 종 또는 특정한 항체 부류 또는 하위부류로부터 유도된 것이고, 쇄의 나머지 부분이 또 다른 종, 또는 또 다른 항체 부류 또는 하위부류로부터 유도된 것인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린)를 포함한다. 추가로, 돌연변이 항체 및 그의 항체 단편이 또한 본 발명에 포함된다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984]).

[0233] 본원에 사용된 용어 "돌연변이 항체"는 1개 이상의 아미노산 잔기가 변경된 변이체 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다. 예를 들어, 항체의 가변 영역은 그의 생물학적 특성, 예컨대 항원 결합을 개선시키기 위해 변형될 수 있다. 그러한 변형은 부위-지정 돌연변이유발 (문헌 [Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985)]), PCR-기반 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발 등에 의해 달성될 수 있다. 그러한 돌연변이체는 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열과 70% 이상 동일한, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 더 바람직하게는 80% 이상, 보다 더 바람직하게는 85% 이상, 보다 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "서열 동일성"은 항체의 원래 아미노산 서열에서의 잔기와 동일한 잔기의 백분율로서 정의되며, 이는 서열을 정렬하고 필요에 따라 간격을 적절하게 도입하여 서열 동일성을 최대화시킨 후에 결정된다.

[0234] 구체적으로, 문헌 [Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993)]에 의해, 알고리즘 BLAST을 이용하여 하나의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열의 또 다른 서열에 대한 동일성을 결정할 수 있다. BLASTN 및 BLASTX와 같은 프로그램은 이 알고리즘을 기반으로 하여 개발되었다 (문헌 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990]). BLAST를 기반으로 하는 BLASTN에 따라 뉴클레오티드 서열을 분석하기 위해, 파라미터는 예를 들어 스코어=100 및 워드길이=12로 설정된다. 다른 한편, BLAST를 기반으로 하는 BLASTX에 의한 아미노산 서열 분석에 사용되는 파라미터는 예를 들어 스코어=50 및 워드길이=3을 포함한다. BLAST 및 간격이 있는 BLAST 프로그램을 이용하는 경우에, 각 프로그램에 대한 디폴드 파라미터가 사용된다. 그러한 분석을 위한 구체적인 기술은 당업계에 공지되어 있다 (미국 국립 생물 정보 센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI), 베이직 로컬 얼라인먼트 서치 툴(Basic Local Alignment Search Tool; BLAST)의 웹 사이트; http://www.ncbi.nlm.nih.gov 참조). 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체는 하기 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0235] 상기 기술된 바와 같이 제조된 항원은 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 기니 피그, 말, 원숭이, 토끼, 염소 및 양에게 제공된다. 이 면역화는 전형적으로 사용되는 정맥내 주사, 피하 주사 및 복강내 주사를 비롯한 임의의 기존 방법에 의해 수행될 수 있다. 면역화 간격에 관해서는 어떠한 제한도 없다. 면역화는 수일 내지 수주 간격, 바람직하게는 4 내지 21일 간격으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 마우스는 단일 용량 10 내지 100 μg (예를 들어, 20 내지 40 μg)의 항원 단백질로 면역화될 수 있지만, 상기 용량이 이들 값으로 제한되지는 않는다.

[0236] 1차 면역화 이전, 및 2차 및 후속 면역화 후 3 내지 7일에 동물로부터 혈액을 채혈하고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 면역 반응을 촉진하기 위해, 응집제, 예컨대 명반을 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로, 선택된 포유동물 항체는 충분히 높은 항원 결합 친화도를 갖는다. 항체 친화도는 포화 결합 검정, 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 경쟁적 검정 (예를 들어, 방사면역검정)을 이용하여 결정될 수 있다.

[0237] 폴리클로날 항체는 통상의 가교 분석, 예컨대 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor

Laboratories, Harlow and David Lane edit. (1988))]에 기재되어 있는 방법에 의해 스크리닝될 수 있다. 대안적 방법은 예를 들어 에피토프 맵핑 (문헌 [Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)])이다. 폴리펩티드 또는 항체 역가를 결정하는 바람직한 방법은 항체-결합 친화도를 정량화하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항체-결합 친화도를 결정하는 방법 이외에 또는 그 대신에 항체의 하나 이상의 생물학적 특성을 평가하는 방법이 또한 이용된다. 그러한 분석 방법은 이들이 항체의 치료 유효성을 입증하기 때문에 특히 유용하다. 그러한 분석에서 항체가 개선된 특성을 나타내는 경우에, 항상 그러한 것은 아니지만, 일반적으로 그의 결합 친화도는 향상된다.

[0238] 모노클로날 항체를 제조하는데 사용된 하이브리도마는 예를 들어 문헌 [Milstein et al. (Kohler, G., and Milstein, C., Methods Enzymol. 1981, 73, 3-46)]의 방법에 의해 수득될 수 있다. 항체-생산 세포와 융합되는 골수종 세포는, 일반적으로 당업자에게 이용가능한 임의의 다양한 동물, 예컨대 마우스, 래트, 및 인간으로부터 유도된 세포주일 수 있다. 사용할 세포주는 약물-내성이고, 비융합 상태에서는 선택 배지 (예를 들어, HAT 배지) 중에서 생존할 수 없지만, 융합 상태에서는 생존할 수 있다. 8-아자구아닌-내성 세포주가 일반적으로 사용되며, 이는 하이포크산틴-구아닌-포스포리보실 트랜스퍼라제가 결핍되어 있고, 하이포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 배지 중에서는 성장할 수 없다. 골수종 세포는 다양한 공지된 세포주, 예를 들어 P3x63Ag8.653 (문헌 [J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550]), P3x63Ag8U.1 (문헌 [Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7]), NS-1 (문헌 [Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519]), MPC-11 (문헌 [Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415]), SP2/0 (문헌 [Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270]), FO (문헌 [de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21]), S194 (문헌 [Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323]), R210 (문헌 [Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133]) 및 P3U1 (문헌 [J. Exp. Med. 1979, 150:580]; [Curr Top Microbiol. Immunol. 1978, 81:1])을 포함한다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 인간 모노클로날 항체를 제조하는데 사용될 수 있다 (문헌 [Kozbar, J. Immunol. 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Application, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]). 항체-생산 세포는 예를 들어 최종 면역화 후 2 내지 3일에 희생된 동물로부터 수집된다. 항체-생산 세포는 비장 세포, 림프절 세포 및 말초 혈액 세포를 포함한다. 비장 세포가 일반적으로 사용된다. 구체적으로, 조직, 예컨대 비장 또는 림프절은 상기 기술된 각종 동물로부터 절제되거나 또는 수집된다. 이어서, 조직을 분쇄하고, 생성된 물질을 배지 또는 완충제, 예컨대 PBS, DMEM 또는 RPMI1640 중에 현탁시킨 후, 스테인레스 메쉬 등을 이용하여 여과한다. 이어서, 이를 원심분리하여 관심 항체-생산 세포를 수득한다.

[0239] 이어서, 상기 기술된 골수종 세포 및 항체-생산 세포를 융합시킨다. 세포 융합은 융합-촉진제의 존재 하에 30 내지 37℃에서 1 내지 15분 동안 동물 세포 배양용 배지, 예컨대 MEM, DMEM 및 RPMI-1640 중에서 골수종 세포를 항체-생산 세포와 1:1 내지 1:20의 비로 접촉시킴으로써 달성된다. 세포 융합을 촉진하기 위해, 상업적으로 이용가능한 세포-융합 장치를 이용하고, 융합-촉진제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (평균 분자량 1,000 내지 6,000 (Da)) 또는 폴리비닐 알콜, 또는 융합용 바이러스, 예컨대 센다이(Sendai) 바이러스를 이용하여 항체-생산 세포와 골수종 세포를 융합시킬 수 있다.

[0240] 관심 하이브리도마는 세포 융합 후 세포로부터 선택된다. 선택 방법은 선택 배지 중에서의 세포의 선택적 증식을 이용하는 방법을 포함한다. 구체적으로, 세포 현탁액을 적절한 배지로 희석시킨 다음, 세포를 마이크로타이터 플레이트 상에 플레이팅한다. 선택 배지 (예를 들어, HAT 배지)의 분취액을 각 웰에 첨가한 다음, 선택 배지를 적절히 교체하면서 세포를 배양한다. 그 결과, 성장한 세포를 하이브리도마로서 구제할 수 있다.

[0241] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 문헌 [McCafferty et al. (Nature 348:552-554 (1990))]에 보고된 기술을 이용하여 생산된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 문헌 [Clackson et al. (Nature 352:624-628 (1991))] 및 [Marks et al. (J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991))]은 파지 라이브러리로부터 마우스 및 인간 항체의 각 단리에 대해 보고하였다. 쇄 셔플링에 기초하는 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]) 및 대규모 파지 라이브러리를 구축하는 방법인, 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., Nucleic Acids Res. 21:2265-2266 (1993)])을 기재하는 보고가 또한 존재한다. 이들 기술은 또한 모노클로날 항체 생산을 위한 통상의 하이브리도마 기술을 이용하는 것 대신에 모노클로날 항체를 단리하는데 사용될 수 있다.

[0242] 수득한 하이브리도마로부터 모노클로날 항체를 제조하는 방법은 표준 세포 배양 방법, 및 복수 생산을 포함하는 방법을 포함한다. 세포 배양 방법에서, 하이브리도마를 동물 세포용 배양 배지, 예컨대 10 내지 20% 소 태아

혈청을 함유하는 RPMI-1640 또는 MEM, 또는 무혈청 배지 중 표준 배양 조건 하에서 (예를 들어, 5% CO_2 분위기 하에 37℃에서) 2 내지 14일 동안 배양한 다음, 항체를 배양물 상청액으로부터 제조한다. 복수 생산을 포함하는 방법에서, 하이브리도마를 골수종 세포가 유도된 것과 동일한 종의 포유동물 개체의 복막강에 투여하고, 하이브리도마를 대량으로 증식시킨다. 이어서, 1 내지 4주 후에 복수 또는 혈청을 수집한다. 복수 생산을 향상시키기 위해, 예를 들어 프리스탄 (2,6,10,14-테트라메틸펜타데칸)을 복막강에 사전 투여할 수 있다. 본 발명에서 사용할 항체는 공지된 방법, 예컨대 단백질 A-세파로스 방법, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 술페이트를 사용하는 염석 방법, 이온 교환 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피로부터 적절히 선택된 방법에 의해, 또는 상기 방법의 조합 사용에 의해 정제될 수 있다.

[0243] 본 발명은 유전 공학에 의해 생산된 재조합 항체를 사용할 수 있다. 상기 기술된 방법에 의해 수득한 항체를 코딩하는 유전자는 하이브리도마로부터 단리된다. 유전자를 적절한 벡터 내로 삽입한 다음, 숙주 내로 도입한다 (예를 들어, 문헌 [Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, Published in the United Kingdom by Macmillan Publishers Ltd, 1990] 참조). 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산, 및 이들 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 구체적으로, 역전사효소를 사용하여, 항체의 가변 영역 (V 영역)을 코딩하는 cDNA를 하이브리도마의 mRNA로부터 합성한다. 관심 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA를 수득한 다음, 이들을 항체의 목적 불변 영역 (C 영역)을 코딩하는 DNA와 라이게이션하고, 생성된 DNA 구축물을 발현 벡터 내로 삽입한다. 대안적으로, 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA는 항체 C 영역의 DNA를 포함하는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이들은 유전자가 발현 조절 영역, 예를 들어 인핸서 및 프로모터의 조절 하에 발현될 수 있도록 발현 벡터 내로 삽입된다. 이어서, 숙주 세포는 항체를 발현하는 발현 벡터로 형질전환된다. 본 발명은 본 발명의 항체를 발현하는 세포를 제공한다. 본 발명의 항체를 발현하는 세포는 그러한 항체의 유전자로 형질전환된 세포 및 하이브리도마를 포함한다.

[0244] 본 발명에서, 인간에 대한 이종 항원성을 감소시키기 위해 인공적으로 변형된 재조합 항체가 사용될 수 있다. 그 예는 키메라 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 이들 변형된 항체는 공지된 방법을 이용하여 생산될 수 있다. 키메라 항체는 서로 상이한 종의 가변 및 불변 영역을 포함하는 항체, 예를 들어 마우스와 같은 비인간 포유동물의 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 인간의 항체 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 그러한 항체는 (1) 마우스 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA를 인간 항체의 불변 영역을 코딩하는 DNA에 라이게이션하고; (2) 이를 발현 벡터 내로 혼입하고; (3) 상기 벡터를 항체 생산을 위한 숙주 내로 도입함으로써 수득될 수 있다.

[0245] 재성형 인간 항체로도 불리는 인간화 항체는 비인간 포유동물, 예컨대 마우스의 항체의 H 또는 L 쇄 상보성 결정 영역 (CDR)을 인간 항체의 CDR로 치환함으로써 수득된다. 그러한 항체의 제조를 위한 종래의 유전자 재조합 기술은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)]; [Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988)]; [Presta Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)] 참조). 구체적으로, 마우스 항체의 CDR을 인간 항체의 프레임워크 영역 (FR)과 라이게이션하기 위해 고안된 DNA 서열은, 올리고뉴클레오티드의 말단에서 중복 부분을 포함하도록 구축된 여러개의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 PCR에 의해 합성된다. 인간화 항체는 (1) 생성된 DNA를 인간 항체 불변 영역을 코딩하는 DNA에 라이게이션하고; (2) 이를 발현 벡터 내로 혼입하고; (3) 벡터를 숙주 내로 형질감염시켜 항체를 생산함으로써 수득될 수 있다 (유럽 특허 출원 번호 EP 239,400 및 국제 특허 출원 번호 WO 96/02576 참조). CDR을 통해 라이게이션된 인간 항체 FR이 선택되며, 여기서 CDR은 바람직한 항원-결합 부위를 형성된다. 인간화 항체는 수용자 항체 내로 도입된 CDR 중에도, 프레임워크 서열 중에도 포함되지 않은 추가의 아미노산 잔기(들)를 포함할 수 있다. 그러한 아미노산 잔기는 보통 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있는 항체의 능력을 더욱 정확하게 최적화시키기 위해 도입된다. 예를 들어, 필요하다면, 항체 가변 영역의 프레임워크 영역 내의 아미노산은 재성형 인간 항체의 CDR이 적절한 항원-결합 부위를 형성할 수 있도록 치환될 수 있다 (문헌 [Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856]).

[0246] 인간 항체를 수득하는 방법이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 항원-결합 활성을 갖는 목적 인간 항체는 (1) 관심 항원을 갖는 인간 림프구 또는 관심 항원을 발현하는 세포를 시험관내 감작시키고; (2) 감작된 림프구를 인간 골수종 세포, 예컨대 U266과 융합시킴으로써 수득될 수 있다 (심사 공개된 일본 특허 출원 번호 (JP-B) Hei 1-59878 참조). 대안적으로, 목적 인간 항체는 또한 항원을 사용하여 인간 항체 유전자의 부분 또는 전체 레퍼토리를 포함하는 트랜스제닉 (Tg) 동물을 면역화시킴으로써 수득될 수 있다 (문헌 [Nature Genetics 7:13-21 (1994)]; [Nature Genetics 15:146-156 (1997)]; [Nature 368:856-859 (1994)]; 국제 특허 출원 WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 및 WO 96/33735 참조). 구체적으로, 그러한 Tg 동물은 하기과 같이 생성된다: 내인성 이뮤노글로불린의 중쇄 및 경쇄의 유전자좌가 파괴되고, 대신에, 인간

이뮤노글로불린의 중쇄 및 경쇄의 유전자좌가 효모 인공 염색체 (YAC) 벡터 등을 통해 도입되어 있는 비인간 포유동물은, 녹아웃 동물 또는 Tg 동물을 생성하거나 또는 그러한 동물을 교배시킴으로써 수득될 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄 유전자좌는 예를 들어, J 영역 또는 C 영역 (예를 들어 Cμ 영역) 내의 특정 부위에 결함을 도입함으로써 기능적으로 불활성화될 수 있다. 이뮤노글로불린 경쇄 (예를 들어, κ 쇄)는, 예를 들어 J 영역 또는 C 영역, 또는 J 및 C 영역을 포함하는 영역 내의 특정 부위에 결함을 도입함으로써 기능적으로 불활성화될 수 있다.

[0247] 그러한 인간화 항체는 또한 유전 공학 기술을 이용하여 항체의 중쇄 및 경쇄 각각을 코딩하는 cDNA, 또는 바람직하게는 이들 cDNA를 포함하는 벡터를 사용하여 진핵 세포를 형질전환시킨 다음, 재조합 인간 모노클로날 항체를 생산하는 형질전환된 세포를 배양함으로써 배양물 상청액으로부터 수득될 수 있다. 숙주는 예를 들어 목적 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예컨대 CHO 세포, 림프구 및 골수종이다.

[0248] 추가로, 인간 항체 라이브러리를 이용하여 패닝함으로써 인간 항체를 수득하는 기술이 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 항체의 가변 영역은 파지 디스플레이 방법을 이용하여 파지 표면 상에 단일 쇄 항체 (scFv)로서 발현되고, 항원에 결합하는 파지를 선택할 수 있다. 선택된 파지의 유전자를 분석함으로써, 항원에 결합하는 인간 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열을 결정할 수 있다. 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열이 확인되면, 이들 서열을 포함하는 적절한 발현 벡터를 구축할 수 있고, 이어서 적절한 숙주 내로 도입하고, 발현시켜 인간 항체를 수득할 수 있다. 그러한 방법은 이미 널리 공지되어 있다 (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 및 WO 95/15388 참조).

[0249] 항체 유전자를 단리하고, 적절한 숙주 내로 도입한 경우에, 숙주 및 발현 벡터를 적절한 조합으로 사용하여 항체를 생산할 수 있다. 진핵 숙주 세포로서, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포가 사용될 수 있다. 동물 세포는 하기를 포함한다: (1) 포유동물 세포, 예컨대 CHO, COS, 골수종, 새끼 햄스터 신장 (BHK), HeLa 및 베로 (Vero) 세포; (2) 양서류 세포, 예컨대 크세노푸스(Xenopus) 난모세포; 또는 (3) 곤충 세포, 예컨대 sf9, sf21 및 Tn5, 또는 누에. 공지된 식물 세포는 니코티아나(*Nicotiana*) 속, 예컨대 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)으로부터 유도된 세포를 포함하며, 이는 캘루스 배양될 수 있다. 공지된 진균 세포는 효모, 예컨대 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속, 예를 들어 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 및 사상 진균, 예컨대 아스페르길루스(*Aspergillus*) 속, 예를 들어 아스페르길루스 니거(*Aspergillus niger*)를 포함한다. 원핵 세포는 또한 박테리아 세포를 이용하는 생산 시스템에서 사용될 수 있다. 공지된 박테리아 세포는 이. 콜라이 및 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 포함한다. 항체는 형질전환을 이용하여 관심 항체 유전자를 이들 세포로 형질감염시킨 다음, 형질전환된 세포를 시험관내에서 배양함으로써 수득될 수 있다.

[0250] 본 발명의 항체의 이소형은 제한되지는 않는다. 이소형은 예를 들어 IgG (IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4), IgM, IgA (IgA1 및 IgA2), IgD 및 IgE를 포함한다. 본 발명의 항체는 또한 항원 결합을 담당하는 부분을 포함하는 항체 단편, 또는 그의 변형된 단편일 수 있다. 용어 "항체 단편"은 전장 항체의 부분을 지칭하며, 일반적으로 항원-결합 도메인 또는 가변 영역을 포함하는 단편을 지칭한다. 그러한 항체 단편은 예를 들어, Fab, $F(ab')_2$, Fv, 적절한 링커와 함께 커플링된 중쇄 Fv 및 경쇄 Fv를 포함하는 단일쇄 Fv (scFv), 디아바디 (디아바디들), 선형 항체, 및 항체 단편으로부터 제조된 다중특이적 항체를 포함한다. 사전에, 항체 단편을 천연 항체를 프로테아제로 소화시킴으로써 생산하였으며; 현재는, 항체 단편을 유전 공학 기술을 이용하여 재조합 항체로서 발현시키는 방법이 또한 공지되어 있다 (문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]; [Co, M. S. et al., J. Immunol., 1994, 152, 2968-2976]; [Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology, 1989, 178, 476-496, Academic Press, Inc.]; [Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology, 1989, 178, 476-496, Academic Press, Inc.]; [Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 1989, 121, 663-669]; [Bird, R. E. et al., TIBTECH, 1991, 9, 132-137] 참조).

[0251] "Fv" 단편은 가장 작은 항체 단편이며, 이는 완전한 항원 인식 부위 및 결합 부위를 함유한다. 이 영역은 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역이 비공유 결합에 의해 강력하게 연결되어 있는 이량체 (V_H-V_L 이량체)이다. 각 가변 영역의 3개의 CDR은 서로 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 형성한다. 다시 말해, 중쇄 및 경쇄로부터의 총 6개의 CDR은 항체의 항원-결합 부위로서 함께 기능한다. 그러나, 비록 단독 가변 영역 친화도가 전체 결합 부위의 친화도보다 더 낮더라도, 단독 가변 영역 (또는 단지 3개의 항원-특이 CDR만을 함유하는 절반의 Fv)만이 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 항체 단편은 Fv 단편이지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러한 항체 단편은, 보존된 중쇄 또는 경쇄 CDR의 항체

단편을 포함하고 그의 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있는 폴리펩티드일 수 있다.

[0252] Fab 단편 (또한 F(ab)로도 지칭됨)은 또한 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역 (CH1)을 함유한다. 예를 들어, 항체의 파파인 소화는 하기 2종의 단편을 생산한다: 단일 항원-결합 도메인으로서의 역할을 하는, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 함유하는, Fab 단편으로 불리는 항원-결합 단편; 및 쉽게 결정화되기 때문에 "Fc"로 불리는 나머지 부분. Fab' 단편은 또한 항체의 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는, 중쇄 CH1 영역의 카르복실 말단으로부터 유도된 여러개의 잔기를 또한 가지고 있다는 점에서 Fab 단편과는 상이하다. 그러나, Fab' 단편은, Fab' 및 Fab 둘 모두가 단일 항원-결합 도메인으로서의 역할을 하는, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함하는 항원-결합 단편이라는 점에서 Fab와 구조상으로 동등한 것이다. 여기서, 단일 항원-결합 도메인으로서의 역할을 하는, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함하고 파파인 소화에 의해 수득한 것과 동등한 것인 항원-결합 단편은 심지어 프로테아제 소화에 의해 생산된 항체 단편과 동일하지 않은 경우에도 "Fab-유사 항체"로서 지칭된다. Fab'-SH는 그의 불변 영역 내에 유리 티올 기를 갖는 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab'이다. F(ab') 단편은 $F(ab')_2$의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기 사이의 디술피드 결합을 절단함으로써 생산된다. 화학적으로 가교된 다른 항체 단편이 또한 당업자에게 공지되어 있다. 항체의 펩신 소화는 2개의 단편을 생산한다; 하나는 2개의 항원-결합 도메인을 포함하며 항원과 교차 반응할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이고, 다른 하나는 나머지 단편 (또한 pFc'로도 지칭됨)이다. 여기서, 펩신 소화에 의해 수득되는 것과 동등한 것인 항체 단편은, 이것이 2개의 항원-결합 도메인을 포함하고 항원과 교차 반응할 수 있을 경우에는 "$F(ab')_2$-유사 항체"로서 지칭된다. 그러한 항체 단편은 또한 예를 들어, 유전 공학에 의해 생산될 수 있다. 그러한 항체 단편은 또한 예를 들어, 상기 기술된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, $F(ab')_2$-SH 단편은 숙주, 예컨대 이. 콜라이로부터 직접 회수된 다음, 화학적 가교에 의해 $F(ab')_2$ 단편을 형성하도록 할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 대안적 방법에서, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주의 배양물로부터 직접 단리될 수 있다.

[0253] 용어 "디아바디 (Db)"는 유전자 융합에 의해 구축된 이가 항체 단편을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)], EP 404,097, WO 93/11161). 일반적으로, 디아바디는 2개의 폴리펩티드 쇄의 이량체이다. 각 폴리펩티드 쇄에서, 동일한 쇄에서 경쇄 가변 영역 (V_L) 및 중쇄 가변 영역 (V_H)은 짧은 링커, 예를 들어 약 5개 잔기의 링커를 통해 연결되어 있으며, 이로써 이들은 함께 결합할 수 없다. 둘 사이의 링커가 너무 짧기 때문에, 동일 폴리펩티드 쇄 내의 V_L 및 V_H는 단일 쇄 V 영역 단편을 형성할 수는 없지만, 대신에 이량체를 형성할 수 있다. 따라서, 디아바디는 2개의 항원-결합 도메인을 갖는다. 2가지 유형의 항원 (a 및 b)에 대한 V_L 및 V_H 영역이 조합되어 약 5개 잔기의 링커를 통해 V_{La}-V_{Hb} 및 V_{Lb}-V_{Ha}를 형성한 다음, 공발현되는 경우에, 이들은 이중특이성 Db로서 분비된다. 본 발명의 항체는 그러한 Db일 수 있다.

[0254] 단일쇄 항체 (또한 "scFv"로도 지칭됨)는 항체의 중쇄 V 영역 및 경쇄 V 영역을 연결시킴으로써 제조될 수 있다 (scFv에 대한 리뷰를 위해, 문헌 [Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, eds. Rosenburg and Moore, Springer Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994)] 참조). 단일 쇄 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,946,778; 5,260,203; 5,091,513; 및 5,455,030 참조). 그러한 scFv에서, 중쇄 V 영역 및 경쇄 V 영역은 링커, 바람직하게는 폴리펩티드 링커를 통해 함께 연결된다 (문헌 [Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1988, 85, 5879-5883]). scFv에서의 중쇄 V 영역 및 경쇄 V 영역은 동일한 항체로부터 또는 상이한 항체로부터 유래될 수 있다. V 영역을 라이게이션하는 데 사용되는 펩티드 링커는 12 내지 19개의 잔기로 이루어진 임의의 단일 쇄 펩티드일 수 있다. scFv를 코딩하는 DNA는, 상기 항체의 중쇄 또는 중쇄의 V 영역을 코딩하는 DNA, 및 상기 항체의 경쇄 또는 경쇄의 V 영역을 코딩하는 DNA로부터 선택된 목적 아미노산 서열을 코딩하는 전체 DNA 또는 부분 DNA를 주형으로서 사용하고; 두 말단을 한정하는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 후속적으로, 추가의 증폭은 펩티드 링커 부위를 코딩하는 DNA의 조합, 및 각각 중쇄 및 경쇄에 라이게이션하려는 DNA의 양쪽 말단을 한정하는 프라이머 쌍을 사용하여 수행될 수 있다. scFv를 코딩하는 DNA를 구축한 후, 통상의 방법을 이용하여 이들 DNA를 포함하는 발현 벡터, 및 이들 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주를 수득할 수 있다. 추가로, scFv는 생성된 숙주를 사용하여 통상의 방법에 따라 수득될 수 있다. 이들 항체 단편은 상기 요약된 바와 같이 항체 단편을 코딩하는 유전자를 수득하고 이들을 발현시킴으로써 숙주에서 생산될 수 있다. 다양한 유형의 분자, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 결합된 항체는 변형된 항체로서 사용될 수 있다. 항체를 변형시키는 방법은 이미 당업계에 확

립되어 있다. 본 발명에서 용어 "항체"는 또한 상기 기술된 항체를 포함한다.

[0255] 수득한 항체는 균질하게 정제될 수 있다. 항체는 단백질을 단리 및 정제하기 위해 통상적으로 이용되는 방법에 의해 단리 및 정제될 수 있다. 항체는 예를 들어 칼럼 크로마토그래피, 여과, 한외여과, 염석, 투석, 정제용 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 등전-초점화로부터 적절하게 선택된 하나 이상의 방법의 조합 사용에 의해 단리 및 정제될 수 있다 (문헌 [Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)]; [Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]). 그러한 방법은 상기 열거된 것들로 제한되지는 않는다. 크로마토그래피 방법은 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과, 역상 크로마토그래피 및 흡착 크로마토그래피를 포함한다. 이들 크로마토그래피 방법은 HPLC 및 FPLC와 같은 액상 크로마토그래피를 이용하여 수행될 수 있다. 친화성 크로마토그래피에 사용되는 칼럼은 단백질 A 칼럼 및 단백질 G 칼럼을 포함한다. 예를 들어, 단백질 A 칼럼은 하이퍼 D, 포로스(POROS) 및 세파로스 F. F. (파마시아(Pharmacia))를 포함한다. 항체는 항원이 고정되어 있는 담체를 사용하여 항원 결합을 이용함으로써 정제될 수 있다.

[0256] 본 발명의 항체는 표준 방법에 따라 제제화될 수 있고 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A] 참조), 제약상 허용되는 담체 및/또는 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 항체 및 제약상 허용되는 담체 및/또는 첨가제를 포함하는 조성물 (시약 및 제약 포함)에 관한 것이다. 예시적인 담체는 계면활성제 (예를 들어, PEG 및 트윈(Tween)), 부형제, 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산), 착색제, 향미제, 보존제, 안정화제, 완충제 (예를 들어, 인산, 시트르산, 및 다른 유기산), 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA), 현탁화제, 등장화제, 결합제, 붕해제, 윤활제, 유동 촉진제 및 교정제를 포함한다. 그러나, 본 발명에서 사용될 수 있는 담체는 상기 목록에 제한되지는 않는다. 사실상, 보편적으로 사용되는 하기 다른 담체가 적절하게 사용될 수 있다: 경질 무수 규산, 락토스, 결정질 셀룰로스, 만니톨, 전분, 카르멜로스 칼슘, 카르멜로스 나트륨, 히드록시프로필셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 폴리비닐아세트알디에틸아미노아세테이트, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 중간 쇄 지방산 트리글리세리드, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 60, 수크로스, 카르복시메틸셀룰로스, 옥수수 전분, 무기 염 등. 조성물은 또한 다른 저분자량 폴리펩티드, 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 및 이뮤노글로불린, 및 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스프라긴, 아르기닌 및 리신을 포함할 수 있다. 조성물이 주사용 수용액으로서 제조되는 경우에, 이는 예를 들어, 생리 염수, 덱스트로스, 및 예를 들어, D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨 및 염화나트륨을 비롯한 다른 아주반트를 포함하는 등장성 용액을 포함할 수 있으며, 이는 또한 적절한 가용화제, 예를 들어 알콜 (예를 들어, 에탄올), 폴리알콜 (예를 들어, 프로필렌 글리콜 및 PEG), 및 비-이온성 세제 (폴리소르베이트 80 및 HCO-50)를 함유할 수 있다.

[0257] 필요하다면, 본 발명의 항체는 마이크로캡슐 (히드록시셀룰로스, 젤라틴, 폴리메틸메타크릴레이트 등으로 제조된 마이크로캡슐)로 캡슐화되고, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노-캡슐)의 성분으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)] 참조). 더욱이, 지속-방출 약물을 제조하는 방법이 공지되어 있고, 이들은 본 발명의 항체에 대해 적용될 수 있다 (문헌 [Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981)]; [Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982)]; 미국 특허 번호 3,773,919; EP 특허 출원 번호 58,481; [Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983)]; EP: 133,988).

[0258] "면역 반응"은 B- 및/또는 T-림프구 및/또는 항원 제시 세포의 활성화 또는 증식을 초래하는 체액성 면역 반응 및/또는 세포성 면역 반응을 지칭한다. 그러나, 일부 경우에서, 면역 반응은 낮은 강도일 수 있고, 본 발명에 따른 하나 이상의 물질을 사용하는 경우에만 검출가능해질 수 있다. "면역원성"은, 면역계의 하나 이상의 기능을 증가시키고 면역원성 작용제에 대해 지시하도록 살아있는 유기체의 면역계를 자극하는데 사용되는 작용제를 지칭한다. "면역원성 폴리펩티드"는, 단독으로든지 또는 아주반트의 존재 또는 부재 하에 담체에 연결되든지, 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 도출하는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 항원 제시 세포는 활성화될 수 있다.

[0259] 면역 반응을 "향상시키는" 물질은, 물질을 첨가하는 경우의 면역 반응이 물질의 첨가 없이 측정된 동일한 면역 반응과 비교하는 경우에 임의의 방법으로 더 커지거나 또는 강화되거나 또는 편향되는 것으로 관찰되는 것인 물질을 지칭한다. 예를 들어, 세포독성 T 세포의 용해 활성은 면역화 동안 물질의 사용을 사용하면서 또는 사용하지 않으면서 수득한 샘플에서, 예를 들어 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 측정될 수 있다. CTL 용해 활성이 물질

부재 하의 CTL 용해 활성과 비교하여 향상된 경우의 물질의 양은 항원에 대한 동물의 면역 반응을 향상시키기에 충분한 양이어야 한다. 특정 실시양태에서, 면역 반응은 적어도 약 2의 인자, 예컨대 약 3 이상의 인자만큼 향상된다. 분비된 시토카인의 양 또는 유형은 또한 변경될 수 있다. 대안적으로, 유도된 항체 또는 그의 하위부류의 양은 변경될 수 있다.

[0260] 용어 "면역화하다" 또는 "면역화" 또는 관련 용어는 표적 항원 또는 에피토프에 대해 실질적 면역 반응 (항체 및/또는 세포성 면역, 예컨대 이펙터 CTL 포함)을 시작하는 능력을 부여하는 것을 지칭한다. 이들 용어는 완전한 면역을 생성할 필요는 없지만, 오히려 기준선보다 실질적으로 더 큰 면역 반응을 생성한다. 예를 들어, 포유동물은, 표적 항원에 대한 세포성 및/또는 체액성 면역 반응이 본 발명의 방법의 적용에 따라 발생하는 경우에, 표적 항원에 대하여 면역화된 것으로 간주될 수 있다.

[0261] 용어 "면역요법제"는 질환, 장애 또는 병태의 치료를 위한 조성물을 지칭한다. 보다 구체적으로, 용어는 유익한 면역 반응이 백신접종에 의해 또는 면역 분자의 전달에 의해 생성되는 것인 치료 방법을 언급하는데 사용된다. "면역학적 유효량"은 개체 내로 도입되는 경우에 개체에서 면역 반응을 유도하기에 충분한 조성물의 양을 지칭한다. 활성 면역화와 관련하여, 용어는 "면역원성 유효량"과 동의어이다. 면역학적으로 유효하기 위해 필요한 조성물의 양은 조성물, 조성물 중의 다른 성분 (예를 들어, 아주반트)의 존재, 항원, 면역화 경로, 개체, 이전의 면역 또는 생리적 상태 등을 비롯한 많은 인자에 따라 다양하다.

[0262] **핵산 분자, 발현 카세트 및 발현 벡터**

[0263] ARE 및 접합 화합물은 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있고, 핵산 서열은 또한 프로모터를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 또한 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호는 합성 최소 폴리아데닐화 신호 또는 6개 T의 서열이다.

[0264] 용어 "핵산"은 당, 포스페이트, 및 퓨린 또는 피리미딘 중 하나인 염기를 함유하는 단량체 (뉴클레오티드)로 구성된, 단일- 또는 이중-가닥 형태 중 어느 하나인 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는, 참조 핵산과 유사한 결합 성질을 가지며 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환) 및 상보적 서열 뿐만 아니라 명시적으로 나타낸 서열을 포함한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다. "핵산 단편"은 주어진 핵산 분자의 부분이다.

[0265] "뉴클레오티드 서열"은, DNA 또는 RNA 중합체 내로 혼입될 수 있는 합성, 비-천연 또는 변형 뉴클레오티드 염기를 임의로 함유하는, 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있는 DNA 또는 RNA의 중합체이다.

[0266] 용어 "핵산", "핵산 분자", "핵산 단편", "핵산 서열 또는 절편" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 교환가능하게 사용되고, 또한 유전자, cDNA, DNA, 및 유전자에 의해 코딩된 RNA와 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0267] 본 발명은 단리된 또는 실질적으로 정제된 핵산 분자, 및 이들 분자를 함유하는 조성물을 포함한다. 본 발명의 문맥에서, "단리된" 또는 "정제된" DNA 분자 또는 RNA 분자는 그의 천연 환경과 떨어져서 존재하며 따라서 천연 생성물이 아닌 DNA 분자 또는 RNA 분자이다. 단리된 DNA 분자 또는 RNA 분자는 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 예를 들어, 트랜스제닉 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에 존재할 수 있다. 예를 들어, "단리된" 또는 "정제된" 핵산 분자 또는 그의 생물학적 활성 부분은 재조합 기술에 의해 생산되는 경우에 다른 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성되는 경우에 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다. 한 실시양태에서, "단리된" 핵산에는 상기 핵산이 유래되는 유기체의 게놈 DNA 내에서 핵산에 자연 플랭킹된 서열 (즉, 핵산의 5' 및 3' 말단에 위치하는 서열)이 없다. 예를 들어, 다양한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 핵산이 유래되는 세포의 게놈 DNA 내에서 핵산 분자에 자연 플랭킹된, 약 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb 또는 0.1 kb 미만의 뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 개시된 뉴클레오티드 서열의 단편 및 변이체가 또한 본 발명에 포함된다. "단편" 또는 "부분"은 전장 또는 전장 미만의 뉴클레오티드 서열을 의미한다.

[0268] "자연 발생", "천연" 또는 "야생형"은 인위적으로 생산된 것과 달리 자연에서 발견될 수 있는 대상을 기재하는데 사용된다. 예를 들어, 자연의 공급원으로부터 단리될 수 있고 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않은, 유기체 (바이러스 포함) 내에 존재하는 단백질 또는 뉴클레오티드 서열은 자연 발생의 것이다.

[0269] 분자의 "변이체"는 천연 분자의 서열과 실질적으로 유사한 서열이다. 뉴클레오티드 서열에 대해, 변이체는 유

전자 코드의 축중성으로 인해 천연 단백질의 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함한다. 이들과 같은 자연 발생 대립유전자 변이체는, 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 및 혼성화 기술과 같은 분자 생물학 기술을 이용하여 확인할 수 있다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 또한 합성 유래 뉴클레오티드 서열, 예컨대 예를 들어 부위-지정 돌연변이유발을 이용하여 생성된 천연 단백질을 코딩하는 것들, 뿐만 아니라 아미노산 치환을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 것들을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 뉴클레오티드 서열 변이체는 천연 (내인성) 뉴클레오티드 서열과 적어도 40%, 50%, 60% 내지 70%, 예를 들어 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% 내지 79%, 일반적으로 적어도 80%, 예를 들어 81%-84%, 적어도 85%, 예를 들어 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 내지 98%의 서열 동일성을 가질 것이다.

[0270] "트랜스진"은 형질전환에 의해 게놈 내로 도입된 유전자를 지칭한다. 트랜스진은 예를 들어 형질전환되는 특정 세포의 DNA에 대해 이종 또는 동종인 DNA를 포함한다. 추가로, 트랜스진은 비-천연 유기체 내로 삽입된 천연 유전자, 또는 키메라 유전자를 포함할 수 있다.

[0271] 용어 "내인성 유전자"는 유기체의 게놈에서 그의 본연의 위치에 존재하는 천연 유전자를 지칭한다.

[0272] 용어 "단백질", "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0273] "야생형"은 자연에서 발견되는 통상적인 유전자 또는 유기체를 지칭한다.

[0274] "게놈"은 유기체의 완전한 유전 물질을 지칭한다.

[0275] "벡터"는 특히, 자기 전달성 또는 동원성일 수 있거나 그렇지 않을 수 있으며 세포 게놈 내로 통합되거나 염색체외에 존재하여 (예를 들어, 복제 기점을 갖는 자동 복제 플라스미드) 원핵 또는 진핵 숙주를 형질전환시킬 수 있는, 이중 또는 단일 가닥 선형 또는 원형 형태의 임의의 바이러스 벡터, 뿐만 아니라 임의의 플라스미드, 코스미드, 파지 또는 바이너리 벡터를 포함하는 것으로 정의된다.

[0276] 본원에 사용된 "발현 카세트"는 종결 신호에 작동가능하게 연결될 수 있는 관심 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있는, 적절한 숙주 세포에서 특정 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시할 수 있는 핵산 서열을 의미한다. 코딩 영역은 통상적으로 관심 기능적 RNA, 예를 들어 에피토프 또는 접합 화합물을 코딩하는 RNA에 대해 코딩한다. 관심 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트는 키메라일 수 있다. 발현 카세트는 또한 자연 발생의 것이나 이종 발현에 유용한 재조합 형태로 수득한 것일 수 있다. 발현 카세트 내의 뉴클레오티드 서열의 발현은 구성적 프로모터 또는 숙주 세포가 일부 특정 자극에 노출된 경우에만 전사를 개시하는 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 다세포 유기체의 경우, 프로모터는 또한 특정 조직 또는 기관 또는 발생 단계에 특이적일 수 있다.

[0277] 이러한 발현 카세트는 관심 뉴클레오티드 서열에 연결된 전사 개시 영역을 포함할 수 있다. 이러한 발현 카세트는 조절 영역의 전사 조절 하에 있도록 관심 유전자를 삽입하기 위한 다수의 제한 부위와 함께 제공된다.

[0278] "조절 서열"은 전사, RNA 프로세싱 또는 안정성 또는 연관 코딩 서열의 번역에 영향을 미치는, 코딩 서열의 상류 (5' 비-코딩 서열), 내부 또는 하류 (3' 비-코딩 서열)에 위치하는 뉴클레오티드 서열이다. 조절 서열은 인핸서, 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론 및 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다. 이들은 천연 및 합성 서열, 뿐만 아니라 합성 및 천연 서열의 조합일 수 있는 서열을 포함한다. 본원에서 언급된 용어 "적합한 조절 서열"은 프로모터에 제한되지는 않는다. 그러나, 본 발명에 유용한 일부 적합한 조절 서열은 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 발생-특이적 프로모터, 조절가능한 프로모터 및 바이러스 프로모터를 포함할 것이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0279] "프로모터"는, RNA 폴리머라제, 및 적절한 전사에 요구되는 다른 인자에 대한 인식을 제공하여 코딩 서열의 발현을 지시하고/거나 제어하는, 그의 코딩 서열에 대해 통상적으로 상류 (5')에 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. "프로모터"는 TATA-박스, 및 발현의 제어를 위해 조절 요소가 첨가된 전사 개시 부위를 지정하는 역할을 하는 다른 서열로 구성된 짧은 DNA 서열인 최소 프로모터를 포함한다. "프로모터"는 또한, 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 제어할 수 있는 조절 요소 + 최소 프로모터를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 프로모터 서열의 이러한 유형은 근위 및 보다 원위의 상류 요소로 이루어질 수 있고, 후자의 요소는 종종 인핸서로 지칭된다. 따라서, "인핸서"는, 프로모터 활성을 자극할 수 있으며 프로모터의 본래 요소 또는 프로모터의 수준 또는 조직 특이성을 증진시키기 위해 삽입된 이종 요소일 수 있는 DNA 서열이다. 양쪽 배향 (정상 또는 반대)으로의 작동이 가능하며, 심지어 프로모터로부터 상류 또는 하류로 이동하는 경우에도 기능을 할 수 있다. 인핸서 및 다른 상류 프로모터 성분은 둘 다 이들의 효과를 매개하는 서열-특이적 DNA-결합 단백질에 결합한다. 프로모터는 그 전체가 천연의 유전자로부터 유래될 수 있거나, 또는 자연에서 발견되는 상이한 프로모터로부터

유래된 상이한 요소로 구성될 수 있거나, 또는 심지어 합성 DNA 절편으로 구성될 수 있다. 프로모터는 또한 생리학적 또는 발생 조건에 반응하여 전사 개시의 유효성을 제어하는 단백질 인자의 결합에 관여하는 DNA 서열을 함유할 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 프로모터의 예는 마우스 U6 RNA 프로모터, 합성 인간 H1RNA 프로모터, SV40, CMV, RSV, RNA 폴리머라제 II 및 RNA 폴리머라제 III 프로모터를 포함한다.

[0280] "개시 부위"는 위치 +1로도 정의되는, 전사된 서열의 일부인 제1 뉴클레오티드를 둘러싸는 위치이다. 상기 부위에 관하여 유전자의 다른 모든 서열 및 그의 제어 부위가 넘버링된다. 하류 서열 (즉, 3' 방향의 추가의 단백질 코딩 서열)은 양성으로 명명되고, 반면에 상류 서열 (대부분 5' 방향의 제어 영역)은 음성으로 명명된다.

[0281] 상류 활성화의 부재 하에 불활성이거나 크게 감소된 프로모터 활성을 갖는 프로모터 요소, 특히 TATA 요소는 "최소 또는 코어 프로모터"로 지칭된다. 적합한 전사 인자의 존재 하에, 최소 프로모터는 전사를 허용하도록 기능한다. 따라서, "최소 또는 코어 프로모터"는 단지 전사 개시에 필요한 모든 기초 요소, 예를 들어 TATA 박스 및/또는 개시제만으로 이루어진다.

[0282] "구성적 발현"은 구성적 또는 조절된 프로모터를 사용하는 발현을 지칭한다. "조건" 및 "조절된 발현"은 조절된 프로모터에 의해 제어된 발현을 지칭한다.

[0283] "작동가능하게-연결된"은 서열 중 하나의 기능이 또 다른 것에 의해 영향을 받도록 단일 핵산 단편 상에 핵산 서열이 회합하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 조절 DNA 서열은, 조절 DNA 서열이 코딩 DNA 서열의 발현에 영향을 미치도록 2개의 서열이 위치하는 경우에 (즉, 코딩 서열 또는 기능적 RNA가 프로모터의 전사 제어 하에 있음) RNA 또는 폴리펩티드에 대해 코딩하는 DNA 서열에 "작동가능하게 연결된" 또는 "회합된" 것으로 언급된다. 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 배향으로 조절 서열에 작동가능하게-연결될 수 있다.

[0284] "발현"은 세포 내에서의 내인성 유전자, 이종 유전자 또는 핵산 절편 또는 트랜스진의 전사 및/또는 번역을 지칭한다. 예를 들어, 에피토프 구축물의 경우, 발현은 에피토프의 전사만을 지칭할 수 있다. 또한, 발현은 센스 (mRNA) 또는 기능적 RNA의 전사 및 안정한 축적을 지칭한다. 발현은 또한 단백질의 생산을 지칭할 수 있다.

[0285] 용어 "형질전환"은 핵산 단편을 숙주 세포의 게놈 내로 전달함으로써 유전적으로 안정한 유전을 일으키는 것을 지칭한다. "숙주 세포"는 외인성 핵산 분자에 의해 형질전환된, 또는 형질전환될 수 있는 세포이다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 세포는 "트랜스제닉" 세포로 지칭된다.

[0286] "형질전환된", "형질도입된", "트랜스제닉" 및 "재조합"은 이종 핵산 분자가 도입된 숙주 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "형질감염"은 진핵 (예를 들어, 포유동물) 세포 내로의 DNA의 전달을 지칭한다. 용어 "형질전환"은 원핵 (예를 들어, 이. 콜라이) 세포 내로의 DNA의 전달을 지칭하도록 본원에 사용된다. 용어 "형질도입"은 세포를 바이러스 입자로 감염시키는 것을 지칭하도록 본원에 사용된다. 핵산 분자는 당업계에 일반적으로 공지되어 있는 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 공지된 PCR 방법은 프라이머 쌍, 네스티드 프라이머, 단일 특이적 프라이머, 축중성 프라이머, 유전자-특이적 프라이머, 벡터-특이적 프라이머, 부분-미스매치된 프라이머 등을 사용한 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, "형질전환된", "형질전환체" 및 "트랜스제닉" 세포는 형질전환 과정을 통하며, 그의 염색체 내로 통합된 외래 유전자를 함유한다. 용어 "형질전환되지 않은"은 형질전환 과정을 통하지 않은 정상 세포를 지칭한다.

[0287] "유전자 변경 세포"는 재조합 또는 이종 핵산 (예를 들어, 하나 이상의 DNA 구축물 또는 그의 RNA 대응부)의 도입에 의해 변형된 세포를 나타내고, 또한 이러한 유전자 변형의 일부 또는 전부를 보유하는 세포의 자손을 포함한다.

[0288] **본 발명의 핵산 분자**

[0289] 용어 "단리된 및/또는 정제된"은 핵산, 예를 들어 DNA 또는 RNA 분자를 서열분석 및/또는 복제 및/또는 발현시킬 수 있도록 그의 천연 세포 환경으로부터 및 세포의 다른 성분, 예컨대 핵산 또는 폴리펩티드와의 회합으로부터 시험관내에서 단리하는 것을 지칭한다. RNA 또는 DNA는 그것이 RNA 또는 DNA의 천연 공급원 내에서 정상적으로 회합하는 하나 이상의 오염 핵산이 없다는, 바람직하게는 임의의 다른 포유동물 RNA 또는 DNA가 실질적으로 없다는 점에서 "단리된다". 어구 "그것이 정상적으로 회합하는 하나 이상의 오염 공급원 핵산이 없는"은 핵산이 공급원 또는 천연 세포 내로 재도입되지만, 상이한 염색체 위치에 있거나 또는 공급원 세포, 예를 들어 벡터 또는 플라스미드에서 정상적으로 발견되지 않는 핵산 서열에 의해 달리 플랭킹된 경우를 포함한다.

[0290] 본원에 사용된 용어 "재조합 핵산", 예를 들어 "재조합 DNA 서열 또는 절편"은, 임의의 적절한 세포 공급원으로부터 유래 또는 단리되고 후속으로 시험관내에서 화학적으로 변경될 수 있어, 그의 서열이 자연 발생의 것이 아

니거나 또는 외인성 DNA로 형질감염되지 않은 게놈에서 위치하는 것과 같이 위치하지 않는 자연 발생 서열에 상응하는 핵산, 예를 들어 DNA를 지칭한다. 공급원으로부터 "유래된" 예비선택 DNA의 예는 주어진 유기체 내의 유용한 단편으로 확인되고 이어서 본질적으로 순수한 형태로 화학적으로 합성된 DNA 서열일 것이다. 공급원으로부터 "단리된" 이러한 DNA의 예는, 이를 본 발명에서의 용도를 위해 유전 공학의 방법론에 의해 추가로 조작, 예를 들어 증폭시킬 수 있도록 화학적 수단에 의해, 예를 들어 제한 엔도뉴클레아제의 사용에 의해 공급원으로부터 절제 또는 제거된 유용한 DNA 서열일 것이다. "재조합 DNA"는 완전 합성 DNA 서열, 반합성 DNA 서열, 생물학적 공급원으로부터 단리된 DNA 서열 및 RNA로부터 유래된 DNA 서열, 뿐만 아니라 그의 혼합물을 포함한다.

[0291] **본 발명의 발현 카세트**

[0292] 발현 카세트의 제조를 위해, 재조합 DNA 서열 또는 절편은 원형 또는 선형, 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있다. 일반적으로, DNA 서열 또는 절편은 생성된 형질전환된 세포에 존재하는 재조합 DNA의 발현을 촉진시키는 제어 서열에 의해 플랭킹된 코딩 영역을 함유할 수도 있는 플라스미드 DNA 또는 벡터와 같은 키메라 DNA의 형태로 있다.

[0293] 본원에 사용된 "키메라" 벡터 또는 발현 카세트는 2종 이상의 상이한 종으로부터의 핵산 서열을 포함하는 벡터 또는 카세트를 의미하거나, 또는 "천연" 또는 야생형의 종에서 발생하지 않는 방식으로 연결되거나 회합된 동일한 종으로부터의 핵산 서열을 갖는다.

[0294] RNA 전사체 또는 그의 부분에 대한 전사 단위의 역할을 하는 재조합 DNA 서열 이외에도, 재조합 DNA의 부분은 비전사되어 조절 또는 구조 기능을 담당할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA는 포유동물 세포에서 활성인 프로모터를 가질 수 있다.

[0295] 인트론, 인핸서, 폴리아데닐화 서열 등과 같은 숙주 세포에서 기능적인 다른 성분은 또한 재조합 DNA의 일부일 수 있다. 이러한 성분은 DNA의 기능에 필요할 수 있거나 그렇지 않을 수 있으나, 전사 등에 영향을 미침으로써 DNA의 개선된 발현을 제공할 수 있다. 이러한 성분은 세포에서 RNA의 최적 성능을 얻는데 바람직한 것으로서 DNA에 포함될 수 있다.

[0296] 제어 서열은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열이다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어 프로모터, 및 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

[0297] 작동가능하게 연결된 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓여 있는 핵산이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 그것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고, 리보솜 결합 부위는 그것이 번역이 용이하도록 위치된 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하여 연결된 DNA 서열이다. 그러나, 인핸서는 인접하여 위치할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 통상적인 실시에 따라 사용한다.

[0298] 세포 내로 도입될 재조합 DNA는 선택 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염된 것으로 여겨지는 세포 집단으로부터 발현 세포를 확인하고 선택하는 것을 용이하게 할 수 있다. 다른 실시양태에서, 선택 마커는 DNA의 개별 조각에 보유되고 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 마커 및 리포터 유전자는 둘 다 적절한 조절 서열에 플랭킹되어 숙주 세포에서 발현을 가능하게 할 수 있다. 유용한 선택 마커는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 항생제-내성 유전자, 예컨대 neo 등을 포함한다.

[0299] 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하기 위해, 그리고 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 리포터 유전자를 사용한다. 용이하게 검정가능한 단백질을 코딩하는 리포터 유전자는 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 의해 발현되거나 그 내부에 존재하지 않고, 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소적 활성에 의해 발현이 입증되는 단백질을 코딩하는 유전자이다. 예를 들어, 리포터 유전자는 이. 콜라이의 Tn9로부터의 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 유전자 (cat) 및 반딧불이 포티누스 피랄리스로부터의 루시페라제 유전자를 포함한다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적합한 시점에 검정한다.

[0300] 표적 세포를 형질감염시킬 수 있는 재조합 DNA를 구축하기 위한 일반적 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 동일한 조성물 및 구축 방법을 이용하여 본원에 유용한 DNA를 생산할 수 있다.

[0301] 특정 세포 내로의 도입에 유용한 임의의 절차, 예를 들어 물리적 또는 생물학적 방법에 의해 에피토프 또는 접합 화합물을 코딩하는 DNA로 구성된 발현 벡터로 형질감염시킴으로써, 재조합 DNA는 용이하게 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 내로 도입되어 에피솜 성분으로서 존재하거나 그의 게놈 내로 안정하게 통합된 재조합 DNA를 갖는 세포를 수득할 수 있고, 이에 따라 본 발명의 DNA 분자 또는 서열이 숙주 세포에 의해 발현된다. 바람직하게는, DNA는 벡터를 통해 숙주 세포 내로 도입된다. 숙주 세포는 바람직하게는 진핵 기원, 예를 들어 식물, 포유동물, 곤충, 효모 또는 진균 공급원의 것이나, 비-진핵 기원의 숙주 세포 또한 사용될 수 있다.

[0302] 예비선택 DNA를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주사, 전기천공 등을 포함한다. 관심 DNA를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 바이러스 벡터의 사용을 포함한다. 포유동물 유전자 요법의 경우, 하기 기재된 바와 같이, 카피 유전자를 숙주 게놈 내로 삽입하는 효율적인 수단을 이용하는 것이 바람직하다. 바이러스 벡터 및 특히 레트로바이러스 벡터는 포유동물, 예를 들어 인간 세포 내로 유전자를 삽입하는데 가장 폭넓게 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 폭스바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0303] 본원에 논의된 바와 같이, "형질감염된" 또는 "형질도입된" 숙주 세포 또는 세포주는 게놈이 하나 이상의 이종 또는 재조합 핵산 서열의 존재에 의해 변경되거나 강화된 것이다. 본 발명의 숙주 세포는 전형적으로 플라스미드 발현 벡터, 바이러스 발현 벡터에서 DNA 서열에 의한, 또는 단리된 선형 DNA 서열로서 형질감염에 의해 생산된다. 형질감염된 DNA는 에피토프 또는 접합 화합물을 코딩하는 서열로 구성된 염색체 통합 재조합 DNA 서열이 될 수 있다.

[0304] 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들어 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR과 같은 당업자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정; 특정 펩티드의 존재 또는 부재를, 예를 들어 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범주 내에 속하는 작용제를 확인하기 위해 본원에 기재된 검정에 의해 검출하는 것과 같은 "생화학적" 검정을 포함한다.

[0305] 도입된 재조합 DNA 절편으로부터 생산된 RNA를 검출하고 정량화하기 위해, RT-PCR을 이용할 수 있다. PCR의 이러한 적용에서, 먼저 역전사효소와 같은 효소를 사용하여 DNA 내로 RNA를 역전사하고, 이어서 통상적인 PCR 기술을 이용하여 DNA를 증폭시키는 것이 필요하다. 대부분의 경우, PCR 기술은 유용한 반면에 RNA 생성물의 완전성을 입증하지는 않을 것이다. RNA 생성물의 성질에 대한 추가의 정보는 노던 블롯팅에 의해 수득할 수 있다. 상기 기술은 RNA 종의 존재를 입증하고, 상기 RNA의 완전성에 대한 정보를 제공한다. RNA 종의 존재 또는 부재는 또한 도트 또는 슬롯 블롯 노던 혼성화를 이용하여 결정할 수 있다. 이들 기술은 노던 블롯팅의 변형이고, 단지 RNA 종의 존재 또는 부재만을 입증한다.

[0306] 서던 블롯팅 및 PCR이 당해 재조합 DNA 절편을 검출하는데 이용될 수 있는 반면, 이들은 예비선택 DNA 절편이 발현되고 있는지의 여부와 같은 정보는 제공하지 않는다. 발현은 도입된 재조합 DNA 서열의 펩티드 생성물을 구체적으로 확인함으로써 또는 숙주 세포에 도입된 재조합 DNA 절편의 발현에 의해 유발된 표현형 변화를 평가함으로써 평가할 수 있다.

[0307] **본 발명의 발현 카세트의 세포로의 도입 방법**

[0308] 핵산 물질 (예를 들어, 에피토프 또는 접합 화합물을 코딩하는 발현 카세트)을 형질감염 또는 형질도입과 같은 유전자 전달 방법에 의해 생체외 또는 생체내에서 세포 내로 도입하여 유전자 변형 세포를 제공할 수 있다. 다양한 발현 벡터 (즉, 표적 세포 내로의 외인성 핵산의 전달을 용이하게 하기 위한 비히클)는 당업자에게 공지되어 있다.

[0309] 본원에 사용된 바와 같이, "세포의 형질감염"은 첨가된 DNA의 혼입에 의한 새로운 핵산 물질의 세포에 의한 획득을 지칭한다. 따라서, 형질감염은 물리적 또는 화학적 방법을 이용하여 세포 내로 핵산을 삽입하는 것을 지칭한다. 인산칼슘 DNA 공동-침전, DEAE-덱스트란, 전기천공, 양이온성 리포솜-매개 형질감염, 텅스텐 입자-촉진된 마이크로입자 충격 및 스트론튬 포스페이트 DNA 공동-침전을 비롯한 여러 형질감염 기술이 당업자에게 공지되어 있다.

[0310] 반면에, "세포의 형질도입"은 DNA 또는 RNA 바이러스를 사용하여 세포 내로 핵산을 전달하는 과정을 지칭한다. 핵산을 세포 내로 전달하기 위한 RNA 바이러스 (즉, 레트로바이러스)는 본원에서 형질도입 키메라 레트로바이러스로 지칭된다. 레트로바이러스 내에 함유된 외인성 핵산 물질은 형질도입된 세포의 게놈 내로 혼입된다. 키

메라 DNA 바이러스 (예를 들어, 치료제를 코딩하는 cDNA를 보유하는 아데노바이러스)로 형질도입된 세포는 그의 게놈 내로 혼입된 외인성 핵산 물질을 갖지 않을 것이나, 세포 내 염색체외 보유된 외인성 핵산 물질을 발현할 수 있을 것이다.

[0311] 외인성 핵산 물질은 에피토프 또는 접합 화합물을 코딩하는 핵산을 전사를 제어하는 프로모터와 함께 포함할 수 있다. 프로모터는 전사를 개시하데 필요한 특정 뉴클레오티드 서열을 특징적으로 갖는다. 외인성 핵산 물질은 목적 유전자 전사 활성을 얻는데 필요한 추가의 서열 (즉, 인핸서)을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 논의의 목적을 위해, "인핸서"는 단순하게 코딩 서열과 함께 작용하여 (시스) 프로모터에 의해 지시된 기초 전사 수준을 변화시키는 임의의 비-번역 DNA 서열이다. 외인성 핵산 물질은 프로모터 및 코딩 서열이 코딩 서열의 전사가 허용되도록 작동가능하게 연결되도록 프로모터로부터 바로 하류의 세포 게놈 내로 도입될 수 있다. 발현 벡터는 삽입된 외인성 유전자의 전사를 제어하기 위한 외인성 프로모터 성분을 포함할 수 있다. 이러한 외인성 프로모터는 구성적 및 조절가능한 프로모터를 둘 다 포함한다.

[0312] 자연-발생 구성적 프로모터는 본질적 세포 기능의 발현을 제어한다. 그 결과, 구성적 프로모터의 제어 하에 있는 핵산 서열은 세포 성장의 모든 조건 하에 발현된다. 구성적 프로모터는 특정 구성적 또는 "하우스키핑" 기능을 코딩하는 하기 유전자에 대한 프로모터를 포함한다: 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPRT), 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR), 아데노신 데아미나제, 포스포글리세롤 키나제 (PGK), 피루베이트 키나제, 포스포글리세롤 뮤타제, 베타□-액틴 프로모터 및 당업자에게 공지된 다른 구성적 프로모터. 또한, 많은 바이러스 프로모터는 진핵 세포에서 구성적으로 기능한다. 이들은 특히 다음을 포함한다: SV40의 초기 및 후기 프로모터; 몰로니 백혈병 바이러스 및 기타 레트로바이러스의 긴 말단 반복부 (LTR); 및 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터.

[0313] 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있는 핵산 서열은 단독으로, 또는 유도제 또는 억제제의 존재 하에 보다 크거나 작은 정도로 발현된다 (예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터의 제어 하에 있는 전사는 특정 금속 이온의 존재 하에 매우 증가된다). 조절가능한 프로모터는 그의 유도 인자가 결합될 때 전사를 자극하는 반응성 요소 (RE)를 포함한다. 예를 들어, 혈청 인자, 스테로이드 호르몬, 레티노산, 시클릭 AMP 및 테트라시클린 및 독시시클린에 대한 RE가 있다. 특정 RE를 함유하는 프로모터를 선택하여 조절가능한 반응을 얻을 수 있고, 일부 경우에 RE 그 자체는 다양한 프로모터에 부착되어 코딩된 핵산 서열에 조절가능성을 부여할 수 있다. 따라서, 적절한 프로모터의 선택에 의해 (구성적 대 조절가능; 강 대 약), 유전자 변형 세포에서 핵산 서열의 존재 및 발현 수준을 둘 다 제어하는 것이 가능하다. 핵산 서열이 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있는 경우, 계내에서 핵산 서열의 전사를 허용하는 조건에 유전자 변형 세포를 노출시킴으로써, 예를 들어 작용제의 전사를 제어하는 조절가능한 프로모터의 특정 유도제의 복강내 주사에 의해 치료제의 계내 전달을 일으킨다. 예를 들어, 유전자 변형 세포 내의 메탈로티오네인 프로모터의 제어 하에 있는 핵산 서열의 계내 발현은 유전자 변형 세포를 계내에서 적절한 (즉, 유도) 금속 이온을 함유하는 용액과 접촉시킴으로써 개선된다.

[0314] 따라서, 계내에서 생성된 RNA의 양은 핵산 서열의 직접 전사에 사용된 프로모터의 성질 (즉, 프로모터의 구성적 또는 조절가능, 강 또는 약 여부) 및 세포 내에 있는 에피토프 또는 접합 화합물 서열을 코딩하는 외인성 핵산 서열 카피 수와 같은 인자를 제어함으로써 조절된다.

[0315] 하나 이상의 프로모터, 및 에피토프 또는 접합 화합물 서열을 코딩하는 하나 이상의 이종 핵산 서열 이외에도, 발현 벡터는 발현 벡터로 형질감염 또는 형질도입된 세포의 선택을 용이하게 하기 위한 선택 유전자, 예를 들어 네오마이신 내성 유전자를 포함할 수 있다.

[0316] 세포는 또한 2개 이상의 발현 벡터, 에피토프 또는 접합 화합물 서열을 코딩하는 핵산 서열(들)을 함유하는 하나 이상의 벡터, 선택 유전자를 함유하는 다른 벡터로 형질감염될 수 있다. 적합한 프로모터, 인핸서, 선택 유전자 및/또는 신호 서열의 선택은 과도한 실험 없이 당업자의 범주 내에 있을 것으로 여겨진다.

[0317] 하기 논의는 본 발명의 다양한 유용성에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명은 관심 유전자(들)의 발현을 침묵화하는데 적합한 발현 시스템으로서 유용성을 갖는다.

[0318] 본 발명은 또한 생체내 포유동물 수용자의 세포의 유전자 변형 방법을 제공한다. 한 실시양태에 따르면, 상기 방법은 예를 들어 벡터를 수용자에 주입함으로써, 포유동물 수용자의 세포에서 에피토프 또는 접합 화합물 서열을 발현시키기 위해 계내에서 발현 벡터를 도입하는 것을 포함한다.

[0319] **제제 및 투여 방법**

[0320] 본 발명의 백신 및 조성물은 제약 조성물로서 제제화될 수 있으며, 선택된 투여 경로, 즉 경구, 비강내, 피내

또는 비경구에 적합한 다양한 형태로, 정맥내, 근육내, 국소 또는 피하 경로에 의해 포유동물 숙주, 예컨대 인간 환자에게 투여될 수 있다.

[0321] 따라서, 본 발명의 화합물은 제약상 허용되는 비히클, 예컨대 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 함께 예를 들어 경구로 전신 투여될 수 있다. 이들은 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐 내에 봉입될 수 있거나, 정제로 압축될 수 있거나, 또는 환자 식이의 음식과 함께 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료적 투여를 위해, 활성 화합물을 하나 이상의 부형제와 배합하고, 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용할 수 있다. 이러한 조성물 및 제제는 적어도 0.1%의 활성 화합물을 함유해야 한다. 조성물 및 제제의 백분율은 물론 달라질 수 있으며, 편리하게는 주어진 단위 투여 형태의 약 2 내지 약 60 중량%일 수 있다. 이러한 치료학적으로 유용한 조성물에서의 활성 화합물의 양은 유효 투여량 수준이 수득되는 양이다.

[0322] 정제, 트로키, 환제, 캅셀 등은 또한 다음을 함유할 수도 있다: 결합제, 예컨대 트라가칸드 검, 아카시아 검, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 인산이칼슘; 붕해제, 예컨대 옥수수 전분, 감자 전분, 알진산 등; 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘; 및 감미제, 예컨대 수크로스, 프룩토스, 락토스 또는 아스파르탐 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 윈터그린 오일 또는 체리 향미제. 단위 투여 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 유형의 물질 이외에도 액체 담체, 예컨대 식물성 오일 또는 폴리에틸렌 글리콜을 함유할 수 있다. 여러 다른 물질이 코팅으로서 존재하거나, 또는 달리 고체 단위 투여 형태의 물리적 형태를 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 또는 캡슐은 젤라틴, 왁스, 쉘락 또는 당 등으로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 활성 화합물, 감미제로서의 수크로스 또는 프룩토스, 보존제로서의 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 향미제, 예컨대 체리 또는 오렌지 향미제를 함유할 수 있다. 물론, 임의의 단위 투여 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 제약상 허용되어야 하며 사용되는 양에서 실질적으로 비독성이어야 한다. 또한, 활성 화합물은 지속 방출 제제 및 장치에 혼입될 수 있다.

[0323] 또한, 활성 화합물은 주입 또는 주사에 의해 정맥내 또는 복강내 투여될 수 있다. 활성 화합물 또는 그의 염의 용액은 물 중에서 제조될 수 있고, 임의로 비독성 계면활성제와 혼합될 수 있다. 또한, 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴 및 이들의 혼합물, 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 보관 및 사용의 통상적인 조건 하에, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하는 보존제를 함유한다.

[0324] 주사 또는 주입에 적합한 제약 투여 형태는 멸균 주사가능한 또는 주입가능한 용액 또는 분산액을 즉석에서 제조하는 데 적합화되고, 임의로 리포좀 내로 캡슐화된, 활성 성분을 포함하는 멸균 수용액 또는 분산액, 또는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에, 최종 투여 형태는 제조 및 저장 조건 하에 멸균되고, 유체이고, 안정하여야 한다. 액체 담체 또는 비히클은 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일, 비독성 글리세릴 에스테르 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산 매질일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들어 리포좀의 형성에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 여러 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 완충제 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 조성물에서의 사용에 의해 이루어질 수 있다.

[0325] 멸균 주사가능한 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 필요에 따라 상기 열거된 여러 다른 성분과 함께 적절한 용매 중에 혼입시키고, 이어서 여과 멸균하여 제조한다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분의 분말 및 이전에 멸균-여과된 용액에 존재하는 임의의 추가의 목적 성분을 수득하는 진공 건조 및 동결 건조 기술이다.

[0326] 국소 투여의 경우, 본 발명의 화합물은 순수한 형태로, 즉 이들이 액체일 때 적용될 수 있다. 그러나, 일반적으로 이들을 피부과용으로 허용되는 담체와 조합하여 조성물 또는 제제로서 피부에 투여하는 것이 바람직할 것이며, 이는 고체 또는 액체일 수 있다.

[0327] 유용한 고체 담체는 미분된 고체, 예컨대 활석, 점토, 미세결정질 셀룰로스, 실리카, 알루미나 등을 포함한다. 유용한 액체 담체는 물, 알콜 또는 글리콜 또는 물-알콜/글리콜 블렌드를 포함하며, 여기서 본 발명의 화합물은 임의로 비-독성 계면활성제의 보조 하에 유효 수준으로 용해 또는 분산될 수 있다. 아주반트, 예컨대 향료 및 추가의 항미생물제를 첨가하여 주어진 용도에 대한 특성을 최적화할 수 있다. 생성된 액체 조성물은 밴드 및 다른 드레싱에 스며들게 하여 사용되는 흡수 패드로부터 적용될 수 있거나, 또는 펌프형 또는 에어로졸 분무기

를 사용하여 이환 부위에 분무될 수 있다.

[0328] 또한, 증점제, 예컨대 합성 중합체, 지방산, 지방산 염 및 에스테르, 지방 알콜, 변성 셀룰로스 또는 변성 미네랄 물질을 액체 담체와 함께 사용하여 사용자의 피부에 직접 도포하기 위한 바를 수 있는 페이스트, 겔, 연고, 비누 등을 형성할 수 있다.

[0329] 본 발명의 화합물을 피부로 전달하는데 사용될 수 있는 유용한 피부과용 조성물의 예는 당업계에 공지되어 있으며; 예를 들어, 문헌 [Jacquet et al. (미국 특허 번호 4,608,392), Geria (미국 특허 번호 4,992,478), Smith et al. (미국 특허 번호 4,559,157) 및 Wortzman (미국 특허 번호 4,820,508)]을 참조한다.

[0330] 본 발명의 화합물의 유용한 투여량은 그의 시험관내 활성, 및 동물 모델에서의 생체내 활성을 비교함으로써 결정될 수 있다. 마우스 및 다른 동물에서의 유효 투여량을 인간으로 외삽하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며; 예를 들어 미국 특허 번호 4,938,949를 참조한다.

[0331] 일반적으로, 액체 조성물, 예컨대, 로션 중 본 발명의 화합물(들)의 농도는 약 0.1-25 중량%, 바람직하게, 약 0.5-10 중량%일 것이다. 겔 또는 분말과 같은 반고체 또는 고체 조성물 중의 농도는 약 0.1-5 중량%, 바람직하게는 약 0.5-2.5 중량%일 것이다.

[0332] 치료에 사용하는 것이 요구되는 화합물 또는 그의 활성 염 또는 유도체의 양은 선택된 특정 염, 뿐만 아니라 투여 경로, 치료되는 병태의 성질, 및 환자의 연령 및 상태에 따라 달라질 것이며, 궁극적으로는 담당 의사 또는 임상의의 판단 하에 있을 것이다.

[0333] 그러나, 일반적으로, 적합한 용량은 하루에 체중 1 kg 당 약 0.5 내지 약 100 mg, 예를 들어 약 10 내지 약 75 mg의 범위, 예컨대 하루에 수용자의 체중 킬로그램 당 3 내지 약 50 mg의 범위, 바람직하게는 6 내지 90 mg/kg/일의 범위, 가장 바람직하게는 15 내지 60 mg/kg/일의 범위일 것이다.

[0334] 화합물은, 예를 들어 단위 투여 형태당 5 내지 1,000 mg, 편리하게는 10 내지 750 mg, 가장 편리하게는, 50 내지 500 mg의 활성 성분을 함유하는 단위 투여 형태로 편리하게 투여된다.

[0335] 이상적으로, 활성 성분은 약 0.5 내지 약 75 μM, 바람직하게는 약 1 내지 50 μM, 가장 바람직하게는 약 2 내지 약 30 μM의 활성 화합물의 최고 혈장 농도가 달성되도록 투여되어야 한다. 이는, 예를 들어 임의로 염수 중의 0.05 내지 5%의 활성 성분 용액을 정맥내 주사하거나, 또는 약 1-100 mg의 활성 성분을 함유하는 볼루스로서 경구로 투여하는 것에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 혈액 수준은 약 0.01-5.0 mg/kg/hr이 제공되도록 연속 주입하는 것에 의해, 또는 활성 성분(들)을 약 0.4-15 mg/kg 함유하는 간헐적 주입에 의해 유지될 수 있다.

[0336] 목적 용량은 편리하게는 단일 용량으로 또는 적절한 간격으로 투여되는 분할 용량 (예를 들어, 1일 2회, 3회, 4회 또는 그 초과의 하위-용량)으로 제공될 수 있다. 하위-용량 자체는, 예를 들어 다수의 느슨한 간격의 분리된 투여로 추가로 분할될 수 있는데; 예컨대 취입기로부터 다중 취입되거나, 또는 다수의 점적을 안구로 적용할 수 있다.

[0337] 상기 명세서 및 실시예가 본 발명을 완전히 개시하고 가능하게 할지라도, 이들은 본원에 첨부된 특허청구범위에 의해 규정되는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0338] 모든 공보, 특허 및 특허출원은 본원에 참조로 포함된다. 상기 명세서에서 본 발명은 그의 특정 실시양태와 관련하여 기재되었고, 설명의 목적으로 많은 상세한 설명이 기재되었지만, 본 발명은 추가의 실시양태가 가능하고, 본원에 기재된 특정한 상세한 설명은 본 발명의 기본 원리로부터 벗어나지 않으면서 상당히 변형될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

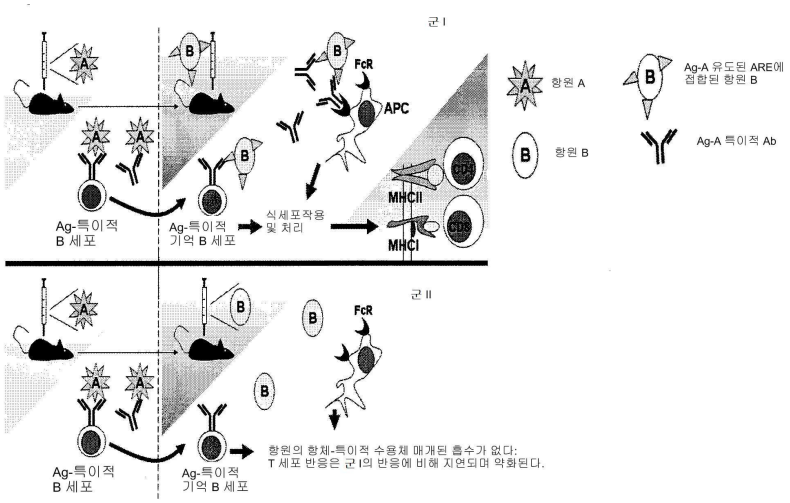
[0339] 본 발명을 기재하는 것과 관련하여 단수 용어 및 유사 지시 대상을 사용하는 것은 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 또는 문맥상 명확하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수, 둘 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "포함하는", "갖는", "비롯한" 및 "함유하는"은 달리 언급되지 않는 한, 제약을 두지 않는 용어 (즉, "포함하나, 이에 제한되지는 않는"을 의미함)로서 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위의 언급은 본원에 달리 제시되지 않는 한, 단지 상기 범위 내에 속한 각각의 값을 개별적으로 언급하기 위한 하나의 단축 방법으로서의 역할을 하는 것이고, 각 개별적 값은 본원에서 개별적으로 인용되는 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에 달리 나타내거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 어구 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이고 달리 청구하지 않는 한 본 발명의 범주를 제한하려는 것이 아니다. 명세서에서의 어구는

임의의 청구되지 않은 요소를 본 발명의 실시에 필수적인 것으로 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

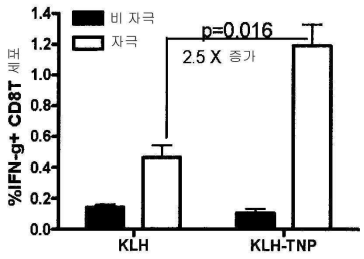
[0340] 본원에는 본 발명자에게 공지된, 본 발명을 수행하기 위한 최상의 모드를 비롯한 본 발명의 실시양태가 기재되어 있다. 상기 설명 판독시 상기 실시양태의 변형은 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명자들은 당업자가 이러한 변형을 적절하게 이용할 것으로 예상하며, 본 발명자들은 본원에 명시적으로 기재된 것과 다르게 실시될 본 발명을 의도한다. 따라서, 본 발명은, 준거법에 의해 허용되는, 본원에 첨부된 특허청구범위에 언급된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 본 발명의 모든 가능한 변형에서 상기 기재된 요소의 임의의 조합은 본원에 달리 명시되거나 또는 문맥상 달리 명백하게 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다.

도면

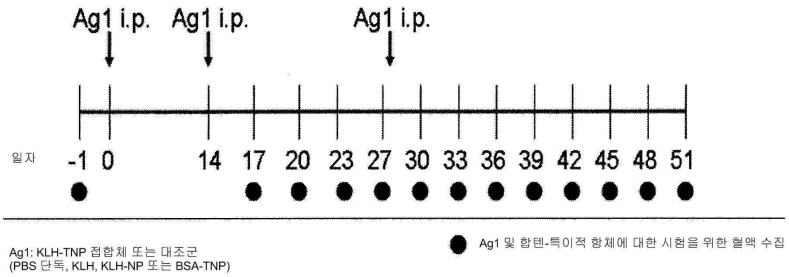
도면1



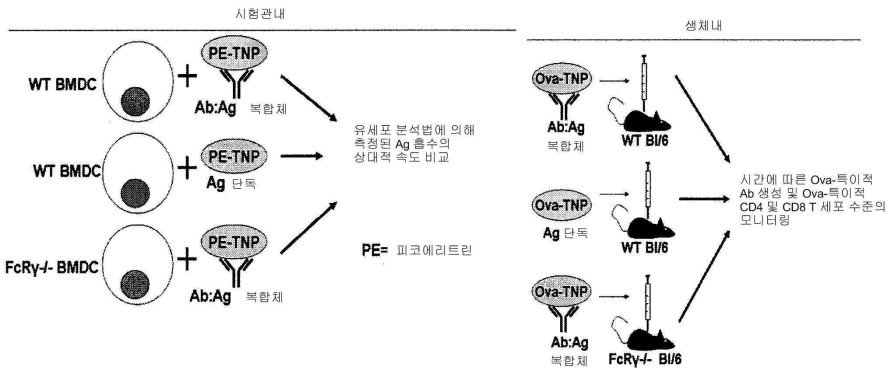
도면2



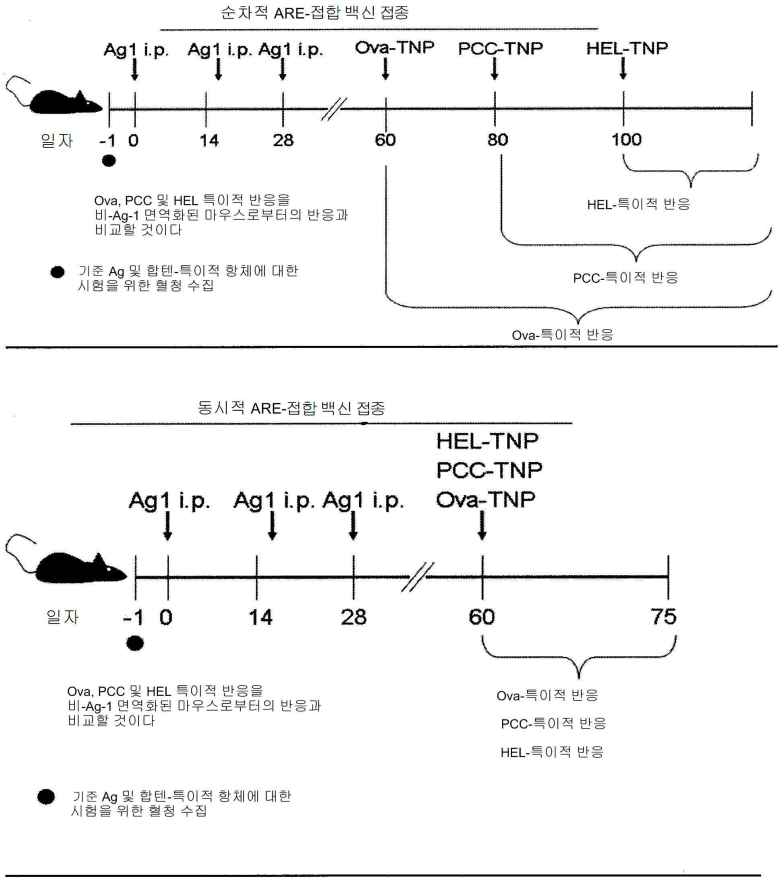
도면3


Ag1 i.p.
Ag1 i.p.
Ag1 i.p.
일자
-1 0 14 17 20 23 27 30 33 36 39 42 45 48 51
Ag1: KLH-TNP 접합체 또는 대조군
(PBS 단독, KLH, KLH-NP 또는 BSA-TNP)
Ag1 및 합텐-특이적 항체에 대한 시험을 위한 혈액 수집

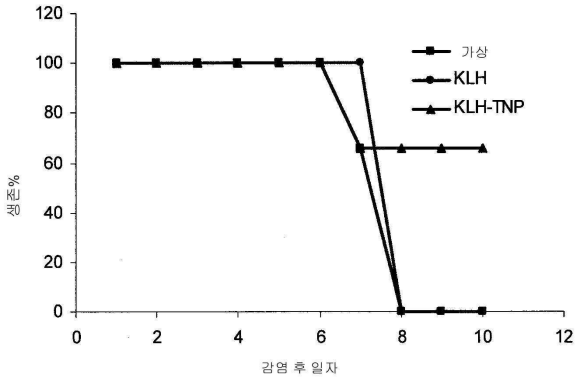
도면4


시험관내
생체내
WT BMDC
PE-TNP
Ab:Ag 복합체
WT BMDC
PE-TNP
Ag 단독
FcRγ-/- BMDC
PE-TNP
Ab:Ag 복합체
유세포 분석법에 의해
측정된 Ag 흡수의
상대적 속도 비교
PE= 피코에리트린
Ova-TNP
Ab:Ag
복합체
WT Bl/6
Ova-TNP
Ag 단독
WT Bl/6
Ova-TNP
Ab:Ag
복합체
FcRγ-/- Bl/6
시간에 따른 Ova-특이적
Ab 생성 및 Ova-특이적
CD4 및 CD8 T 세포 수준의
모니터링

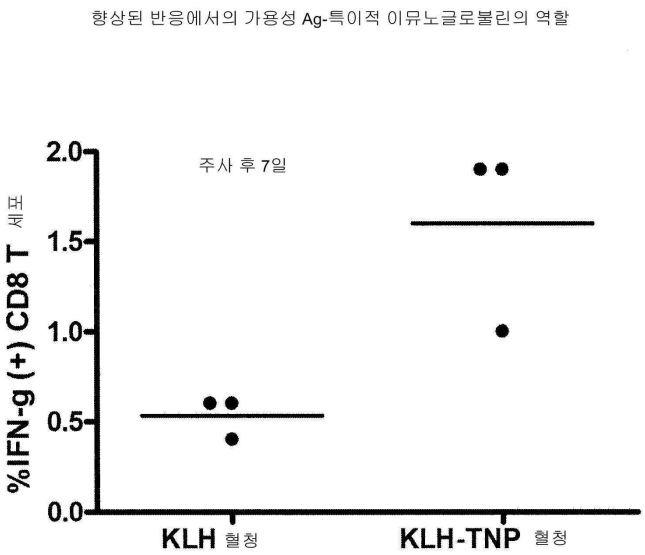
도면5


순차적 ARE-접합 백신 접종
Ag1 i.p.
Ag1 i.p.
Ag1 i.p.
Ova-TNP
PCC-TNP
HEL-TNP
일자
-1
0
14
28
60
80
100
Ova, PCC 및 HEL 특이적 반응을 비-Ag-1 면역화된 마우스로부터의 반응과 비교할 것이다
기준 Ag 및 합텐-특이적 항체에 대한 시험을 위한 혈청 수집
HEL-특이적 반응
PCC-특이적 반응
Ova-특이적 반응
동시적 ARE-접합 백신 접종
HEL-TNP
PCC-TNP
Ova-TNP
Ag1 i.p.
Ag1 i.p.
Ag1 i.p.
일자
-1
0
14
28
60
75
Ova, PCC 및 HEL 특이적 반응을 비-Ag-1 면역화된 마우스로부터의 반응과 비교할 것이다
Ova-특이적 반응
PCC-특이적 반응
HEL-특이적 반응
기준 Ag 및 합텐-특이적 항체에 대한 시험을 위한 혈청 수집

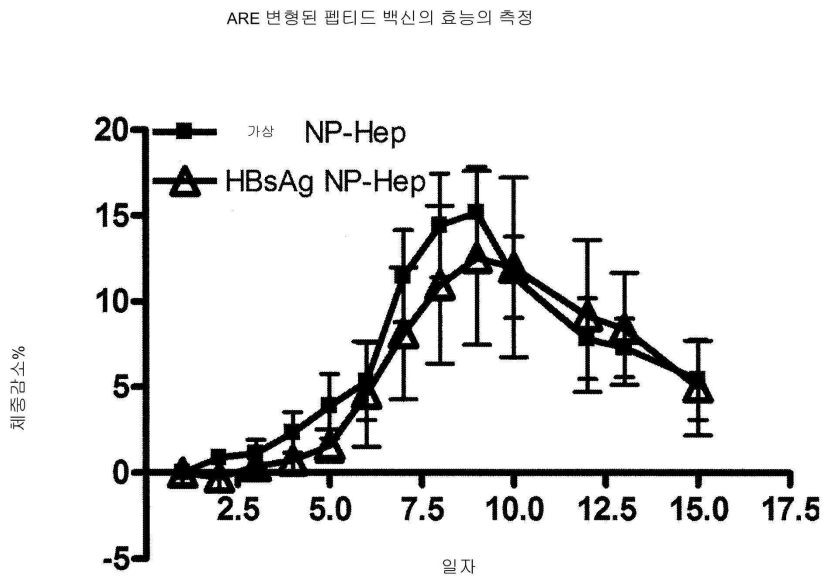
도면6


120
100
80
60
40
20
0
생존%
0
2
4
6
8
10
12
감염 후 일자
가상
KLH
KLH-TNP

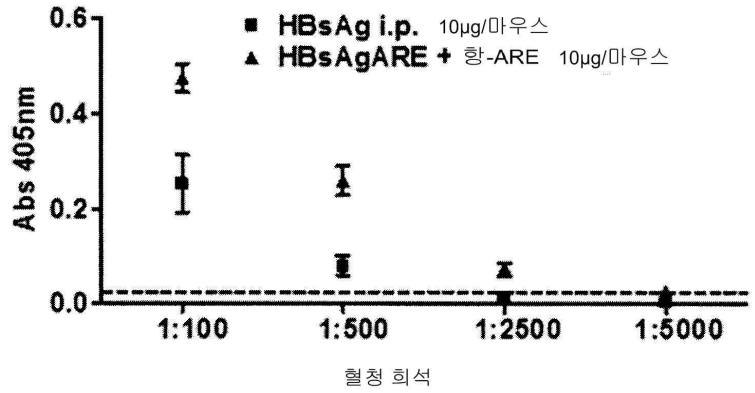
도면7

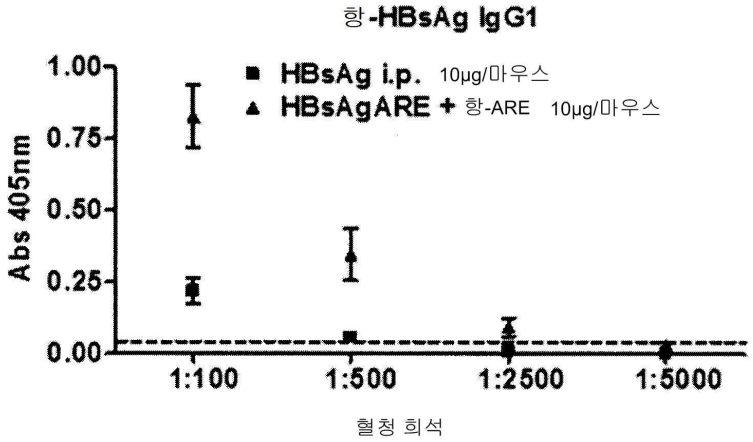

향상된 반응에서의 가용성 Ag-특이적 이뮤노글로불린의 역할
주사 후 7일
%IFN-g (+) CD8 T 세포
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
KLH 혈청
KLH-TNP 혈청

도면8


ARE 변형된 펩티드 백신의 효능의 측정
가상 NP-Hep
HBsAg NP-Hep
체중감소%
20
15
10
5
0
-5
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
일자

도면9





서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION

<120> METHODS OF IMPROVING VACCINE IMMUNOGENICITY

<130> 17023.114WO1

<140> PCT/US2012/032190

<141> 2012-04-04

<150> 61/471,553

<151> 2011-04-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Human poliovirus 1

<400> 1

Ile Pro Ala Leu Thr Ala Val Glu Thr Gly Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Human poliovirus 1

<400> 2

Ala His Ser Lys Glu Ile Pro Ala Leu Thr Ala Val Glu Thr Gly Ala

1 5 10 15

Thr Ala

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Human poliovirus 1

<400> 3

Ala Leu Thr Ala Val Glu Thr Gly Ala Thr

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Influ-NP MHC

class I epitope peptide

<400> 4

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met

1 5

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: HBsAg MHC
class I epitope peptide

<400> 5

Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Ovalbumin MHC
class II epitope peptide

<400> 6

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Influ-NP MHC
class II epitope peptide

<400> 7

Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Influ-NP MHC
class II epitope peptide

<400> 8

Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys

1 5 10 15

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: HBsAg MHC
class II epitope peptide

<400> 9

Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys
1 5 10 15

Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys
20

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: HBsAg MHC
variant epitope peptide

<400> 10

Arg Ala Gly Gly
1

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Ovalbumin MHC
class I epitope peptide

<400> 11

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 12

<211> 498

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 12

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Gly
1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
20 25 30

Val Ser Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
35 40 45

Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Arg Tyr Leu Glu
65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
85 90 95

Tyr Arg Arg Arg Asp Gly Lys Trp Val Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
100 105 110

Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Leu Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
130 135 140

Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp

225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu

245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His

260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Ala Ser Gly

275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe

290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Phe Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu

305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala

325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr Arg Val

340 345 350

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

355 360 365

Glu Asn Met Glu Val Met Asp Ser Asn Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg

370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Lys

385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg

405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn

420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met

435 440 445

Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe

450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp

465 470 475 480

Met Asn Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
485 490 495
Asp Asn

<210> 13
<211> 498
<212> PRT
<213> Influenza A virus
<400> 13
Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1 5 10 15
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met
20 25 30
Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys

35 40 45
Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu
50 55 60
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
65 70 75 80
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
85 90 95
Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp

100 105 110
Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp
115 120 125
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
130 135 140
Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
145 150 155 160
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser

165 170 175
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu

180 185 190

Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg

195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn

210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp

225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Phe Glu Asp Leu

245 250 255

Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His

260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly

275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe

290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu

305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala

325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val

340 345 350

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

355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg

370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg

385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg

405 410 415

Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Asn Gly Asn

420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
485 490 495

Asp Asn

<210> 14
<211> 565
<212> PRT
<213> Influenza A virus
<400> 14

Met Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Asp
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn

130 135 140

Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys
165 170 175

Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Ile His His Pro Pro Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr
195 200 205

Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg
210 215 220

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala
225 230 235 240

Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile
245 250 255

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

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met
275 280 285

His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser
290 295 300

Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
340 345 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
355 360 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
370 375 380

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Thr Val Ile Glu
385 390 395 400
Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
405 410 415
Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
435 440 445
Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
450 455 460
Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
465 470 475 480
Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg
485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
500 505 510
Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln
515 520 525
Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
530 535 540
Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
565