



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월19일
(11) 등록번호 10-0879151
(24) 등록일자 2009년01월09일

(51) Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01) A61K 39/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7003818

(22) 출원일자 2003년03월15일

심사청구일자 2006년09월08일

번역문제출일자 2003년03월15일

(65) 공개번호 10-2003-0055265

(43) 공개일자 2003년07월02일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/011315

국제출원일자 2001년09월14일

(87) 국제공개번호 WO 2002/22169

국제공개일자 2002년03월21일

(30) 우선권주장

00402562.3 2000년09월15일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

W01993021324 A1*

J. Immunol., vol.162, no.7,
pp.4157-4162(1999.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

상프르 나쇼날 드 라 리쉴르쉬 샹띠피끄 (제엔알
에스)

프랑스, 에프-75794 파리, 세텍스 16, 뤼 미셸-앙
즈 3

앵스티띠 파스퇴르

프랑스공화국 파리 세텍스 15 에프-75724 뤼 드닥
터르 루 25-28

(72) 발명자

레끌레끌로드

프랑스파리에프-75015뤼드라미탈루쎝13

게르몽프레삐에르

프랑스까샹에프-94280뤼에띠엔느돌레53-57

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 신정건

전체 청구항 수 : 총 46 항

심사관 : 김문경

(54) CD 11 b 발현 세포로의 분자 전달용 벡터

(57) 요약

본 발명은 생체내에서 대상 분자를 특이적으로 CD11b 발현 세포에 표적화하는 벡터의 제조시 보르데텔라 (Bordetella) 아테닐시클라제 독소의 신규한 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명은 면역 반응을 촉진하는 면역원 성 조성물, CD11b 발현 세포로 분자를 전달하기 위한 약학 조성물 및 신규 벡터에 관한 것이다.

(72) 발명자

라당다니엘

프랑스까상에프-94230뤼드랭스3

기소니폴

프랑스파리에프-75008뤼리스토프폴롱4

끌레프나디아

프랑스파리에프-75002뤼그레네타49

보세세실

프랑스파리에프-75005뤼드캬트레파즈9

파울르까뜨린느

프랑스에빠네쉴르오르쉴에프-91360알레테로제3

엘-아자미엘-이드리시모하메드

프랑스파리에프-75015뤼데볼롱페르레지당스앵스띠
뛰빠스띠르

(81) 지정국

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

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

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

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

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

특허청구의 범위

청구항 1

대상 분자를 CD11b 발현 세포에 특이적으로 표적화하는데 사용하기 위한, 대상 분자와 커플링된 보르데텔라 (*Bordetella*) 중 아데닐시클라제로 이루어진 단백질성 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상 분자는 적어도 CD11b 발현 세포의 표면에 표적화되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대상 분자는 CD11b 발현 세포의 시토졸 내로 전달되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 대상 분자는 CD11b 발현 세포의 식균 경로로 전달되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 CD11b 발현 세포는 수지상 세포인 것인 단백질성 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 수지상 세포는 골수성 수지상 세포인 것인 단백질성 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 CD11b 발현 세포는 호중구인 것인 단백질성 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보르데텔라 중 아데닐시클라제는 천연 또는 변형 아데닐시클라제인 단백질성 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보르데텔라 중 아데닐시클라제는 재조합 아데닐시클라제인 것인 단백질성 벡터.

청구항 10

제8항에 있어서, 보르데텔라 중 아데닐시클라제는 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 단편이고, 이 단편은 CD11b 수용체에 결합할 수 있는 것인 단백질성 벡터.

청구항 11

제9항에 있어서, 보르데텔라 중 아데닐시클라제는 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 단편이고, 이 단편은 CD11b 수용체에 결합할 수 있는 것인 단백질성 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서, CD11b 수용체에 결합할 수 있는 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 단편은 N-말단 측매 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 보르데텔라 아데닐시클라제 독소인 것인 단백질성 벡터.

청구항 13

제8항에 있어서, CD11b 수용체에 결합할 수 있는 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 단편은 잔기 1 내지 373의 전부 또는 일부가 결여된 보르데텔라 퍼투스시스(*Bordetella pertussis*) 아데닐시클라제 독소인 것인 단백질성 벡터.

청구항 14

제9항에 있어서, CD11b 수용체에 결합할 수 있는 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 단편은 잔기 1 내지 373의 전부 또는 일부가 결여된 보르데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*) 아데닐시클라제 독소인 것인 단백질성 벡터.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대상 분자는 펩티드, 글리코펩티드, 리포펩티드 및 핵산으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 대상 분자는 허용 부위에서 아데닐시클라제의 촉매 도메인에 삽입된 이중성 펩티드인 것인 단백질성 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서, 삽입은 아데닐시클라제가 CD11b 발현 세포에 특이적으로 결합하는 것에 영향을 미치지 않는 것인 단백질성 벡터.

청구항 18

제16항에 있어서, 삽입은 아데닐시클라제가 CD11b 발현 세포에 특이적으로 결합하는 것과 촉매 도메인의 전위에 영향을 미치지 않는 것인 단백질성 벡터.

청구항 19

제16항에 있어서, 허용 부위는 보르데텔라 퍼투시스 아데닐시클라제의 잔기 137-138, 잔기 224-225, 잔기 228-229, 잔기 235-236, 잔기 317-318 및 잔기 335-336으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 20

제17항에 있어서, 허용 부위는 보르데텔라 퍼투시스 아데닐시클라제의 잔기 137-138, 잔기 224-225, 잔기 228-229, 잔기 235-236, 잔기 317-318 및 잔기 335-336으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 21

제18항에 있어서, 허용 부위는 보르데텔라 퍼투시스 아데닐시클라제의 잔기 137-138, 잔기 224-225, 잔기 228-229, 잔기 235-236, 잔기 317-318 및 잔기 335-336으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 22

제15항에 있어서, 대상 분자는 N-말단 촉매 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 유전자 변형 보르데텔라 아데닐시클라제의 N-말단 단부에 융합된 이중성 펩티드인 것인 단백질성 벡터.

청구항 23

제22항에 있어서, 대상 분자는 잔기 1 내지 373이 결여된 보르데텔라 퍼투시스 아데닐시클라제의 N-말단 단부에 융합된 이중성 펩티드인 것인 단백질성 벡터.

청구항 24

제16항에 있어서, 대상 분자는 항원인 것인 단백질성 벡터.

청구항 25

제17항에 있어서, 대상 분자는 항원인 것인 단백질성 벡터.

청구항 26

제18항에 있어서, 대상 분자는 항원인 것인 단백질성 벡터.

청구항 27

제24항에 있어서, 대상 분자는 에피토프를 포함하는 것인 단백질성 벡터.

청구항 28

제25항에 있어서, 대상 분자는 에피토프를 포함하는 것인 단백질성 벡터.

청구항 29

제26항에 있어서, 대상 분자는 에피토프를 포함하는 것인 단백질성 벡터.

청구항 30

제24항에 있어서, 상기 항원은 세포내 박테리아 세포 항원, 종양 세포 항원, 바이러스 항원, 진균류 항원 또는 기생충 세포 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 31

제25항에 있어서, 상기 항원은 세포내 박테리아 세포 항원, 종양 세포 항원, 바이러스 항원, 진균류 항원 또는 기생충 세포 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 32

제26항에 있어서, 상기 항원은 세포내 박테리아 세포 항원, 종양 세포 항원, 바이러스 항원, 진균류 항원 또는 기생충 세포 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 33

제27항에 있어서, 상기 항원은 세포내 박테리아 세포 항원, 종양 세포 항원, 바이러스 항원, 진균류 항원 또는 기생충 세포 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 34

제24항에 있어서, 상기 항원은 폴리오바이러스 항원, HIV 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 맥락수막염 바이러스 에피토프, 종양 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 35

제25항에 있어서, 상기 항원은 폴리오바이러스 항원, HIV 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 맥락수막염 바이러스 에피토프, 종양 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 36

제26항에 있어서, 상기 항원은 폴리오바이러스 항원, HIV 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 맥락수막염 바이러스 에피토프, 종양 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 37

제27항에 있어서, 상기 항원은 폴리오바이러스 항원, HIV 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 맥락수막염 바이러스 에피토프, 종양 항원으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 벡터.

청구항 38

제1항에 있어서, 대상 분자는 보르데텔라 중 아데닐시클라제에 유전자적으로 또는 화학적으로 커플링된 것인 단백질성 벡터.

청구항 39

제38항에 있어서, 대상 분자는 상기 아데닐시클라제에 화학적으로 또는 유전자적으로 커플링된 약물인 것인 단

백질성 벡터.

청구항 40

제39항에 있어서, 약물은 아데닐시클라제의 촉매 도메인에 위치한 유전자적으로 삽입된 시스테인 잔기에 이황화 결합을 통해 화학적으로 커플링되어 있는 것인 단백질성 벡터.

청구항 41

제40항에 있어서, 유전자 변형된 아데닐시클라제는 허용 부위에서 촉매 도메인 내에 삽입된 1 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 것인 단백질성 벡터.

청구항 42

제39항에 있어서, 약물은 항염증성 약물인 것인 단백질성 벡터.

청구항 43

제38항에 있어서, 대상 분자는 촉매 도메인 내에 허용 부위에서 유전자적으로 삽입된 1 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 유전자 변형된 아데닐시클라제에 화학적으로 커플링된 에피토프인 것인 단백질성 벡터.

청구항 44

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 아데닐시클라제는 비독성 형태인 것인 단백질성 벡터.

청구항 45

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 아데닐시클라제는 보르데텔라 퍼투스에서 유래한 것인 단백질성 벡터.

청구항 46

제40항에 있어서, 유전자 변형된 아데닐시클라제는 삽입된 1 이상의 시스테인 잔기에 1 이상의 이황화 결합을 통해 1 이상의 대상 분자에 결합된 것인 단백질성 벡터.

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 생체내에서 대상 분자를 특이적으로 CD11b 발현 세포에 표적화하는 벡터의 제조시 보르데텔라 (*Bordetella*) 아데닐시클라제 독소의 신규한 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명은 면역 반응을 촉진하는 면역원성 조성물, CD11b 발현 세포로 분자를 전달하기 위한 약학 조성물 및 신규 벡터에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 백일 기침의 원인제인 보르데텔라 퍼투스시스(*Bordetella pertussis*)는 잘 알려진 백일해 독소(PT)와 아데닐시클라제라고도 하는 아데닐레이트 시클라제 독소(CyaA)를 비롯한 일부 독소를 분비한다. CyaA는 쥐 호흡 모델에서 폐 집락형성의 초기 단계에 필요한 B.퍼투스시스의 중요한 독성 인자이다. 실제로, 이러한 독소가 유전적으로 결실되어 있는 경우에는 B.퍼투스시스 감염의 병적 효과가 급격히 감소되어, 폐로부터 회수되는 박테리아 수가 감소하고 감염 후에 관찰되는 염증성 세포 증가 및 폐 병변이 거의 없어진다[Weiss et al., 1984; Weiss et al., 1989; Gross et al., 1992; Khelef et al., 1992; Khelef et al., 1994; Gueirard et al., 1998]. 또한, CyaA는 쥐 호흡 모델에서 B.퍼투스시스 감염에 대한 보호성 항원이다[Guiso et al., 1989; Guiso et al., 1991].
- <3> Hewlett 등[Hewlett et al., 1976]에 의해 B.퍼투스시스 배양 상청액 중에서 처음 발견된 아데닐시클라제는, 이후에 진행 세포의 칼모듈린에 의해 활성화되는 것으로 밝혀졌다[Wolff et al., 1980]. 이러한 인상적인 특징은, Confer 및 Eaton이 진행 세포로 아데닐시클라제를 도입하면 칼모듈린에 의해 활성화시 표적 세포 내에서 cAMP의 다량 증가가 촉발된다는 것을 밝힘으로써 신속하게 해명되었다[Confer et al., 1982].
- <4> 아데닐시클라제는 *cyaA* 유전자에 의해 암호화되고, 이 유전자의 발현은 B.퍼투스시스의 다른 독성 유전자와 유사하게 환경 신호들이 협동적으로 작용하여 조절된다. *cyaA* 유전자는 CyaA 분비에 필요한 유전자 *cya B*, *D* 및 *E*를 포함하는 오페론의 일부이다[Ladant et al., 1999].
- <5> CyaA 독소는 400개 아미노산의 N-말단 촉매 도메인과 1306 잔기의 C-말단부로 구성된 1706 잔기의 이작용성 단백질로서, 표적 세포막에 독소를 결합시킨 후 세포의 시토플asm에 촉매 부분을 전달하는 것과 관련되어 있다[Sakamoto et al., 1992] [Ladant et al., 1999]. 이 부분은 또한 생물학적 막에서 양이온 선택성 통로를 형성할 수 있기 때문에 약한 용혈 활성을 나타낸다[Benz et al., 1994] [Gray et al., 1998]. 이 영역은 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*) 헤모리신과 박테리아 독소의 RTX(Repeat in ToXin)과의 다른 구성원에 대해 상동성이다. 특히, 이 영역은 일련의 글리신 및 아스파르트레이트가 풍부한 노나펩티드 반복부를 포함하는 데, 이 반복부는 칼슘 결합에 관여한다[Rose et al., 1995] [Coote et al., 1992].
- <6> CyaA 폴리펩티드는 2개의 내부 리신(리신 856 및 963)의 번역후 팔미토일화에 의해 활성 독소로 전환되는 불활성 전독소(protoxin)로서 합성된다. 이러한 변형에는, B.퍼투스시스 염색체 상의 *cyaA* 근처에 위치한 보조 유전자인 *cyaC*의 산물이 필요하다.
- <7> CyaA는 포유류 적혈구와 같이 막 통행이 결여된 세포를 비롯한 각종 종류의 세포에 결합하여 침입하는 것으로 밝혀졌다[Rogel et al., 1992]. 이는 CyaA의 촉매 도메인이 표적 세포의 혈장막을 통해 직접 전위됨을 시사한다. 촉매 도메인의 세포 시토플asm 내로의 내부 이행(internalization)은 칼슘 및 온도 의존적이며, 혈장막 전위에 따라 좌우된다[Rogel et al., 1992] [Karimova et al., 1998] [Otero et al., 1995]. 그러나, 독소가 막을 통해 N-말단 촉매 도메인을 수송하는 분자 기전은 현재까지 대부분 알려지지 않고 있다. 또한, CyaA 결합에 대한 특이적 수용체가 보고된 적도 없었다.
- <8> CyaA에 의한 세포 증독의 생리학적 결과는 시험관 내에서 포식 세포에서 특성규명되었다. Confer 및 Eaton은 먼저 B.퍼투스시스로부터 추출한 CyaA가 호중구 또는 대식 세포에서 세포내 cAMP 레벨을 증가시켜 과산화물 생성 및 포식세포 능력과 같은 살균 작용과 화학주성의 억제제를 초래한다는 것을 밝혀냈다[Confer et al., 1982]. 이러한 활성은 나중에 CyaA를 유전자 결실시킨 박테리아 변종 또는 정제된 독소로 확인되었다[Pearson et al., 1987; Friedman et al., 1987] [Njamkepo et al., 2000]. 반대로, cAMP 함량의 상당한 변화와 무관하게, 비-조혈 기원으로부터 얻은 세포주의 생존성은 CyaA 증독에 의해 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다[Bassinet et al.,

2000]. 또한, 이전에 본 발명자들은 B.퍼투시스 CyaA가 시험관내[Khelef et al., 1993; Khelef et al., 1995] 및 생체내[Gueirard et al., 1998]에서 대식세포 아포토티스를 촉발함을 입증한 바 있다. 이들 모델에서, CyaA의 유전자를 결실시키면 대식세포 아포토티스가 일어나지 않지만, 호중구 사멸은 발생한다. 이러한 결과가 제안하는 바는, CyaA는 i) 주로 대식세포 아포토티스에 관여하고, ii) 호중구 아포토티스에 관여할 수도 있지만, 또 다른 인자가 관여할 수도 있다는 것이다.

<9> 그 외에도, B. 브론치셉티카(*B. bronchiseptica*) 감염(CyaA가 밀접하게 관련되어 있는 B.퍼투시스의 동물 상동체)의 쥐 모델에서 실시된 생체내 연구로 B.브론치셉티카 CyaA 독성의 주요 표적이 감염의 초기 단계를 제어하는 GM-CSF 의존성 및 시클로로스파미드 감수성 군집이 입증되었다[Harvill et al., 1999]. 이러한 기준으로 호중구와 경우에 따라서 대식 세포 또는 수지상 세포를 비롯한 다른 세포를 동정하였지만, CyaA에 의한 표적화에 CD11b 세포 수용체가 연루되어 있다는 데이터가 개시되거나 시사된 바 없다. CyaA에 대한 표적 세포군은 감염의 초기 단계를 제한하고, 감염의 후기 단계를 제어하는 적당한 면역 반응 발생을 촉진하는 것이다[Harvell et al., 1999].

<10> CyaA는 다른 독소와는 달리, 임의의 수용체 결합과 무관한 것으로 오랫동안 생각되어 왔다. 이는, i) CyaA가 각종 기원으로부터 얻은 각종 모델 세포주를 중독시킬 수 있고[Ladant et al., 1999], ii) CyaA가 비 포화성 방식으로 양의 적혈구 및 주르카트 세포에 결합한다[Gray et al., 1999]는 관찰 결과에 기초한 것이다. 그러나, CyaA에 의해 감염된 세포에 대해서 일부 특이성이 확인된 바 있다. 실제로, 생체내 연구 결과, 보르데텔라종에 의한 쥐 호흡 감염 과정에서 CyaA는 상피 세포를 상당히 손상시키지 않으면서 특이적으로 백혈구(특히, 대식세포)를 파괴한다는 것을 확인하였다[Gueirard et al., 1998; Harvill et al., 1999].

<11> 특허 출원 WO 93/21324호에는 재조합 보르데텔라 아데닐시클라제를 사용하여 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 것이 제안되어 있다. 그러나, 보르데텔라 아데닐시클라제에 대한 특이적 수용체가 확인되지 않았기 때문에, 항원 제시가 비전문 항원 제시 세포에 의한 흡수와 그 후 수지상 세포에 의한 교차 항원 자극(cross-priming) 및 제시와 관련되는지 여부, 또는 항원이 전문 항원 제시 세포(pAPC)에 표적화되는지 여부는 알려지지 않았다.

<12> 그 표면 표현형과 일치하여, 수지상 세포(MHCI 및 II, 동시 자극성 분자 및 유착 분자 다량 발현)는 항원에 노출된 적이 없는(naive) T 세포의 항원 자극에 대한 다수의 시험관내 분석에서 가장 유효한 APC를 제공한다[Be11 et al., 1999; Viola et al., 1999]. 예를 들어, 항원에 노출된 적이 없는 휴지기 B 세포와 같은 다른 APC는 관용원성일 수 있다. 그 이유는, 휴지기의 음성 B 세포를 자성 숙주에게 주사하면 음성 특이적 CD8+ T 세포의 특이적 관용화가 초래되기 때문이다[Fuchs et al., 1992]. 시험관 내에서, 항원에 노출된 적이 없는 B 세포는 항원에 노출된 적이 없는 CD8+ T 세포를 Fas 의존 기전을 통해 제거할 수 있다[Bennett et al., 1998].

<13> 또한, 수지상 세포에 의한 Ag 제시는 생체 내에서 T 세포 반응 유도와 관련되어 있다. 이것은 MHCI-제한 Ag 제시에 대해 확립된 바 있다. 보강제 없이 Ag를 정맥내(iv) 경로로 주사하면 일반적으로 T 세포 항원 자극을 유도하지 않고[Kyburz et al., 1993; Aichele et al., 1994; Aichele et al., 1995], 비특이적 B 세포[Guery et al., 1997] [Zhong et al., 1997; Reis e Sousa et al., 1999], 및 결국 수지상 세포[Crowley et al., 1990] [Zhong et al., 1997; Reis e Sousa et al., 1999]에 의한 Ag 제시를 유도한다. 대조적으로, 보강제의 존재 하에 피하(sc) 면역화와 같은 국소 면역화 방법은 일반적으로, 피부로부터 LN으로 이동하여 면역화 부위로 들어가는 랑게르한스 세포에 의한 표적화된 Ag 제시 및 T 세포 항원 자극을 유도한다. 이 경우, B 세포와 대식 세포는 관여하지 않는다[Guery et al., 1996]. MHCI 및 MHCI-펩티드 복합체에 대한 sc 또는 피내(id) DNA 면역화 후에 유사한 결과가 관찰되었다. 수지상 세포를 국소 위치로 주사하여 직접 형질감염시킨 다음 들림프를 통해 구심성(afferent) LN으로 이동시킬 수 있다[Condon et al., 1996; Casares et al., 1997; Porgador et al., 1998]. 이러한 이동은 들림프구의 기계적 파괴로 피부 감화제 또는 피부 이식편에 대한 T 세포 반응이 제거되기 때문에 중요한 면역성 사건으로서 알려져 있다[Zinkernagel et al., 1997].

<14> 따라서, 수지상 세포에 표적화되기 위해서는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포 자극이 필수적이다. 대부분의 항체 반응은 CD4⁺ T 세포 도움에 의존하기 때문에, 항원을 수지상 세포로 표적화하는 것이 예방접종의 주요 목표이다.

<15> 본 출원인들은 T 세포에 의한 보르데텔라종의 아데닐시클라제의 제시에 대해 관심을 갖고 연구한 결과, CyaA와 상호작용하고 대상 분자를 위한 단백질성 벡터로서 CyaA를 사용하는 새로운 가능성을 제시한 특정 세포 상에 제공된 특이적 수용체 분자를 확인하였다.

<16> 유전적으로 해독된 박테리아 독소는 진핵 세포로 침입할 수 있는 능력이 있기 때문에, 특히 T 에피토프에 대한

백신 벡터 후보이다(Ladant et al., 1999). 그러나, 생체내에서 CTL 반응을 촉진하는 것으로 알려진 단백질성 벡터는 거의 없다(Ballard et al., 1996, Cabonette et al., 1999). 또한, 시험관 내에서 유망한 연구가 다수 행해졌음에도 불구하고, pAPC, 특히 수지상 세포, 더욱 특별하게는 골수 수지상 세포에 독점적으로 표적화되는 벡터는 확인된 바 없다.

- <17> 본 발명자들은, 다른 세포, 특히 호중구가 본 발명의 벡터에 의해 표적화됨을 추가로 확인하였다.
- <18> 본 발명은 적어도 부분적으로는 이러한 필요성을 만족시킬 수 있는 수단을 제공하며, 예를 들어 pAPC의 결정군에 분자를 특이적으로 표적화시켜 면역 반응을 자극할 수 있는 신규 벡터를 제안한다.
- <19> 또한, 특정 백혈구 및 pAPC를 표적으로 하는 분자를 이용하여 생물학적 활성 분자를 이들 세포의 인접 환경으로 전달하는 데 유용한 신규 벡터를 제조할 수 있다. 예를 들어, 이들 분자는 표적화된 세포의 기능적 성질을 조절할 수 있거나, 또는 면역 반응 또는 염증성 반응에 연루되어 있을 수 있다.
- <20> 실제로, 본 발명자들은 보르데텔라 퍼투스 아데닐시클라제 독소가 (CD11b/CD18) α_M/β_2 수용체로 지칭되는 세포 수용체와 특이적으로 결합하고, 이러한 상호 작용은 아데닐시클라제 도메인을 세포 시토플라زم으로 세포내 전달하여 세포를 사멸시키는 데 필요하다는 것을 확인하였다. α_M/β_2 (CD11b/CD18) 인테그린은 β_2 인테그린과의 이량체로서, 이들 인테그린의 발현은 백혈구에 제한된다. CD11b/CD18 α_M/β_2 는 마우스 및 인간에서 일정한 발현 패턴을 나타내는데, 이는 호중구/과립구, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포와 B 및 T CD8⁺ 림프구의 서브세트에 제한된다(Jeyaseelan et al., 2000, Arnaout et al., 1990).
- <21> 따라서, 이 수용체는 특히 T 에피토프 면역화를 위해 고안된 신규 벡터에 대한 이상적인 표적을 제공한다.
- <22> 출원인들은 본 발명에서 보르데텔라 아데닐시클라제를 사용하여 생체내에서 분자를 CD11b 발현 세포에 특이적으로 표적화할 수 있음을 확인하였다.
- <23> 특히, 본 발명에서 출원인들은 보르데텔라 퍼투스 아데닐시클라제 독소에 포함된 펩티드 항원이 효과적으로 수지상 세포의 표면에 특이적으로 표적화되고, 상기 수지상 세포의 시토플라زم으로 전위되어, CTL 반응을 촉진할 수 있다는 것을 밝혀냈다.
- <24> 특정 구체예에서, 상기 반응은 CD4⁺ T 세포 도움과 보강제 없이도 얻어진다.
- <25> 유전자 변형된 아데닐시클라제를 대상 펩티드에 화학적으로 커플링시켜 상기 펩티드를 CD11b 발현 세포, 특히 수지상 세포의 시토플라زم에 표적화할 수 있음이 확인되었다.
- <26> 따라서, 본 발명은 CD11b 발현 세포로 약물을 전달하기 위한 신규 벡터와 신규하고 효과적인 면역원성 조성물을 제공한다.

발명의 상세한 설명

- <27> 본 발명은 대상 분자를 CD11b 발현 세포에 특이적으로 표적화하는 단백질성 벡터의 제조에 사용되는 보르데텔라 아데닐시클라제의 용도에 관한 것이다.
- <28> 또한 본 발명은 대상 펩티드 또는 분자를 CD11b 발현 세포에 특이적으로 표적화하기 위한 조성물의 제조에 있어서, 아데닐시클라제가 항원과 조합되고 특히 대상 펩티드의 삽입에 의해서 또는 대상 분자의 삽입에 의해서 변형된 보르데텔라 아데닐시클라제의 용도에 관한 것이다.
- <29> 본 명세서에서 용어 "특이적으로"는 대상 분자에 대한 벡터로서 사용될 때 아데닐시클라제가 CD11b 발현 세포를 우선적으로 지향하여, 다른 세포에 대하여 선택적인 방식으로 상기 세포의 표면에 또는 상기 세포 내에 대상 분자를 표적화하는 수단을 제공하는 것을 의미한다.
- <30> 본 발명의 한 구체예에서, 대상 분자는 주로 CD11b 발현 세포를 지향한다.
- <31> 본 명세서에서 사용된 용어 "CD11b 발현 세포"는 그 표면에서 CD11b/CD18 α_M/β_2 수용체를 발현하는 세포를 말한다. 특히, 이들 세포는 과립구/호중구, 대식세포, NK 세포, T CD8⁺ 및 B 세포의 서브세트와 골수 수지상 세포이다.
- <32> CD11b 발현 세포, 더욱 구체적으로는 골수 수지상 세포, 호중구 및 대식 세포는 선천적인 면역 방어계의 필수

기능, 특히 염증성 반응 및 특이적 면역 반응과 연루되어 있기 때문에, 본 발명은 이들 CD11b 발현 세포, 구체적으로 골수 수지상 세포, 호중구 또는 대식세포로 대상 분자나 펩티드를 표적화할 수 있는 단백질성 벡터 또는 조성물의 제조에 관한 것이다.

- <33> 특히, 한 구체예에서, 상기 분자 또는 펩티드의 표적화는 생체내에서 효과적이다.
- <34> 따라서, 본 발명은 일부 백혈구와 특히 골수 수지상 세포, 호중구 또는 대식세포의 표적화가 필요한 동물이나 인간 숙주에게 투여하기 적절한 조성물 고안에 적합한 수단을 제공한다.
- <35> 보르데텔라 아데닐시클라제는 보르데텔라종에서 분비되는 칼모둘린 의존성 아데닐시클라제 또는 이의 단편으로서, 이 단편은 폐에서 박테리아 집락형성의 초기 단계에 필수적인 주요 독성 인자 아데닐시클라제의 기능 특성을 보유한다. 아데닐시클라제는 1706 아미노산의 폴리펩티드 형태로 합성 및 분비된다. 칼모둘린 의존성 촉매 활성은 처음 400개 아미노산에 위치한다. 활성이 되기 위해서는, *cyaC* 유전자 산물의 동시 발현에 의해 번역후 변형된 경우 상기 아데닐시클라제 독소는 침입성 용혈성이 되게 한다.
- <36> 하기에 제시한 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 구체적인 특징들은, 이 독소가 대상 분자를 CD11b 발현 세포로 생체내에서 표적화하기 위한 단백질성 벡터의 제조에 사용될 수 있음을 시사한다:
- <37> a) 아데닐시클라제는 특이적으로 CD11b 발현 세포에 결합한다.
- <38> b) N-말단 촉매 도메인은 CD11b 발현 세포의 시토졸 내로 전위된다.
- <39> c) C-말단 도메인은 CD11b 발현 세포의 막에 결합하고 세포내 유입 경로에 의해 내부 이행될 수 있다.
- <40> d) 유전자 변형된 아데닐라제에 화학적으로 커플링된 에피토프는 생체내에서 특이적 CTL 반응을 유발할 수 있다.
- <41> 본 발명에서 표현 "아데닐시클라제"는 유전자 변형 또는 화학 변형된 아데닐시클라제를 비롯하여 변형 아데닐시클라제 또는 천연 아데닐시클라제를 포함한다. 단, 생성된 산물이 대상 분자를 CD11b 발현 세포로 특이적으로 표적화할 수 있어야 한다.
- <42> 따라서, 본 발명은 상기 정의한 보르데텔라 아데닐시클라제의 용도, 더욱 구체적으로는 CD11b 발현 세포에 대상 분자를 특이적으로 표적화하는 변형되거나 재조합된 아데닐시클라제의 용도에 관한 것이다.
- <43> 더욱 구체적으로, 재조합 아데닐시클라제는 촉매 도메인 내에 삽입된 시스테인 잔기 또는 펩티드 서열을 갖는 아데닐시클라제, 또는 촉매 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 절두형 아데닐시클라제를 제공하도록 유전자 변형된 아데닐시클라제를 포함한다.
- <44> 보르데텔라 아데닐시클라제 독소와 CD11b/CD18 $\alpha\mu\beta_2$ 수용체 간의 특이적 상호작용 때문에, 대상 분자는 적어도 CD11b 발현 세포의 표면에 특이적으로 표적화된다. 본 발명의 특정 구체예에서, 보르데텔라 아데닐시클라제 독소는 CD11b 발현 세포의 시토졸에, CD11b 발현 세포의 표면에 또는 CD11b 발현 세포의 세포내 유입 경로 내에 대상 분자를 전달하는 단백질성 벡터의 제조에 사용된다.
- <45> 재조합 보르데텔라 아데닐시클라제 제조용 발현 벡터는 특히 출원 WO 93/21324(앵스퍼뮈 파스티르)에 개시되어 있다. 대상 펩티드의 화학적 커플링에 적절한 유전자 변형된 보르데텔라 아데닐시클라제의 제조를 위한 신규한 발현 벡터는 이하 실험 부분에도 설명되어 있다. 더욱 구체적으로, *cyaA* 유전자와 *cyaC* 유전자를 모두 발현하도록 한 발현 벡터를 작제할 수 있다(Sebo et al., 1991). 또한, 예를 들어 문헌[Meckman et al., 1985]에 개시된 바와 같이 E.콜리에서 세포독성 아데닐시클라제의 분비에 필요한 유전자(*hlyB* 및 *hlyD*)를 보유하는 2차 플라스미드를 작제할 수 있다. 특히, WO 93/21324호에 개시된 발현 플라스미드 pCACT3을 사용할 수 있다. 이 플라스미드를 사용하여, 아데닐시클라제를 E.콜리 내에서 발현시키고, 경우에 따라서는 이를 박테리아가 다량으로 분비하게 할 수 있다. 또한, 예를 들어, DEAE-세파로스 및 페닐-세파로스를 이용한 것과 같은 다른 공개된 절차 또는 CaM 친화 겔 수지에서 친화도 크로마토그래피를 이용하여 쉽게 정제할 수 있다(Guermonprez et al., 2000).
- <46> 본 발명의 일 구체예에서, 아데닐시클라제는 유전자 변형된 재조합 아데닐시클라제이다. 특히, 점 돌연변이, 결실 또는 삽입과 같은 돌연변이는, 일반적인 부위 지정 돌연변이 유발법이나 무작위 돌연변이 유발법을 사용하여 얻을 수 있다. 단, CD11b 발현 세포에 대한 결합, 또는 경우에 따라서는 시토졸에서의 전위에 필요한 도메인은 작용성이어야 한다. 재조합 독소와 이의 단편의 CD11b 발현 세포에 대한 특이적 결합과, 경우에 따라서 촉매 도

메인의 후속 전위를 평가하는 분석이 하기 실험 부분에 개시되어 있다.

- <47> 본 발명의 또 다른 구체예에서, 재조합 보르데텔라종의 아데닐시클라제는 천연, 변형 또는 재조합 보르데텔라종의 아데닐시클라제 독소의 단편으로서, 상기 단편은 CD11b 수용체에 결합할 수 있다. 특히, 잔기 373~1706(CyaA 373-1706)을 포함하는 단편은 CD11b/CD18 수용체와의 상호작용에 필수적으로 필요한 구조를 포함하는 것이 본 발명에서 밝혀졌다. 따라서, 보르데텔라종 아데닐시클라제 독소의 바람직한 단편은 N-말단 촉매 도메인의 전부 또는 일부가 결합된 보르데텔라 아데닐시클라제 독소이며, 더욱 구체적으로는 잔기 1~373의 전부 또는 일부가 결합된 보르데텔라 퍼투스스 아데닐시클라제이다.
- <48> CD11b에 대한 특이적 결합은 실시예에 예시된 바와 같이 항-CD11b 모노클론 항체를 이용하여 시험관 내에서 평가할 수 있다.
- <49> 단백질성 백터의 제조 또는 조성물 조제에 사용하기 위해서는, 아데닐시클라제는 비독성인 것이 바람직하다. 아데닐시클라제 독소의 비독성 변종은 당해 분야에 공지되어 있다((Betsou et al., 1993; Betsou et al., 1995).
- <50> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 아데닐시클라제는 보르데텔라 퍼투스스로부터 분리된다.
- <51> 특정 구체예들에서, 대상 분자는 펩티드, 글리코펩티드, 리포펩티드, 다당류, 올리고당류, 핵산, 지질 및 화학약품(chemicals)을 포함하는 군에서 선택된다.
- <52> 특정 구체예들에서, 대상 분자는 이중성 항원이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "이중성"은 백터 자체에 사용된 아데닐시클라제와 다른 항원을 말한다.
- <53> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 단백질성 백터의 제조는 이중성 분자, 특히 펩티드를 아데닐시클라제의 촉매 도메인 내의 허용 부위에 삽입하는 단계를 포함한다.
- <54> 본 명세서에서 사용된 용어 "허용 부위(permissive site)"는 이중성 분자와 특히 펩티드가 아데닐시클라제 독소의 소정 기능 특성에 실질적인 영향을 미치지 않고 삽입될 수 있는 부위를 말한다. 여기서 영향을 미치지 않는다는 것은 CD11b/CD18 수용체에 대한 특이적 결합에 필요한 도메인에 영향을 미치지 않고 유리하게는 촉매 도메인의 전위 과정에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 바람직한 구체예에서, CyaA 독소가 표적화된 세포내에서 cAMP의 합성을 촉진하는 능력은 이후에도 유지된다.
- <55> 허용 부위를 선택하는 방법은, 예컨대 WO 93/21324호 및 문헌[Ladant et al., 1992]에 제시되어 있다. 특히, 이중 선별(항생제에 대한 내성과 α-보충에 의한 접시 상에서의 열량 측정)을 이용한 방법으로 독소의 N-말단 촉매 도메인을 암호화하는 유전자 부분에서 (리딩 프레임이 보존된)올리고뉴클레오타이드 삽입체를 쉽게 확인할 수 있다. 돌연변이가 독소의 촉매 활성화에 미치는 기능적 영향은 유전적으로(E.콜리 *cya*⁻ 균주의 기능적 보충) 및 생화학적으로(변형된 아데닐시클라제의 안정성, 효소 활성, caM과의 상호 작용 특성) 쉽게 분석할 수 있다. 이 방법으로 다수의 돌연변이를 스크리닝하여 항원성 결정인자의 삽입에 유리할 가능성이 있는 부위를 확인할 수 있다.
- <56> 본 발명의 특정 구체예들에서, 허용 부위는 보르데텔라 퍼투스스 아데닐시클라제의 잔기 137-138, 잔기 224-225, 잔기 228-229, 잔기 235-236, 잔기 317-318 및 잔기 335-336로 구성된 군에서 선택된다.
- <57> 그러나, 예컨대 상기 제시한 방법을 이용하여 확인할 수 있는 다른 허용 부위, 특히 잔기 400-1700 부위를 본 발명에 사용할 수 있다.
- <58> 또한 단백질성 백터의 제조 방법은, N-말단 촉매 도메인의 전부 또는 일부가 결합된 보르데텔라 아데닐시클라제, 더욱 바람직하게는 잔기 1-373이 결합된 보르데텔라 퍼투스스 아데닐시클라제의 N-말단의 단부에 대상 분자, 예컨대 이중성 펩티드를 융합시키는 단계를 포함할 수 있다.
- <59> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 정의 중 어느 하나에 따른 아데닐시클라제를, CD8+ 세포독성 T 세포 반응(CTL 반응)을 촉진하도록 특별히 고안된 단백질성 백터의 제조 또는 조성물의 조제에 사용한다. 상기 반응은 대상 분자로 변형된(특히 재조합 또는 접합된) 아데닐시클라제의 CD11b 발현 세포로의 표적화가 일어나고, 이어서 상기 CD11b 발현 세포, 특히 골수 수지상 세포의 시토졸로 대상 분자가 전위되어 발생한다. 여기서, 대상 분자는 에피토프 또는 항원이거나, 또는 이를 포함하는 것이 바람직하다.
- <60> 본 명세서에서 사용한 용어 "에피토프"는 면역 반응을 유도할 수 있는 이중성 분자, 특히 이중성 펩티드를 의미한다.

- <61> 특정 구체예들에서, 항원은 세포내 박테리아 세포 항원, 종양 세포 항원, 바이러스 항원, 진균류 항원 또는 기생충 세포 항원으로 구성된 군에서 선택된다.
- <62> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 아데닐시클라제, 즉 상기 정의 중 어느 하나에 따른 천연, 변형 또는 재조합 아데닐시클라제는 CD4+ 세포 반응을 촉진하도록 특별히 고안된 단백질성 벡터의 제조 또는 조성물의 조제에 사용된다. 상기 반응은 대상 분자로 변형된(특히 재조합 또는 접합된) 아데닐시클라제의 CD11b 발현 세포로의 표적화가 일어나고, 이어서 상기 CD11b 발현 세포, 특히 골수 수지상 세포의 시토졸로 대상 분자가 전위되어 발생한다. 여기서, 대상 분자는 에피토프 또는 항원이거나, 또는 이를 포함하는 것이 바람직하다.
- <63> 대상 분자는 특히 폴리오바이러스 항원, HIV 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 맥락수막염 바이러스 에피토프, 종양 항원으로 구성된 군에서 선택된 항원일 수 있다.
- <64> CD11b 발현 세포의 기능적 특성은, 약물을 특정 세포로 표적화하기 위한 단백질성 벡터의 제조에서의 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 신규한 용도를 규정한다. 본 명세서에서, 본 발명의 특정 구체예에서는 대상 분자는 약물이다. 상기 약물은 화학적으로 또는 유전자적으로 아데닐시클라제에 커플링될 수 있다. 약물을 폴리펩티드에 커플링시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대 N-피리딜 설포닐-활성화된 설포히드릴을 사용한 이황화 결합을 포함한다.
- <65> 대상 분자는, 아데닐시클라제 독소에 커플링되는 경우 호중구와 같이 염증성 반응에 관여하는 세포의 표면으로 특이적으로 표적화되는 항염증성 약물인 것이 유리하다.
- <66> 특히, CD11b+ 항원 제시 세포, 특히 CD11B+ 항원 제시 세포의 시토졸로 생체내 표적화하기 위한 유전자 삽입 또는 화학적 결합에 의해 분자를 CyaA에 그래프트시킬 수 있다는 것이 실험 부분에서 처음 밝혀졌다. 실제로, 제공된 CD8+ T 세포 에피토프에 해당하는 분자를 해독된 CyaA의 촉매 도메인에, 이황화 결합이나 유전자 삽입에 의해 커플링시키면, 조작된 분자는 생체내에서 특이적 CTL 반응을 유발할 수 있는 것으로 확인되었으며, 따라서 이것은 상기 CD8+ T 세포 에피토프가 CD11b-발현 세포의 시토졸 내로 전위됨을 보여준다.
- <67> 더욱 구체적으로, 선택성 CD8+ 세포독성 세포 항원 자극에 대한 항원 제시는 주로 골수 수지 세포에 의해 형성된다.
- <68> 따라서, 특정 구체예에서, 단백질성 벡터의 제조에 사용되는 재조합 아데닐시클라제는, 상기 아데닐시클라제의 촉매 도메인 내에 위치한 유전자 삽입된 시스테인 잔기(들)에, 이황화 결합에 의해 화학적으로 커플링된 1 이상의 분자(들)를 포함하는 유전자 변형된 아데닐시클라제이다.
- <69> 실제로, 촉매 도메인 내의 상이한 허용 부위들에 위치한 다른 시스테인 잔기에 대한 이황화 결합으로 아데닐시클라제에 복수개의 분자를 화학적으로 커플링시킬 수 있다.
- <70> 또한, 출원인은 벡터화된 항원에 특이적인 CTL이, 특히 이중성 보강제를 제공하지 않고도 재조합 독소를 1회 정맥내 주사한 후에 생체내에서 촉진될 수 있다는 것을 확인하였다. 실험 부분에 제시된 결과와 특히 에피토프의 골수 수지상 세포로의 표적화는 보강제의 필요성과 CD4+ T 세포의 도움을 요하지 않는 새로운 면역화 방법을 제공할 수 있다.
- <71> 따라서, 본 발명은 생체 내에서 CD8+ T 세포 면역 반응을 가능하게 하는 정맥 투여용으로 제형화된 조성물의 제조에 사용되는 대상 분자, 특히 펩티드와 재조합된 보르데텔라 아데닐시클라제 독소의 용도에 관한 것이며, 상기 조성물에는 이중성 보강제가 없다. 또한, 본 발명은 이러한 조성물에 관한 것이다.
- <72> 특히, 본 발명은 동물 또는 인간 숙주에게 투여(특히, 정맥내 투여)하기 위해 제형화된 신규 면역원성 조성물에 관한 것으로서, 촉매 도메인 내에 삽입된 항원을 포함하는 재조합 보르데텔라 아데닐시클라제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <73> 또한, 본 발명은 대상 분자의 CD11b 발현 세포로의 특이적 표적화를 위해 제형화된, 인간 또는 동물에게 투여하기 위한 약학 조성물에 관한 것으로서, 상기 대상 분자는 보르데텔라종 아데닐시클라제에 커플링되어 있는 것을 특징으로 한다.
- <74> 바람직한 일 구체예에서, 대상 분자는 펩티드, 글리코펩티드, 리포펩티드, 다당류, 올리고당류, 핵산, 지질 및 화학약품으로 구성된 군에서 선택된다.
- <75> 또 다른 바람직한 구체예에서, 대상 분자는 항원이다.

- <76> 또 다른 특정 구체예에서, 약학 조성물 또는 면역원성 조성물은 대상 분자에 커플링된 재조합 보르데텔라종 아데닐시클라제를 포함하는 재조합 보르데텔라종 아데닐시클라제를 암호화하는 핵산 작제물을 포함한다.
- <77> 특정 구체예에서, 아데닐시클라제는 보르데텔라 퍼투스 독소에서 유래한 것이다.
- <78> 다른 특정 구체예에서, 아데닐시클라제 독소는 유전자 변형된 독소이다. 바람직한 구체예에서, 아데닐시클라제는 비독성 아데닐시클라제, 특히 해독된 아데닐시클라제이다.
- <79> 바람직한 구체예에서, 유전자 변형된 아데닐시클라제는 대상 분자를 CD11b 발현 세포의 시토졸내로 특이적으로 전위시킬 수 있다.
- <80> 특히, 상기 유전자 변형된 아데닐시클라제는 촉매 N-말단 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 보르데텔라 아데닐시클라제, 더욱 구체적으로는 잔기 1-373이 결여된 보르데텔라 퍼투스 아데닐시클라제이다.
- <81> 유전자 변형된 아데닐시클라제는 촉매 도메인 내에 삽입된 1 이상의 시스테인 잔기를 허용 부위에서 포함하는 것이 유리하다. 이러한 유전자 변형 아데닐시클라제는 삽입된 시스테인 잔기(들)에서 이황화 결합(들)에 의해 1 이상의 대상 분자에 커플링될 수 있다.
- <82> 바람직한 구체예들에서, 분자, 특히 항원은 보르데텔라 퍼투스 아데닐시클라제의 잔기 137-138, 잔기 224-225, 잔기 228-229, 잔기 235-236, 잔기 317-318 및 잔기 335-336으로 구성된 군에서 선택된 허용 부위 내에 삽입되거나, 또는 분자는 N-말단 촉매 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 보르데텔라 아데닐시클라제 N-말단부, 더욱 구체적으로는 잔기 1~373이 결여된 보르데텔라 퍼투스 아데닐시클라제의 N-말단부에 융합된다.
- <83> 특정 구체예에서, 분자는 항원이고, 이 항원은 세포내 박테리아 세포 항원, 종양 세포 항원, 바이러스 항원, 진균류 항원 또는 기생충 세포 항원이다.
- <84> 바람직한 구체예에서, 대상 분자는 폴리오바이러스 에피토프, HIV 바이러스 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 맥락수막염 바이러스 항원, 종양 항원으로 구성된 군에서 선택된 항원이다.
- <85> 또 다른 구체예에서, 유전자 변형된 독소는 세포 유입 경로로 또는 CD11b 발현 세포의 표면에 특이적으로 대상 분자를 전달할 수 있다.
- <86> 본 출원인들은, 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 면역원성 조성물을 보강제(들) 없이 동물 또는 인간 숙주에게 생체내에서 정맥내 투여하는 것은 상기 동물 또는 인간 숙주의 면역 반응을 효과적으로 촉진시키는 데 충분하다는 것을 확인하였다.
- <87> 특히, 본 발명의 면역원성 조성물은, 특히 수지상 세포와 관련된 생체내 또는 시험관내 면역 세포 반응을 유도 또는 자극할 수 있다.
- <88> 따라서, 특정 구체예에서, 면역원성 조성물 또는 약학 조성물에는 당업계에서 통상적으로 사용되는 촉진용 보강제(예, 수산화알루미늄)가 없는 것이 유리하다.
- <89> 특정 구체예에서, 대상 분자는 약물, 바람직하게는 항염증성 약물이다.
- <90> 또한, 본 발명은 백신 또는 면역요법 조성물의 제조에 대해 상기 정의한 바와 같은 면역원성 조성물을 동물 또는 인간 숙주에게 투여하기 위해 사용하는 용도에 관한 것이다.
- <91> 본 명세서에서 사용한 용어 "면역요법 조성물"은 면역학적 반응을 초래하고, 암, 바이러스 감염, 기생충 감염 또는 박테리아 감염의 치료와 같은 처치 치료에 관련된 조성물을 의미한다.
- <92> 또한, 본 발명은
- <93> a) 상기 정의한 면역원성 조성물을 제공하는 단계;
- <94> b) 상기 면역원성 조성물을 상기 숙주에게, 바람직하게는 정맥 경로로 투여하여 면역 반응을 촉진하는 단계를 포함하는, 인간 또는 동물 숙주를 면역화시키는 방법에 관한 것이다.
- <95> 마지막으로, 본 발명은 대상 분자의 CD11b 발현 세포로의 특이적 전달을 위한 단백질성 벡터에 관한 것으로서, 상기 벡터는 보르데텔라종 아데닐시클라제, 더욱 바람직하게는 상기 대상 분자에 커플링된 재조합 또는 변형 보르데텔라종 아데닐시클라제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <96> 단백질성 벡터는 특정 세포의 표면에 존재하는 CD11b/CD18 $\alpha\beta_2$ 와 보르데텔라 아데닐시클라제의 특이적 결합

을 통해 CD11b 발현 세포로 대상 분자를 표적화할 수 있다. 특정 구체예에서, 벡터는 대상 분자를 CD11b 발현 세포의 시토졸 내로 특이적으로 전달할 수 있다.

- <97> 특정 구체예에서, 단백질성 벡터는 수지상 세포, 특히 골수 수지상 세포, 또는 호중구로 대상 분자를 표적화시킬 수 있다.
- <98> 대상 분자는 아데닐시클라제, 더욱 바람직하게는 재조합 아데닐시클라제 독소에 화학적 또는 유전자적으로 커플링되어 있다. 분자를 폴리펩티드에 커플링시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예로서 본 발명자들은, 비오틴 유도체인 바이오틴 HDPD가 촉매 도메인 내에 유전자 삽입된 단일 시스테인 잔기 상에서 선택적으로 커플링될 수 있음을 확인하였다. 유사하게 시스테인을 함유하는 아데닐시클라제 독소, 또는 천연 시스테인 잔기는 없으나 유전자 삽입된 단일 시스테인 잔기를 포함하는 유전자 변형된 아데닐시클라제에 합성 펩티드를 커플링시킬 수 있다.
- <99> 또 다른 특정 구체예에서, 아데닐시클라제에 커플링된 대상 분자는 촉매 도메인 내의 허용 부위에서 유전자 삽입된 시스테인 잔기(들)는 포함하나 천연 시스테인 잔기는 없는 유전자 변형된 아데닐시클라제에 화학적으로 커플링된 에피토프이다.
- <100> 특정 구체예에서, 단백질성 벡터는 유전자 변형된 아데닐시클라제를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 아데닐시클라제는 보르데텔라 퍼투스스로부터 유래한 재조합 비독성 아데닐시클라제이다.
- <101> 더욱 구체적으로, 본 발명은 N-말단 촉매 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 재조합 보르데텔라 아데닐시클라제, 더욱 바람직하게는 잔기 1-373이 결여된 보르데텔라 퍼투스스의 아데닐시클라제로 구성된 단백질성 벡터에 관한 것이다.
- <102> 본 발명의 또 다른 바람직한 단백질성 벡터는 천연 시스테인 잔기가 없지만 촉매 도메인 내의 허용 부위에 유전자적으로 삽입된 시스테인 잔기(들)를 포함하는 유전자 변형된 보르데텔라 아데닐시클라제이다.
- <103> 본 발명의 특정 구체예에서, 전달하고자 하는 약물은, 아데닐시클라제 독소에 커플링시 염증성 반응에 연루된 호중구와 같은 세포의 시토졸 또는 표면에 표적화되는 항염증성 약물이다.
- <104> 다음 실시예는 본 발명의 범위를 제한하지 않고 본 발명을 예시할 것이다. 더욱 구체적으로, A 부분에는 아데닐시클라제 독소의 CD11b/CD18 수용체로의 특이적 결합, 특히 시험관 내에서 아데닐시클라제 독소의 CD11b 발현 세포로의 특이적 결합을 밝히는 실험 데이터가 제시되어 있다. B 부분에서, 실험 결과는 유전자적으로 커플링된 분자, 더욱 구체적으로는 항원을 CD11b 발현 세포의 시토졸, 특히 골수 수지상 세포에 생체내에서 또는 시험관 내에서 특이적으로 표적화하는 가능성을 보여준다. 또한, 이 결과는 표적화가 CD11b 수용체에 의해 매개되고, CTL 자극은 보강제의 부재 하에 전신 면역화 후에 관찰됨을 제시한다. C 부분에서는, CyaA 단편 상에서 이항화 결합에 의해 에피토프 펩티드의 특이적 커플링을 실시하여 신규한 단백질성 벡터를 제공하는 것을 보여준다. D 부분에서는, CyaA의 C-말단부만이 CD11b 수용체와 상호작용하는 데 필요하고 또한 이것만으로 충분함을 보여준다.
- <105> 마지막으로, 교차 항원 자극에 대해 발생한 것과 같은 여러가지 다른 CLT 반응과는 달리 CD4⁺ T 세포 보조는 CTL 반응의 촉진에 필수적이지 않음을 제시한다.

실시예

- <156> A. 보르데텔라 아데닐레이트 시클라제 독소는 $\alpha_M\beta_2$ 인테그린(CD11b/CD18)과 특이적으로 상호작용한다
- <157> A.1 재료 및 방법
- <158> A.1.1 재조합 독소 및 항체
- <159> CyaA 제조용 프로토콜은 다른 문헌에도 개시된 바 있다[Karimova, et al, 1998]. lacUV5 프로모터 하의 cyaA 구조 유전자 CyaA와 전독소의 활성화에 필요한 cyaC 보조 유전자를 포함하는 발현 플라스미드인 pACT3를 보유하는 E.콜리 BLR 균주에서 CyaA 독소를 생성하였다. 8M 우레아, Hepes-Na 20mM, pH 7.5에서 용해시킨 후에, 후속 DEAE-세파로스 및 페닐-세파로스에 의해 95% 이상의 균질성(SDS-겔 분석으로 판단함, 제시하지는 않음)으로 CyaA를 정제하였다. 유전자적으로 불활성화된 촉매 도메인 내에 삽입된 단일 시스테인을 포함하는 해독된 재조합 CyaA 독소인 CACTE5-Cys-Ova를, pACT-Ova-E5의 BsiwI과 KpnI 부위 사이에 적절한 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 삽입하여 작제하였다[Guermonprez et al, 2000]. 그 결과 생성된 단백질 CACTE5-Cys-Ova에서, CyaA의

잔기 224와 225 사이에 아미노산 서열 ASCGSIINFEKLGT를 삽입하였다. 전술한 바와 같이 재조합 독소를 발현 및 정제하였다. 제조자의 지시에 따라서 고도로 특이적인 설파히드릴 시약 N-(6-(비오틴아미도)헥실)-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(비오틴-HPDP, PIERCE)으로 단일 Cys 상에서 정제된 단백질을 표지화하였다. 비오틴닐화된 CyaA를 DEAE-세파로스에서 다시 정제하여 미반응 비오틴-HPDP 시약을 제거하였다. 분자 흡광 계수 $142 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (결합 연구) 또는 바이오라드 단백질 분석 시스템(cAMP 측정 및 세포 사멸 연구)을 사용하여 280 nm에서의 흡광도로 독소 농도를 분광학적으로 측정하였다.

<160> 쥐 CD11a(2D7, 래트 IgG2a, κ), 쥐 및 인간 CD11b(M1/70, 래트 IgG2b, κ), 쥐 CD11c(HL3, 햄스터 1, 람다), 쥐 CD18(C71/16, 래트 IgG2a, 카파), 대조군(A95-1, 또는 항-CD16/32, 2.4G2, 래트 IgG2b, κ)에 대해 특이적인 정제된 mAb는 파밍엔(미국 샌디에고)으로부터 입수하였다. 항-인간 CD11b(44, 마우스 IgG2a, κ), 및 항-인간 CD18(TS/18, 마우스 IgG1, κ) 하이브리도마 유래의 상청액을 기증받아 차단 실험에서 1/2 희석하여 사용하였다. 항-쥐 CD11b(5C6, 래트 IgG2b, κ)에서 얻은 상청액은 G. Milon(프랑스 파리의 파스티르 앵스띠뛰)으로부터 기증받아 결합 억제 분석에서 1/2 최종 희석액으로 사용하였다. 항-CyaA 폴리클론 항체는 정제된 CyaA로 피하 면역화된 토끼로부터 얻었다. 황산암모늄(33%)을 이용하여 면역 혈청으로부터 혈청을 침전시켰다. 원심 분리 후에, 펠렛형 단백질을 20 mM Hepes-Na, 150 mM NaCl, pH 7.5(완충액 C)에 재현탁시키고, 동일한 완충액에 대하여 대규모로 투석하였다. 이어서, 비오틴-아미도카프로에이트 N-히드록시숙신이미드 에스테르(SIGMA, 디메틸 설폭시드 내에 용해됨)와 실온에서 130분 동안 항온배양하여 항체를 비오틴닐화시켰다. 그 다음, 100 mM 에탄올아민, pH 9.0을 첨가하고, 30분 더 항온배양한 후에, 혼합물을 4°C에서 완충액 C에 대해서 대규모로 투석하였다. 비오틴닐화된 항체를 -20°C에서 보관하였다.

<161> A.1.2 세포 및 배양 배지

<162> EL4, J774A.1, LB27.4, THP-1을 미국 모식균 배양 수집소(ATCC)로부터 입수하여 10% 태아 송아지 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640에서 5×10^{-5} M 2-머캅토에탄올(완전 배지)의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. FSDC[Girolomoni et al, 1995]를 완전 배지에서 배양하였다. 인간 CD11b/CD18 또는 CD11c/CD18에 대해 형질감염시킨 CHO 세포 또는 벡터만으로 형질감염시킨 CHO 세포를 D. Golenbock(미국 보스턴)으로부터 입수하여, 전술한 바와 같이 네오마이신의 존재 하에 배양하였다[Ingalls et al, 1998]. 인간 호중구를 전술한 바와 같이 정제하였다[Rieu et al, 1992].

<163> A.1.3 CyaA 결합 분석

<164> 모든 결합 분석은 96 웰 배양판(코스타)에서 혈청 없이 DMEM 4.5 mg/ml 글루코스(라이프 테크놀로지스)에서 실시하였다. 2×10^5 세포/웰을 200 μl 최종 부피로 20분 동안 (실험에 따라서 4°C 또는 37°C에서) 항온배양하였다. 일부 실험에서, 100 μl 의 최종 부피로 차단 mAb의 존재 하에 세포를 20분 동안 4°C에서 사전배양하였다. 4°C에서 200 μl 총 부피의 mAb의 연속 존재 하에 독소 용액을 웰에 가하였다. 그 다음, 판을 5분간 1500 rpm에서 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 비오틴닐화된 항-CyaA 토끼 폴리클론 항체(DMEM에서 1/400, 50 μl /웰)와 함께 포화제(1/50)로서 대조군(비-면역 또는 사전 면역) 토끼 혈청의 존재 하에 세포를 25분 동안 4°C에서 항온배양하였다.

<165> 원심분리 및 상청액 제거 후에, 1/300 희석액(50 μl /웰)에서 스트렙타비딘-피코에리트린(PE)(파밍엔)으로 세포를 염색하였다. 세척 후에, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 프로피듐 요오드화물의 존재 하에 FACStar(벡톤-디킨슨, 미국 마운틴 뷰 소재)에서 유세포 분석으로 세포를 분석하였다. 게이팅을 실시하여 세포 응집물을 배제하고, 프로피듐 요오드화물 배제로 사세포를 제거하였다. 실험 점은 프리즘 소프트웨어를 사용한 쌍곡선 모델 $\Delta\text{MFI} = B_{\text{max}} * [\text{CyaA}] / (K_d + [\text{CyaA}])$ 에 대입하였다. 여기서 B_{max} 는 최대 결합율(%)이다.

<166> A.1.4 cAMP 분석

<167> cAMP 측정은 항원 경쟁 면역분석으로 측정하였으며[Karimova et al, 1998], 이 분석에서 배양 배지는 혈청은 함유하지 않지만 4.5 mg/ml 글루코스와 20 U/ml 헥소키나제를 함유하는 DMEM 배지로 구성된다. 글루코스의 ATP-의 존성 인산화를 촉매하는 헥소키나제를 첨가하고 미량의 ATP를 위한 세포의 배지를 고갈시켜 cAMP의 세포의 합성을 방지하였다. 따라서, 측정된 cAMP의 양은 엄격하게 세포내 cAMP의 측적을 나타내는 것이다. 5×10^5 세포를 4°C에서 1시간 동안 특이적 mAb 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 존재 또는 부재 하에 100 μl /웰의 96웰 평판에서 사전배양한 후, 0.05, 0.5 또는 5 g/ml CyaA와 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 특이적 mAb(사전 배양 과정에서 제공된 경우)와 함께 37°C에서 20분간

항온배양하였다. CyaA의 용량 반응 효과를 위해서, 37℃에서 20분간 세포를 독소와 함께 직접 항온배양하였다. 증독 후에, 세포를 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 100 μ l HCl 0.1N으로 샘플을 세포용해시키고, 120℃에서 5분간 끓인 다음, 100 μ l의 트리스 0.125 M, NaCl 0.2 M로 중화시켰다. Na₂CO₃ 0.1M pH 9.5에서 1/4,000으로 희석한 cAMP-BSA 접합체로 미량역가관을 코팅하였다. 이를 PBS-트윈 0.1%로 2회 세척하고, PBS-BSA 2% 중에서 1시간 포화시킨 후, PBS-트윈 0.1%로 5회 세척하였다. 샘플과 cAMP 표준물(시그마)을 cAMP-BSA 접합체로 코팅된 관에 직접 가하고, HCl 0.1 N과 트리스 0.125 M-NaCl 0.2 M의 1/1 혼합물로 연속 희석하였다. 항-cAMP 토끼 항체를 PBS-BSA 2% 중에 1/2,500으로 첨가하고, 37℃에서 3시간 동안 항온배양하였다. PBS-트윈 0.1%로 평판을 5회 세척하였다. 호스래디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 항-토끼 항체(아머샴)를 PBS-BSA 2% 중에 1/2,500으로 첨가하고, 1 시간 동안 37℃에서 항온배양한 후, 전형적인 퍼옥시다제 반응을 이용하여 확인하였다. 표준 곡선의 실험점을, 프리즘 소프트웨어를 사용하여 S자형 모델에 대입하였다.

<168> **A.1.5 독성 분석**

<169> 진술한 바와 같이 세포 사멸을 평가하였다[Khelef et al, 1993 ; Khelef et al, 1995]. 간단히 요약하면, 10⁵ 세포를 96웰 평판에서 완전 배지 중에서 24시간 동안 항온배양하고, 무혈청 배지로 1회 세척하였다. 모든 세포 배양을 무혈청 배지에서 추가로 실시하였다. 37℃에서 4시간 동안 CHO 세포에 각종 농도의 CyaA를 직접 가하여 용량 반응 효과를 평가하였다. 세포독성 억제제를 위해서, 10 μ g/ml 특이적 mAb의 존재 또는 부재 하에 1 시간 동안 4℃에서 세포를 사전 배양한 다음, J774A.1A.1 세포의 경우 2시간 동안 0.5 μ g/ml CyaA, 또는 CHO 세포의 경우 4 시간 동안 5 μ g/ml, 및 10 μ g/ml의 특이적 mAb(사전 배양 과정에서 제공된 경우)와 함께 37℃에서 항온배양하였다. 세포를 염색하여 배지에서 방출된 락테이트 데히드로게나제(LDH)의 양을 정량하는 Cytotox 96TM 분석(프로메가)을 이용하여 세포 용해를 평가하였다.

<170> **A.2 결과**

<171> **A.2.1 CyaA의 포화성 결합은 표적 세포의 표면에서 CD11b의 존재와 상관관계가 있다**

<172> 백혈구군에 대한 CyaA 세포 특이성을 특성규명하기 위해서, 본 발명자들은 β_2 인테그린의 각종 조합을 발현하는 3가지 대표적인 쥐 세포주, 즉 종양 대식세포인 J774A.1, T 세포 하이브리도마인 EL4 및 B 세포 하이브리도마인 LB27.4를 선택하였다. 37℃에서 20분 동안 CyaA와 함께 항온배양한 후에, 이들 세포의 세포 표면에 대한 CyaA 결합을 비오틴닐화된 항-CyaA 항체 및 스트렙타비딘-PE를 사용하여 유세포 분석으로 모니터링하였다. 본 발명자들은, 이들 조건 하에서 J774A.1 세포주에 대한 CyaA의 효과적인 용량 의존성 포화 결합을 관찰하였다. 겔보기 K_d가 각각 9.2 $\pm$ 4.5 nM 및 3.2 $\pm$ 1.9 nM이기 때문에 J774A.1 세포에 대한 CyaA 친화도는 높았다. EL4 및 LB27.4 세포에 대한 낮은 결합이 관찰되었지만, 시험된 농도에서 포화성이 아니었다.

<173> CyaA의 J774 세포주에의 결합이 β_2 인테그린과의 구성원 중 하나의 발현과 상관관계가 있는지를 결정하기 위해서, 본 발명자들은 특성규명된 β_2 인테그린의 3개의 α 쇄(CD11a, CD11b 및 CD11c)와 공통 β 쇄(CD18)에 특이적인 모노클론 항체(mAb)를 사용하여 유세포분석으로 이들 세포의 표현형 분석을 실시하였다(도 1b, c, d, e). J774A.1 세포는 대개 CD11b 및 CD18를 발현하였으나, CD11a에 대해서는 양성이었다. EL4 세포 및 LB27.4 세포는 대개 CD11a 및 CD18를 발현하였다. 이들 데이터로부터 J774A.1에 대한 CyaA의 효과적인 포화성 결합은 인테그린 CD11b/CD18의 존재와 상관관계가 있었음이 확인된다.

<174> **A.2.2 CyaA 포화성 결합은 항-CD11b mAb에 의해 특이적으로 차단된다**

<175> 본 발명자들은 CD11b/CD18이 인테그린을 발현하는 세포에 대한 CyaA의 결합에 직접 관련되는지를 조사하였다. 본 발명자들은 고정 농도 또는 각종 농도의 CyaA에서 mAb의 부재 하에 평균 형광값의 비율(%)을 계산하여 항-CD11b M1/70 mAb로 얻은 억제 정량 분석을 실시하였다(도 2). M1/70 항-CD11b mAb로 얻은 CyaA 결합 억제는 시험된 모든 CyaA 농도에서 거의 완전하였다(도 2a, b). 이러한 억제는, 항-CD11a, CD11c, CD18 또는 대조군 mAb가 CyaA 결합을 억제하지 않기 때문에 특이적이었다. 제2의 항-CD11b mAb(클론 5c6)도 CyaA의 결합을 억제하였다(도 2c, d). CD11b를 발현하는 미성숙 수지상 세포주 FSDC 및 J774A.1 대식세포주를 사용하여 유사한 결과를 얻었다(도 2b, d).

<176> CyaA가 인간 CD11b과 유사하게 상호작용하는지 여부를 조사하기 위해서, CD11b를 다량 발현하는 것으로 잘 알려져 있는 인간 호중구에서 CyaA 결합 연구를 실시하였다. 항-CyaA 토끼 항체와 함께 인간 골수 세포를 항온배양한 후에 높은 배경 형광을 얻었기 때문에(도시되지 않음), 본 발명자들은 다른 결합 분석을 설정하였다. CyaA의

해독된 형태를, 촉매 도메인 내에 유전자적으로 도입된 단일 시스템인 잔기 상에서 특이적으로 비오틴화하였다. 이 시스템을 사용하여 호중구에 대한 CyaA 결합을 검출할 수 있었다(도 3). 44 또는 M1/70 항-CD11b mAbs와 호중구의 사전 배양 결과 각각 CyaA의 결합을 완전히 또는 부분적으로 억제하였다(도 3a 및 b). 쥐 세포에 대한 CyaA 결합을 차단하지 않는 항-쥐 CD18 mAb인 C71/16과는 달리, 인간 항-CD18 TS/18 mAb와 함께 사전배양하면 인간 호중구에 대한 CyaA 결합이 완전히 억제된다(도 3b). 인간 단핵구 THP-1 세포주를 사용하여 유사한 결과를 얻었다(데이터는 도시되지 않음).

<177> 결론적으로, 새로 정제된 인간 호중구와 쥐 및 인간 기원의 3종의 골수 세포주(J774A.1, FSDC, THP-1)의 표면에 대한 CyaA 결합은 주로 CD11b/CD18 인테그린을 통해 매개되는 것으로 나타난다.

<178> A.2.3 CyaA-매개된 cAMP 증가 및 독성은 항-CD11b mAb에 의해 특이적으로 차단된다

<179> CD11b/CD18-의존성 CyaA 결합의 생리학적 관련성을 평가하기 위해서, 본 발명자들은 CyaA의 세포독성에 대한 mAb의 차단 효과를 연구하였다. 본 발명자들은 먼저 각종 mAb의 존재 하에 CyaA에 노출된 J774A.1 세포에서 생성된 cAMP의 양을 측정하였다. 도 4a에 도시된 바와 같이, 세포를 M1/70 항-CD11b mAb와 함께 사전 배양한 경우 CyaA에 의해 유도되는 세포내 cAMP 함량 증가가 전적으로 제거되었다. CyaA 세포 결합을 차단하지 않는 C17/16 항-쥐 CD18 mAb(도 2)는 CyaA 처리 세포의 세포내 cAMP 함량에 대한 효과가 없었다. 따라서, 이들 데이터는 CyaA에 의해 유도되는 세포내 cAMP 증가가 CD11b와 독소의 상호작용에 좌우된다는 것을 강력히 시사한다. CyaA의 독성을 위해 이 분자가 필요하다는 것을 추가로 분석하기 위해서, CyaA 매개된 세포 사멸에 대한 β_2 인테그린과의 다른 사멸에 특이적인 mAb의 효과를 평가하였다. 도 4b는 항-CD11b mAb J774A.1이 CyaA에 의해 유도되는 세포 사멸을 급격하게 감소시킨다는 것을 보여준다(88% 억제). 세포에 대한 독소 결합을 차단하지 않는 mAb(항-CD11a, CD11c 또는 CD18 또는 대조군 mAb)와 J774A.1를 사전배양하면 CyaA에 의해 유도되는 세포 사멸은 영향을 받지 않았다.

<180> 이들 데이터로부터, CD11b를 통한 CyaA 결합은 J774A.1 세포에서 CyaA 매개된 독성에 꼭 필요하다는 것을 알 수 있다.

<181> A.2.4 CD11b/CD18로 CHO를 형질감염시키면 CyaA에 대한 감수성이 부여된다

<182> CyaA 결합에서 CD11b의 역할을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 인간 인테그린 CD11b/CD18 또는 CD11c/CD18로 형질감염되거나, 또는 (백터만으로) 모조 감염된 CHO 세포를 사용하였다. 도 5a에 도시된 바와 같이, 37°C에서 CyaA를 이들 세포주에 결합시킬 수 있다. 그러나, CyaA 결합은 CD11b/CD18을 발현한 세포에서는 효과적이고 포화형이지만, CD11b/CD18로 형질감염되거나 모조 형질감염된 세포에서는 그렇지 않다. CD11b/CD18 형질감염 세포에 대한 CyaA의 친화도는 $nM(K_d = 0.7 \pm 0.09 \text{ nM})$ 단위로 제시하였다. 4°C에서, CyaA 결합 효율은 37°C에서의 결합과 비교하여 감소하였다(도 5b). 이 온도에서, CD11b/CD18 형질감염된 세포와 2가지 다른 세포주 사이의 차이는 더욱 명확해진다.

<183> 본 발명자들은 J774A.1에서 CyaA가 매개하는 독성에 CD11b가 필요하다는 것을 발견하였기 때문에, 그 다음에는 CD11b 발현이 CHO 형질감염 세포에 CyaA-감성 표현형을 부여하는 데 충분한지 여부를 결정하였다. 이전 보고 내용[Gordon et al, 1988]에 따르면, CyaA는 CD11c/CD18로 형질감염된 CHO 세포 또는 대조군 모조 형질감염 세포에서 상당량의 세포내 cAMP를 유도하지만, 독소가 고 농도로 존재할 때만 그러하다($5 \mu\text{g/ml}$, 도 5c). 대조적으로, CyaA는 연구된 최저 농도($0.05 \mu\text{g/ml}$)에서도 CD11b/CD18 형질감염된 CHO 세포에서 세포내 cAMP 레벨을 증가시켰다. 또한, $5 \mu\text{g/ml}$ CyaA에 반응하는 cAMP 생성은 CD11c/CD18 형질감염 또는 모조 형질감염 세포와 비교하여 CD11b/CD18 형질감염된 세포에서 4~5배 상승하였다.

<184> 본 발명자들은 CyaA 매개된 세포 사멸에서 CD11b/CD18의 역할을 평가하였다. 도 5d에 도시된 바와 같이, CD11b/CD18로 형질감염된 CHO의 50% 이상은, CyaA $5 \mu\text{g/ml}$ 와 함께 항온배양한 지 4시간 후에 사멸된 반면, CD11c/CD18 형질감염되거나 또는 모조 형질감염된 세포에서는 이러한 처리에 영향을 받지 않았다.

<185> 따라서, 이들 결과는 인간 CD11b/CD18 인테그린의 발현이 CHO 세포에서 CyaA에 대한 고 친화도 수용체를 생성하는 데 충분하다는 것을 명백히 입증한다.

<186> A.3 토의: CyaA에 대한 수용체

<187> CyaA는, 다른 독소와는 달리 오랫동안 모든 수용체 결합과 무관한 것으로 알려져 왔다. 이것은 i) CyaA는 여러 기원의 각종 모델 세포주를 시험관 내에서 중독시킬 수 있고[Ladant et al, 1999], ii) CyaA는 비포화성 방식으로 주르카트 세포 및 양 적혈구에 결합한다[Gray, et al 1999]는 관찰 결과에 기초한 것이다. 사실, 이들 관찰

결과는, CyaA의 지질막으로의 비특이적 흡착이 촉매 도메인의 시토크소 내로의 약간의 전위를 초래할 수 있음을 입증한다. 그러나, 이들은 특이적 수용체의 존재를 배제하지 않았다. 본 발명자들은 CyaA의 결합 및 독성 특성이 인테그린 CD11b/CD18과의 상호작용에 의존하는 것임을 골수 세포주에서의 연구에서 확인하였다. 효과적인 포화성 결합은 CD11b의 발현과 상관관계가 있고, 항-CD11b mAb에 의해 완전히 특이적으로 차단된다. 또한, CHO 세포에서의 CD11b/CD18의 발현은 CyaA의 결합을 급격히 증가시켜, 이 독소에 의해 생기는 중독에 대한 감성 증가를 초래한다. 본 발명자들의 연구 결과는 백혈구에서 특이적으로 발현되는 세포 표면 분자와 CyaA의 상호작용을 지지하는 제1 증거이다. 항-CD11b mAb에 의해 CyaA 결합이 거의 완전한 차단된다는 것은, CD11b가 시험한 세포주에서 CyaA에 대한 주요 수용체임을 제시하는 것이다. CD11c/CD18 형질감염체, 또는 EL4 또는 LB27.4와 같은 CD11a/CD18 발현 세포에 효과적으로 결합하지 않는 것은, CD11b/CD18이 표적 세포에 대한 CyaA의 결합에 관여하는 $\beta 2$ 과의 유일한 인테그린임을 시사한다.

<188> 전술한 연구에 따라, 본 발명자들은 시험한 모든 세포주에 대한 CyaA의 결합이 검출가능하다는 것을 관찰하였다. 또한, 고농도의 CyaA는, 세포 사멸과 관련이 없는 모조 형질감염된 CHO 세포에서 작지만 검출가능한 cAMP 증가를 유발한다. 따라서, CyaA는 고농도에서 각종 세포주에 결합하여 전위시킬 수 있지만, 효과적인 포화성 결합, 전위 및 사멸은 CD11b 발현 세포의 특성이다.

<189> $\beta 2$ 인테그린과의 구성원에 대한 CyaA의 결합은 이들 분자와 상호작용하는 것으로 최근 밝혀진 다른 RTX 독소의 작용을 상기시킨다[Lally et al., 1997; Li et al., 1999; Ambagala et al., 1999; Jeyaseelan et al., 2000]. CyaA와 강한 상동성을 공유하는 E. 콜리 HlyA는 혈장막에서 양이온 세공을 형성한다. HlyA는 저 농도에서만 백혈구에 대한 특이성을 나타낸다[Welch et al., 1991]. 이러한 상대적인 특이성은 인테그린 CD11a/CD18과의 상호작용에 의해서 매개되는 것으로 밝혀졌다[Lally et al., 1997]. 유사하게, 에이. 액티노마이세테스(A. actinomycetemcomitans) 및 피.해몰리티카(P. haemolytica) 류코톡신(각각 LtxA 및 LktA)은 인간 및 소 백혈구에 대해 특이적이고 다소 차별적인 RTX 독소로서, CD11a/CD18와 상호작용한다[Lally et al., 1997; Li et al., 1999; Ambagala et al., 1999; Jeyaseelan et al., 2000]. HlyA와의 강한 상동성에도 불구하고, CyaA는 세포 분포가 상이한 또 다른 $\beta 2$ 인테그린(CD11b/CD18)을 인식한다. 실제로, CD11b는 대체로 대식 세포, 호중구 및 수지상 세포에서 발현되지만, 대부분의 T 및 B 세포에서는 발현되지 않는다. 반면에 CD11a는 T 및 B 림프구를 비롯한 모든 백혈구에서 발현된다.

<190> CD11b 발현 세포에 대한 CyaA의 특이적 표적화란, 본 발명에서 세포의 특정 서브세트를 특이적으로 표적화하는 것으로 설명된다. 여전히 침입성인 해독된 CyaA 변종은, 다른 세포 종류에는 현저한 영향을 미치지 않으면서 약리학적 활성 분자의 CD11b 양성 세포로의 전달에 사용할 수 있다.

<191> **B. 골수 수지상 세포의 시토크소의 표적화된 항원 전달 및 선택적인 CTL 자극**

<192> **B.1 재료 및 방법**

<193> **B.1.1 재조합 아데닐레이트 시클라제 독소 및 펩티드**

<194> NEOSYSTEM에서 유래한 pOVA 합성 펩티드(SIINFEKL)를 1 mg/ml로 PBS 중에 희석하였다.

<195> **B.1.2 세포독성 T 세포의 검출을 위한 면역화 및 분석**

<196> 6~8 주령의 Iffa Credo(프랑스 라르브레슬르)로부터 얻은 암컷 C57BL/6(H-2^b)를 사용하였다. TAP1 -/-(Van Kaer et al., 1992), CD4-/-(Killeen et al., 1993), CD40-/-(Kawabe et al., 1994) 및 B 세포 결핍 μ MT(Kitamura et al., 1991)를 CDTA 시설(CNRS, 프랑스 오를레앙)로부터 얻은 C57BL/6 배경에서 사육하고 앵스퍼뛰 파스티르 시설에서 사육하였다. 동물을 PBS 중의 Ag로 정맥내 면역화하였다. 주사 7일 후, 동물을 희생시키고 비장을 제거하였다. 비장세포(2.5×10^7 세포)의 단세포 현탁액을 1 μ g/ml의 pOVA의 존재 하에 5일 동안 조사된 비장 세포(2.5×10^7 세포)로 10 ml CM(하기 참조)에서 재자극하였다. 정확히 전술한 바 대로 세포독성 분석을 실시하였다(Fayolle, et al., 1999).

<197> **B.1.3 세포주**

<198> H-2K^b 하에서 OVA 257-264 펩티드(SIINFEKL)에 특이적인 CD8+ T 세포 하이브리도마인 B3Z(Karttunen et al., 1992)를 Dr N. Shastri(미국 버클리 소재의 캘리포니아 유니버시티)로부터 얻었다.

<199> **B.1.4 항원 제시 분석**

- <200> 모든 항원 제시 분석은, 96 웰 배양 마이크로평판(0.2 ml의 최종 부피)에서 10 % 태아 송아지 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민 및 5×10^{-5} M 2-머캅토에탄올이 보충된 RPMI 1640(완전 배지, CM) 중에 B3Z와 APC의 동시 배양으로 실시하였다. B3Z 세포(10^5 세포/웰)의 자극은 APC의 존재 하에 18~24 시간 동안 배양한 상청액 중에서의 IL-2 방출로 모니터하였다. IL-2는 CTLL 분석에서 전술한 바와 같이 측정하였다(Guermonprez et al., 1999). 일부 실험(도면 설명 참조)에서, B3Z 자극은 NF-AT lacZ 리포터 분석을 이용하여 평가하였다. 세포 용해물에서의 LacZ 활성은 전술한 바와 같이 CPRG 기질로 평가하였다(Karttunen et al., 1992). 2가지 항원 제시 분석을 실시하였다: i) 시험관내 분석; 항원에 노출된 적이 없는 마우스 유래의 APC를 각종 농도의 Ag의 존재 하에 B3Z와 동시배양하였다(10^5 /웰). 일부 실험에서, 10 µg/ml의 mAb의 존재 또는 부재 하에 APC를 4°C에서 40분간 사전배양한 다음, 일련의 mAb의 존재 하에 100 µl의 최종 부피로 Ag를 세포에 가하였다. 4 시간 펄스 후에, APC를 2회 세척하고 B3Z와 동시배양하였다. 사용된 정제 mAb는 CD11b(M1/70 래트 IgG2b, κ) 또는 이소타입이 부합하는 대조군에 대한 것이며 파밍엔(미국 샌디에고)에서 얻었다. ii) 생체의 분석: APC는 각종 Ag로 미리 정맥내 면역화시킨 마우스로부터 얻었고, 웰당 APC의 수를 다양하게 하여 0.2 ml의 최종 부피로 B3Z와 함께 배양하였다.
- <201> **B.1.5 항원 제시 세포 및 분류**
- <202> 전체 비장 세포(TSC), 저밀도(LDF) 및 고밀도(HDF) 분획을 Vremec 등의 문헌(Vremec et al., 1992)에 의해 변형된 Steinman 프로토콜에 따라 제조하였다. 간단히 요약하면, 37°C에서 40분 동안 콜라게나제로 비장을 분해한 다음, 일련의 EDTA 5 mM의 존재 하에 분리(dilacerated), 제조하였다. 세포를 진한 BSA 용액에서 원심분리하였다. 상청액과 펠렛 세포를 별도로 수거하고 저밀도 분획 및 고밀도 분획이라 명명하였다. 5% 태아 송아지 혈청과 2 mM EDTA(PBS-FACS)가 보충된 PBS 중에서 피코에리트린(PE), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)에 커플링되거나 비오틴화된 햄스터 HL3 mAb로 4°C에서 CD11c 염색을 실시한 다음, 스트렙타비딘-PE로 확인하였다. CD8 α 염색은 PE에 커플링된 53-6.7 mAb로 실시하였다. CD11b 염색은 PE 또는 FITC에 커플링된 M1/70 mAb로 실시하였다. CD54R 염색은 PE에 커플링되거나 비오틴화된 B220 mAb로 실시하고, 스트렙타비딘-PE로 확인하였다. 모든 mAb는 파밍엔으로부터 얻었다. 2회 세척 후에, FACStar(미국 마운틴 뷰 소재의 벡톤 디킨슨)를 사용하여 세포를 분류하였다. 세포를 CM에서 무균적으로 회수하였다. FACScan 장치(미국 마운틴 뷰 소재의 벡톤 디킨슨)에서 분석된 분류 세포의 분획에서 분류 세포의 순도를 검사하였다. 분류된 세포의 순도는 통상 80~98%였다. 다른 실험에서(도면 설명에서 언급된 바와 같음), 공급자의 프로토콜(MACS, MiltenyiBiotec, 독일 베르기쉬 갈트바흐 소재)에 따라서 자기 세포 분류 기법과 CD11c 마이크로 비드를 사용하여 비장 콜라게나제 분해물로부터 CD11c+ 세포를 직접 분류하였다. 분류된 세포 순도 범위는 이 기법을 사용한 경우 80% 정도였다.
- <203> **B.2 결과**
- <204> **B.2.1 보강제의 부재 하에 CyaAOVA로 전신 면역화한 후 CD4- 및 CD40- 독립적 CTL 자극**
- <205> 닭의 난알부민, H-2K^b 제한된 SIINFEKL 에피토프를 실험 모델 에피토프로서 사용하였다. 해독되었지만 여전히 침입성인 변종 CyaA의 촉매 도메인에 이 에피토프를 유전적으로 삽입하였다. C57BL/6(H-2^b) 마우스를 50 µg의 제조합 독소 또는 대조군 염수 용액으로 1회 정맥내 면역화하였다. 면역화 7일 후에, pOVA에 특이적인 CTL 활성은 CyaAOVA 면역화된 C57BL/6 마우스의 비장세포 내에서 검출되었지만, 염수나 대조군 CyaA를 주사한 마우스에서는 검출되지 않았다(도 6a). CD4 또는 CD40 결핍 마우스를 이용하여 유사한 결과를 얻었다. 이는 여러가지 다른 CTL 반응(교차 항원 자극 Ag에 대해 발생한 것(Bennett et al, 1997; 1998; Schoenberger et al., 1998, Ridge et al., 1998))과 달리, CyaAOVA에 의한 CTL 반응의 초회항원자극에는 CD4⁺ T 세포 도움이 필수적이지 아니었음을 제시한다(도 6b, c). 또한, CTL 반응은 B 세포 결핍 마우스에서도 얻어지기 때문에(IgM^{-/-}, 도 6d), B 세포는 필요하지 않다고 할 수 있다. 오염 LPS는 경우에 따라서는 보강제로서 작용하며, CTL 반응 CyaAOVA의 자극에는 관여하지 않는다. 그 이유는 C57BL10ScSn 및 LPS-과소반응 마우스 C57BL10ScCr가 CyaAOVA 주사 후에 유사한 OVA 특이적 CTL 반응을 나타내기 때문이다(도시되지 않음).
- <206> **B.2.2 CD11b 발현 세포에 대한 CyaAOVA 제시의 시험관내 및 생체내 표적화**
- <207> CyaAOVA의 면역원성에 대한 이해를 높이기 위해서, 본 발명자들은 CD8⁺ T 세포에 대한 제시와 관련된 APC를 결정하고자 하였다. 자극용 리드아웃(readout)으로서 IL-2 분비를 이용하여, 본 발명자들은 H-2K^b 제한된 항-OVA

CD8⁺ T 세포 하이브리도마인 B3Z가 CyaALCMV가 아니라 CyaAOVA의 존재 하에 별크한 비장세포에 의해 시험관 내에서 자극된다는 것을 확인하였다(도 7a). 본 발명자들은 3종의 규명된 비장 APC, 즉 DC(CD11c⁺), B 세포(CD45R⁺) 및 대식세포/과립구(CD11b⁺CD11c⁻)의 APC 능력을 분석하고자 한다. 전체 비장세포 중 CD11c⁺의 비율(%)이 낮기 때문에(<1%), 본 발명자들은 밀도 분획화를 실시하여 유세포 분석으로 DC가 풍부한(4~10%) 저밀도 군으로부터 CD11c⁺를 분류하였다. 고밀도 분획은 미량의 CD11c⁺ 세포만을 함유하였다. 대조적으로, 양 분획 내의 CD45R⁺ 및 CD11b⁺CD11c⁻ (과립구/대식세포로 구성됨) 세포의 분포는 이들 마커에 대해 전체군을 분류할 수 있게 한다. 도 7c에 도시된 바와 같이, CyaAOVA는 DC에 의해 가장 효과적으로 제시되며, CD11b⁺CD11c⁻ 및 B 세포에 의해서는 덜 효과적으로 제시된다. 이것은 비장세포의 저밀도 분획 내에서 항원 제시 능력이 유사하게 한정된 분포를 갖는 것과 관련이 있다(도 7a). 현저하게 대조적으로, 고밀도 분획과 저밀도 분획은 pOVA에 반응하여 B3Z를 자극할 수 있었다(도시되지 않음).

<208> 면역화 후에 생체내에서 형성된 K^b-OVA 복합체를 검출하기 위해서, 50 µg CyaAOVA로 8~15 시간 전에 정맥내 면역화시킨 마우스로부터 제조한 APC를 Ag 첨가 없이 시험관내에서 B3Z와 동시배양하였다(생체의 분석). 시험관내 분석 결과, CyaAOVA 제시에 관여하는 APC는 비장세포의 DC가 풍부한 저밀도 분획에만 집중적으로 존재하였다(도 7b). B3Z를 자극하지 않는 CyaALCMV-면역화된 마우스로부터 얻은 APC로 분석의 특이성을 조사하였다(도 7b). CyaAOVA 제시에 연관된 저밀도 APC의 특성을 추가로 규명하기 위해서, 본 발명자들은 세포 분류를 실시하였다. 도 7d에 제시된 결과는 DC(CD11c⁺) 분획이 더욱 효과적인 APC였음을 확인한다. 동일한 분획으로부터 분류한 대식세포/과립구(CD11b⁺CD11c⁻) 및 B 세포(CD45R⁺)는 B3Z의 자극에 대해 매우 비효율적이었다.

<209> CyaAOVA에 관련된 APC의 특성을 추가로 규명하기 위해서, 본 발명자들은 CD11c⁺CD8α⁻ 골수 서브세트 및 CD11c⁺CD8α⁺ 림프구 서브세트에서 비장 저밀도 CD11c⁺ DC의 부분분획화를 실시하였다. 시험관내 및 생체의 분석 결과(각각 도 7e 및 f)로부터, CyaAOVA에 대한 항원 제시 능력은, 저레벨의 인테그린을 발현하는 림프구 서브세트와는 달리, CD11b⁺를 발현하는 골수 서브세트에 의해 유지된다는 것을 확인하였다(Pulendran et al., 1997; Vremec et al., 1997). CyaAOVA를 제공하는 CD11c⁺CD8α⁺ 림프구 서브세트의 능력 부재는 CyaAOVA에 대해 특이적이었다. 그 이유는 CD11c⁺CD8α⁺ 및 CD11c⁺CD8α⁻가 pOVA 합성 펩티드를 B3Z에도 동일하게 제시하였기 때문이다.

<210> 대조군(C57BL/6) 또는 B-세포 결핍 마우스(IgM^{-/-}) 유래의 비장세포를 이용한 시험관내 및 생체의 분석으로, 시험관내 및 생체내에서 B 세포가 CyaAOVA 제시에 기여하는 바가 별로 없다는 점을 확인하였다(도 7g 및 h). 이들 결과와 일치하여, CyaAOVA에 의해 유도되는 CLT 반응은 대조군 마우스와 비교하여 B-세포 결핍 마우스에서는 유의적인 영향을 받지 않았다(도 5d).

<211> **B.2.3 수지상 세포에 의한 CyaAOVA의 MHCI-제한된 제시는 시험관내 및 생체내 양쪽에서 제조할 독소의 시토줄 전달에 의존한다.**

<212> CyaAOVA 제시가 세포의 적재 또는 OVA 에피토프의 시토줄 전달에 의존성인지 여부를 결정하기 위해서, 본 발명자들은 항원에 노출된 적이 없는 동물(시험관내, 도 8a) 또는 CyaAOVA로 정맥내 면역화시킨 동물(생체외, 도 8b)로부터 정제된 비장의 TAP^{-/-} 또는 대조군 TAP^{+/+} 유래의 전체 비장세포 또는 CD11c⁺ DC를 이용하여 Ag 제시를 실시하였다. 그 결과로부터 수지상 세포에 의한 CyaAOVA 제시는 시험관내 또는 생체내에서 TAP에 완전히 의존적임을 확인하였다. pOVA 제시는 TAP 의존적 현상이기 때문에, 본 발명자들은 pOVA 펩티드를 시험관 내에서 적재한 이들 세포로 B3Z를 자극하여 CyaAOVA 면역화된 마우스로부터 분류된 TAP^{-/-} DC 작용성을 조사하였다(제시되지 않음). 이들 결과는 CyaAOVA의 생체내 제시가 시토줄 전달에 의존성임을 시사한다.

<213> **B.2.4 MHC I에 의한 항원 제시를 위한 세포 결합과 삽입된 항원의 시토줄 경로로의 전달에는 CD11b와 CyaA의 상호작용이 필요하다**

<214> 본 발명자들은 CD11b⁺ 세포에 대한 CyaA WT의 효과적인 포화성 결합이 항-CD11b mAb에 의해 특이적으로 차단될 수 있음을 A 부분에서 제시하였다. 또한, CD11b 형질감염은 CyaA WT에 대한 포화성 결합 및 감성을 CyaA WT에 내성인 다른 CD11b⁻ 세포에 특이적으로 부여하였다. 항-CD11b mAb의 세포 결합 차단으로 CyaA WT에 의해 유도되

는 촉매 아데닐레이트 시클라제 도메인의 세포내 전달, cAMP 증가와 세포 사멸이 억제되었다. 이 결과는 세포주 상에서 얻은 것이기 때문에, CyaA가 비장세포에 결합하는지 여부를 여전히 측정할 수 있다. 본 발명자들은 피코에리트린에 커플링된 스트렙타비딘을 포함하는 전체 비장세포 현탁액에 OVA 펩티드(CyaAOVA비오틴)를 보유하는 CyaA의 비오티닐화되고 해독된 형태의 고정을 검출하기 위한 유세포 분석을 설정하였다. 이 분석을 이용하여, 본 발명자들은 CyaAOVA가 전체 비장세포 현탁액 내의 백혈구의 서브세트에 결합한다는 것을 관찰하였다(5~7%). 대조군 mAb가 아니라 항-CD11b M1/70 mAb와의 사전배양으로 이 결합을 제거하였다(도 9a). 또한, 저밀도 세포에 대한 CyaAOVA 결합과 CD11b 발현 간에는 상관관계가 있다. CyaAOVA는 CD11b를 고레벨로 발현하는 $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}$ 에는 효과적으로 결합하며, CD11b를 저레벨로 발현하는 $CD11c^{+}CD8\alpha^{+}$ 에는 덜 효과적으로 결합하고, CD11b를 발현하지 않는 $CD11c^{-}CD8\alpha^{+}$ T 세포에는 매우 약하게 결합한다(도 9b). CyaOVA는 CD11c- 군에서 $CD11b^{32+}$ 의 존재와 상관이 있는 낮은 비율(%)의 $CD11c^{-}CD8\alpha^{-}$ 세포와 효과적으로 결합하는 것은 주목할 만하다. 따라서, CyaOVA 비오틴 결합은 CD11b(CyaA WT의 경우)에 의해 매개되고, 소정의 세포 유형이 CyaOVA를 제공하는 능력을 예측할 수 있다.

<215> 시험관 내에서, 본 발명자들은 항-CD11b mAb M1/70이 TSC 세포에 의한 CyaAOVA의 B3Z로의 제시를 차단함을 확인하였다(도 10a). 이러한 차단은, i) 다른 $\beta 2$ 인테그린과 구성원(항-CD11a, CD11c)에 대해 특이적인 mAb 또는 대조군 mAb가 거의 또는 전혀 효과를 나타내지 않으며(도 10a, 테이블은 제시되지 않음), ii) pOVA의 제시는 항-CD11b, 또는 어떠한 mAb에 의해서도 영향을 받지 않기 때문에 특이적이다(도 10b, 테이블은 제시되지 않음). 이것으로 CD11b가 적어도 비장에서 CyaAOVA에 대한 주요 수용체이고, CyaAOVA-CD11b 상호작용이 삽입된 에피토프 제시에 필수적임이 확인된다.

<216> 마지막으로, CyaAOVA 제시에 있어서 CD11b 발현 세포의 역할을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 CyaAOVA 또는 pOVA로 면역화시킨 마우스로부터 얻은 전체 비장세포에 대해 분류 실험을 실시하였다. 전체 비장세포는 $CD11b^{+}$ 및 $CD11b^{-}$ 분획으로 분류되었다. pOVA 정맥내 면역화 후에 2개의 아군이 B3Z를 자극한 반면(도 10d), CyaAOVA 정맥내 면역화 후에는 $CD11b^{+}$ 아군만이 B3Z를 자극하였다(도 10c).

<217> 이들 결과로부터, CyaOVA로부터 얻은 OVA 펩티드의 제시는 세포 결합에 좌우되며, 따라서 CD11b와의 상호작용에도 의존한다는 것이 명백히 입증되었다.

<218> B.3 논의

<219> 본 발명자들은, 본 연구에서 에피토프 전달 벡터로서 보르데텔라 퍼투스스의 해독된 아데닐레이트 시클라제를 사용하여 단일 주사 후에 CTL 반응을 자극하고, 보강제가 필요하지 않은 면역화 방법을 확립하였다. 본 발명자들은 벡터로서 해독된 CyaA의 고효능에 기여하는 기전을 확인하였다.

<220> B.3.1 CyaA는 CD11b 인테그린과의 상호작용을 통해서 골수 수지상 세포를 표적화한다

<221> 시험관내 또는 생체내 적재된 APC(각각 시험관내 및 생체외 분석)를 사용하여 특이적 $CD8^{+}$ T 세포 하이브리도마에 대한 항원 제시 분석으로, CyaAOVA에 대해 가장 효과적인 APC는 $CD11c^{+}CD11b^{32+}$ DC임을 입증하였다. 실제로, CyaAOVA에 대한 모든 Ag 제시 능력은 DC를 보유하는 비장세포의 저밀도 분획에 있었다. 규명된 세포 종류의 세포 분류로 $CD11c^{+}CD11b^{32+}$ DC 세포가 CyaAOVA를 제시하는 데 있어서 $CD11c^{-}CD11b^{32+}$ 세포보다 더욱 효과적인 것으로 밝혀졌다. CyaAOVA(시험관내 및 생체외)의 효과적인 제시와 B-세포 결핍 마우스에서의 CTL 반응으로, B 세포($CD45R^{+}$)가 약간의 기여를 하는 것으로 확인되었다.

<222> B.3.2 CyaA는 생체내에서 MHC 클래스 I 제시를 위해 시토졸 경로에 Ag를 전달한다

<223> 여기서, 본 발명자들은 시험관내에서 전체 비장세포에 대한 CyaAOVA 제시의 의존성을 보여준다. 특히, 본 발명자들은 TAP 의존 경로에 따라 생체내 CyaAOVA 제시가 일어남을 제안한다. 이로부터 생체내 CyaAOVA 제시가 시토졸 전달로부터 효과적으로 발생하는 것이지 후속되는 세포의 분해로부터 발생하는 것은 아니라는 결론을 내렸다.

<224> B.3.3 CTL 자극은 $CD4^{+}$ T 세포 도움을 필요로 하지 않으며, CD40 시그널링에 독립적이다

<225> 미성숙 단계로부터 성숙 단계로의 성숙은, i) Ag 포집 능력 감소, ii) T 세포 항원 자극 능력 증가, iii) Ag-특이적 T 세포와 직면할 가능성을 최대화하는 Ag 샘플링 부위(비장 내의 주변 구역)로부터 T 세포 영역(비장 내의

주변 소동맥 판)으로의 이행을 특징으로 한다(De Smedt et al., 1999). DC에 의한 Ag의 제시 외에, 성숙 단계는 T 세포 항원 자극에 전제조건인 것으로 가정된다. 시험관내 연구는, DC 성숙을 시그널링하는데 있어서 특히 CD40L-CD40 상호작용을 통한 CD4⁺ T 세포의 역할에 관심을 집중하였다(Bell et al., 1999). 세포성 Ag의 교차 항원 자극 후에 CD8⁺ T 세포 항원 자극의 경우, CD4⁺ T 세포는 CD40-의존성 기전에 있어서 CD8⁺ T 세포에 도움이 된다(Schuurhuis et al., 2000; Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Ridge et al., 1998). CyaAOVA는 CD4 및 CD40 의존적 방식으로 CTL을 자극하기 때문에, 해독된 CyaA는 고유의 보강성을 부여할 수 있는 것으로 생각된다.

B.3.4 결론

본 연구에서는 전문 APC로의 표적화, 벡터화된 Ag의 시토졸 전달과 보강제의 부재 하에 CTL 자극에 적합한 단백질성 백신 벡터를 처음으로 특성규명하였다. 또한, 본 발명자들은 Ag 제시가 CyaA 및 이의 수용체인 CD11b 간의 상호작용에 의존적이라는 것을 입증함으로써 세포 표적화 기전을 해명하였다. 따라서, CyaA의 세포 특이성은 Ag 전달 목적에 적합하다. 마지막으로, CyaA 또는 기타 박테리아 독소의 세포 특이성은, 제한된 세포 세트에 표적화되어야 하는 약학적 관련 분자의 광범위한 세트를 시토졸로 전달하는 작용을 할 수 있다.

C. 생체내에서 수지상 세포에 화학적으로 커플링된 항원을 전달하는 아데닐시클라제의 용도

C.1 CyaA 유도된 벡터에 대상 분자를 커플링시키는 방법

이 섹션에는 대상 분자를 이황화 결합을 통해 CyaA에 그래프트시켜 재조합 CyaA 독소를 제조하는 일반적인 방법이 개시되어 있다.

예로서, 난알부민 유래의 CD8⁺ T 세포 에피토프에 해당하는 합성 12 아미노산 길이의 펩티드를, 위치 235에서 CyaA 촉매 도메인에 유전자 도입된 시스테인 잔기에 이황화 결합을 통해 화학적으로 가교시켰다(야생형 CyaA에는 시스테인 잔기가 없음). 신규한 구조물에 대한 예상 장점은 다음과 같다:

(i) 다용성: 단일 CyaA 캐리어 단백질은 모든 목적하는 합성 펩티드에 쉽게 커플링시킬 수 있다;

(ii) 면역원성: APC 시토졸 내로 전달시, CyaA에 화학적으로 커플링된 에피토프는 벡터로부터 방출되어야 하고 (세포내 환원 조건에 의함), MHC 클래스 I 제시 경로로 직접 도입되어야 함으로, 프로테아솜에 의한 단백질 프로세싱의 가능한 제한 단계를 피할 수 있다.

이황화 결합으로 합성 펩티드를 CyaA에 커플링시키는 일반적인 절차는 도 11에 요약되어 있다.

제1 단계에서, CyaA의 촉매 도메인에 유전자적으로 삽입된 단일 시스테인 잔기를 포함하는(야생형 CyaA에는 시스테인 잔기가 없음) 재조합 CyaA 독소를 제조한다.

재조합 CyaA 독소인 ACTM235는 이미 특성규명된 바 있다(Heveker and Ladant, 1997). 특히, ACTM235는 아미노산 235와 236 사이에 삽입된 Cys-Ser 디펩티드를 포함하며, 완전한 세포독성이 있다. A.1.1에 개시된 바와 같이 이 독소를 발현시킨 다음 균질하게 정제하였다.

제2 단계에서, 난알부민에서 얻은 CD8⁺ T 세포에 해당하는 합성 펩티드를 고안하였다: 정확한 에피토프 서열인 SIINFEKL 서열(아미노산에 대한 1문자 코드) 외에, 활성화된 니트로-피리딘-설폰일 티올기(Cys-NPys)와 시스테인 잔기를 화학 합성 과정에서 펩티드 N-말단에 부가하였다. 활성화된 NPys-시스테인을 가요성 GGA 모티프에 의해 SIINFEKL 서열로부터 분리하여 APC 내의 펩티드의 추가 단백질분해 프로세싱을 촉진하였다. 펩티드(Cys-NPys-OVA, 분자량: 1405 da)를 네오시스템(프랑스 스트라스부르크)으로 합성하였다.

제3 단계에서, 하기 절차를 이용하여 Cys-NPys-OVA 펩티드를 ACTM235에 커플링시켰다.

8M 우레아, 20 mM Hepes-Na, pH 7.5 중의 정제된 ACTM235 10 mg을, 10 mM 디티오프레이톨(DTT)의 존재 하에 12 시간 동안 항온배양하여 환원시켰다. 환원 효율은 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE 분석으로 조사하였다; 거의 모든 ACTM235 단백질은 단량체종에 해당하는 단일 밴드 200 kDa로서 이동하였으며, 이량체종(분자량 약 400 kDa)이 있다는 증거는 없었다. 환원된 단백질을 8 M 우레아, 20 mM Hepes-Na, pH 7.5에서 평형화시킨 DEAE-세파로스(아머삼 파마시아 바이오테크) 컬럼(5 mL 팩킹형 수지)에 적재하였다. 8M 우레아, 20 mM Hepes-Na, pH 7.5, 0.1M NaCl(>100 mL)로 집중적으로 세척하여 미량의 DTT를 제거한 DEAE 세파로스 수지 상에 ACTM235 단백질을 완전히 유지시켰다(잔여 DTT의 부재는 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산), DNTB와 전형적인 엘만 반응을 이용하

여 조사하였다). 8M 우레아, 20 mM Hepes-Na, pH 7.5, 0.5M NaCl 중에서 DEAE-세파로스 수지로부터 환원된 ACTM235 단백질을 용출시켰다. 그 다음 3 mg(약 2 μ mol)의 Cys-Npys-OVA 펩티드를 환원된 ACTM235 단백질(8 mg, 약 45 nmol)에 가하고, 혼합물을 실온에서 16 시간 동안 항온배양하였다. 그 다음 25 mL의 20 mM Hepes-Na, pH7.5 및 8 mL의 5M NaCl을 첨가하고, 이 희석된 혼합물을 20 mM Hepes-Na, pH 7.5, 1M NaCl에서 평형화시킨 페닐-세파로스(아머샴 파마시아 바이오테크) 컬럼(10 mL 팩킹 수지)에 적재하였다. 50 mL의 20 mM Hepes-Na, pH 7.5, 1M NaCl로 세파로스 수지를 세척하고, 50 mL의 20 mM Hepes-Na, pH 7.5로 세척하였다. 유도체화된 ACTM235 단백질을 8M 우레아, 20 mM Hepes-Na, pH 7.5에서 용출시켰다. 142,000 $M^{-1}.cm^{-1}$ 의 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡수로부터 독소 농도를 분광학적으로 측정하였다.

<240> 동일한 절차를 사용하여, 해독된 변종(즉, 잔기 188 및 189 사이에 2 아미노산 LQ가 유전자 삽입된 결과로서 효소 활성이 결여된 변종)인 제2 재조합 CyaA 독소 CyaAE5-LCMVgp에 Cys-Npys-OVA 펩티드를 커플링시켰다. 이 독소는 단일 Cys 잔기를 포함하고 CyaA의 224와 225 잔기 사이에 삽입된 15 아미노산 길이의 폴리펩티드 서열(PASAKAVYNFATCGT)을 포함하였다. 이러한 재조합 독소를 암호화하는 플라스미드는, PASAKAVYNFATCGT 서열을 암호화하는 적절한 합성 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 *StuI* 및 *KpnI* 사이에 삽입하여 변형시킨 pCACT-ova-E5의 유도체이다(Guermonprez et al., 2000). CyaAE5-LCMVgp 단백질을 A.1.1에 개시된 바와 같이 발현 및 정제하였다.

<241> 표 1에 제시된 펩티드는, 촉매 부위에 동일한 LQ 디펩티드 삽입체와 CyaA의 잔기 224 및 225 사이에 삽입된 14 아미노산 서열을 포함하는 또 다른 해독된 재조합 CyaA 독소인 CyaAE5-CysOVA에 유사하게 커플링시켰다. 이 삽입체는 도 12에 도시된 바와 같이 OVA 에피토프에 인접한 Cys 잔기를 포함한다. 이 재조합 독소를 암호화하는 플라스미드는, ASCGSIINFEKLGT 서열을 암호화하는 적절한 합성 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 *BsiI*와 *KpnI* 제한 부위 사이에 삽입하여 변형시킨 pCACT-ova-E5의 유도체이다. CyaAE5-CysOVA 단백질을 앞서 A.1.1에 개시된 바와 같이 발현 및 정제하였다.

<242> CyaAE5-CyaOVA는 이황화 가교에 의해 CTL 에피토프의 화학적 커플링을 위한 일반적인 해독된 벡터로서 생각할 수 있다. 상기 B.1.4에 개시된 바와 같이 특이적 T 세포 하이브리도마에 대한 OVA 에피토프의 제시를 측정하여 에피토프 전달에 있어서의 작용성에 대하여 CyaAE5-CysOVA 내의 OVA 에피토프 존재를 시험관내 분석으로 쉽게 확인할 수 있다.

표 1

<243>

CyaAE5-CyaOVA에 커플링된 NPys CTL 펩티드	
에피토프 명칭	펩티드의 아미노산 서열
CEA 571	Cys(NPys)-GGYLSGANLNL
Gp100	Cys(NPys)-GGITDQVPFSV
멜란A	Cys(NPys)-GGEAAGIGILTV
티로시나제	Cys(NPys)-GGYMDGTMSQV

<244> 대안적으로, 재조합 CyaA 독소의 티올기를 2,2'-디티오디피리딘(시그마)으로 활성화시키고, 환원된 시스테인을 포함하는 펩티드로 유도체화시킬 수 있다(합성 펩티드 내의 Cys를 환원시키는 절차는 제조자가 제공한다). 이것은 목적하는 펩티드가 내부 시스테인 잔기를 포함하는 경우 적절하다.

<245> C.2 CyaA에 화학적으로 커플링된 OVA 에피토프의 시험관내 및 생체내 면역원성의 분석

<246> 화학적(CyaA-gp-S-S-OVA E5) 또는 유전자 커플링(CyaA-OVA E5) 후에 CyaA에 의한 MHC 클래스 I 분자에 OVA 에피토프의 시험관내 전달은, 비장세포에 의한 항-OVA B3Z CD8⁺ T 세포 하이브리도마에 대한 이들 분자의 제시를 연구함으로써 처음 분석되었다. C57BL/6 마우스 유래의 3×10^5 비장세포를 각종 농도의 재조합 CyaA의 존재 하에 10^5 B3Z 세포와 함께 18 시간 동안 동시배양하였다. B3Z에 의한 IL-2 방출을 CTLL 증식 분석에서 측정하였다.

<247> 도 13에 도시된 바와 같이, B3Z가 CyaA-gp-S-S-OVA E5 또는 CyaA-OVA E5로 자극되는 경우 다량의 IL-2 분비가 관찰되었다. 따라서, CyaA에 화학적으로 결합된 OVA 에피토프는, 유전자 커플링 후보다 항원 제시 세포의 시토

줄 경로로 더욱 효과적으로 전달된다는 것이 입증되었다. OVA 에피토프가 결합된 CyaA 분자로 B3Z를 자극하는 경우 IL-2 생성이 관찰되지 않았다. 이는 IL-2 생성의 특이성을 제시하는 것이다.

<248> 제2 단계에서, OVA-특이적 CTL 반응을 유도하는 이들 분자의 생체내 능력을 분석하였다. C57BL/6 마우스(그룹당 2마리)를 각종 CyaA 50 μ g의 정맥내 주사로 면역화하였다. 7일 후에, 각 마우스의 25×10^6 비장세포를 25×10^6 조사된 동계 비장세포의 존재 하에 5일 동안 0.1 μ g의 OVA 펩티드로 재자극하였다.

<249> 50 μ M의 OVA 펩티드로 펄스되거나 펄스되지 않은 51 Cr-표지된 EL4 표적 세포에서 효과기 세포의 세포독성 활성을 측정하였다.

<250> 도 14에 도시된 바와 같이, CyaA-gp-S-S-OVA E5 또는 CyaA-OVA E5로 면역화시킨 마우스에서 높은 CTL 반응이 유도되며, 이는 OVA 에피토프의 화학적 또는 유전자 커플링의 유사한 효능을 입증한다. 비코팅된 EL4가 표적 세포로서 사용되거나 OVA 에피토프가 결합된 대조군 CyaA 분자로 면역화시킨 마우스에서는 CTL 반응이 관찰되지 않으며, 이는 관찰된 CTL 반응의 특이성을 보여주는 것이다.

<251> 결론적으로, 이들 결과는 CyaA-유도된 단백질질 벡터에 화학적으로 결합된 $CD8^+$ T 세포 에피토프가 MHC 클래스 I 제시에 대한 시토줄 경로에 매우 효과적으로 전달되며, 생체내에서 강력한 CTL 반응을 유도한다는 것을 명백히 입증한다.

<252> **D. CD11b/CD18에 결합하고 효과적인 분자 전달 벡터로서 사용할 수 있는 CyaA 유도된 단편의 확인**

<253> CyaA와 CD11b/CD18 수용체 간의 상호작용과 관련된 영역을 맵핑하고자 하는 시도로서, CyaA의 각종 서브단편들을 작제하고, 상기 A 단락에 개시한 방법을 사용하여 형질감염된 CHO 세포의 표면에서 CD11b/CD18에 대한 결합을 위해 비오틴화된 CyaA 독소와 경쟁하는 능력에 대해 시험하였다.

<254> **D.1 CyaA373-1706의 발현**

<255> 신규 발현 벡터 pTRAC-373-1706를 사용하여 CyaA373-1706 단백질을 E.콜리에서 제조하였다(도 16). 이것은 플라스미드 pDL1312의 뉴로칼신 유전자를 (CyaA의 Lys860 및 983의 번역후 팔미토일화에 의해 프로CyaA의 활성 독소로의 전환과 관련된 CyaC를 암호화하는) *cyaC* 유전자와 CyaA의 C-말단 도메인(코돈 373-1706)을 암호화하는 *cyaA* 유전자의 3' 부분으로 치환하여 작제한 플라스미드 pDL1312의 유도체이다(Ladant, 1995)(도 16 참조). *cyaC* 및 '*cyaA* 유전자는 λ 파지 Pr 프로모터의 제어 하에 동일한 전사 단위에 배치된다. 하류 '*cyaA* 유전자의 번역 개시를 향상시키는 리보솜 결합 부위를 정지 코돈 앞에 도입하여 *cyaC* 유전자의 3' 말단을 변형시켰다(도 16). 그 결과 생긴 CyaC 폴리펩티드의 변형(CyaC의 C-말단에서 적어도 3개의 아미노산 Gly-Thr-Ala이 Asn-Arg-Glu-Glu 서열로 치환되었음)은 CyaA를 아실화시키는 능력에 영향을 미치지 않았다. *cyaA* 유전자의 5'-말단(*cyaA*의 고유 *Bst*BI 부위의 하류에 독소의 촉매 도메인을 암호화함)을 결실시키고 MGCGN 서열을 암호화하는 적절한 합성 이중 가닥 올리고뉴클레오티드로 치환하였다(도 16).

<256> pTRAC-373-1706은 32°C 이하의 온도에서 λ Pr 프로모터에서의 유전자 전사를 강력히 억제하는 감열성 λ 리프레서 CI^{857} , *colE1*의 복제 기점과 앰피실린 내성을 부여하는 베타-락타마제 유전자를 암호화한다.

<257> E.콜리 균주 BLR에서 CyaA373-1706 단백질 발현을 실시하였다. 150 mg/l 앰피실린을 함유하는 LB 배지에서 pTRAC-373-1706으로 형질전환된 세포를 중간 로그기(mid-log)까지 증식시키고, 증식 온도를 42°C로 증가시켜 CyaC와 절두된 CyaA의 합성을 유도하였다. 42°C에서 추가로 3~4시간 증식시킨 후에 박테리아를 수거하였다. CyaA373-1706 단백질을 야생형 CyaA에 대해 개시된 바와 같이 정제하였다(Guermonprez et al., 2000). CyaA373-1706에는 cAMP 합성 활성이 없었으며, 양 적혈구의 용혈 활성을 나타내고, MGCGN N-말단 서열 내의 단일 시스테인 잔기를 포함하였다.

<258> **D.2 CyaA-E5 및 CyaA 단편: 1-383(촉매 도메인) 및 373-1706(소수성 및 반복부 도메인)에 의한 CyaA-E5의 CD11b에 대한 결합 억제**

<259> 도 15에 도시된 바와 같이, CyaA-E5와 형질감염된 CHO 세포를 항온배양한 후에 비오틴화된 CyaA-E5 결합이 강하게 억제되었다. 단편 CyaA-373-1706과 이들 세포를 항온배양한 후에 유사한 억제가 얻어진 반면, CyaA 1-383은 비오틴화된 CyaA-E5의 결합에 대해 유의적인 영향을 미치지 않았다.

<260> 따라서, 이들 결과는 잔기 373-1706(CyaA373-1706)을 포함하는 CyaA 단편이 CD11b/CD18 수용체와 CyaA의 상호작용에 필수적으로 필요한 구조를 포함한다는 것을 명백히 입증한다.

E. 결론

MHC 클래스 I 분자는 일반적으로 내인성으로 합성된 단백질로부터 유도된 펩티드를 제공하기 때문에, CTL 반응을 유발하도록 항원 제시 세포의 시토졸에 에피토프를 전달해야 한다. 재조합 ACT 단백질의 CTL 자극 활성은 적어도 부분적으로는 CD8⁺ T 세포 에피토프를 항원 제시 세포(APC)의 시토졸 내로 전달하는 능력에 좌우된다. 한 방법에서는, 에피토프를 CyaA의 촉매 도메인 내에 유전자적으로 삽입하였다. 그 이유는 야생형 독소의 경우 폴리펩티드의 이 부분이 표적 세포의 시토졸에 도달하여 독성 효과를 발휘하는(즉, cAMP 합성) 것으로 알려져 있기 때문이다. 세포 내로 도입된 후에, 에피토프 삽입체를 보유한 CyaA 에피토프 도메인은 성숙된 CD8⁺ T 세포 에피토프를 방출하도록 단백질 분해 프로세싱 처리되어야 하며, 그 다음 세포질 세망으로 전위되어 MHC 클래스 I 분자와 회합할 것이다.

프로테아솜에 의해 진행되는 단백질분해 프로세싱은 여러 경우에 제한 단계이며(Pamer and Cresswell, 1998; Cascio et al., 2001), 성숙 에피토프의 총 수율을 상당히 감소시킨다. 이황화 결합을 통해 CyaA의 촉매 도메인에 에피토프를 연결시키는 것을 포함하는 본 명세서에 개시된 또 다른 방법은, 이 디자인에서는 성숙된 에피토프(N-말단만 절단하면 됨)가 APC의 시토졸 내부의 CyaA로부터 정량적으로 방출된다는 상당한 장점을 제공한다. 또한, 이것은 단일 CyaA 캐리어 단백질이 임의의 목적하는 합성 펩티드에 쉽고 신속하게 커플링될 수 있기 때문에 매우 유용한 시스템이다. 또한, 해독된 재조합 CyaA 독소의 촉매 도메인(예, 맵핑된 허용 부위내, WO 93/21324(앵스퍼뛰 파스퇴르)) 내의 일부 시스테인 잔기를 유전자 조작으로 쉽게 도입하여 복수의 펩티드를 동일한 CyaA의 분자 상에 커플링시킬 수 있다. 이것은 재조합 단백질의 면역원성 및 총 에피토프 전달을 증가시킨다.

결실 맵핑으로 독소와 CD11b/CD18 수용체와의 상호작용에 연관된 영역으로서 CyaA의 C-말단 부분(aa 373-1706)을 확인할 수 있다. 따라서 절두된 단백질 CyaA373-1706은 생체 내에서 CD11b⁺ 세포를 표적화하는 단백질 모듈로서 사용할 수 있다. 특히, 대상 항원에 해당하는 폴리펩티드 또는 단백질은 수지상 세포로 전달하고자 하는 CyaA373-1706에 유전자적으로 융합시켜 특이적 면역 반응을 유발할 수 있다. N-말단 단부에 단일 시스테인을 포함하는 재조합 CyaA373-1706 단백질에 대해 유사한 커플링을 실시할 수 있다.

<265>

관련 서적 목록

1. Aichele, P., D. Kyburz, P.S. Ohashi, B. Odermatt, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, and H. Pircher. 1994. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, no. 2:444-8.
2. Aichele, P., K. Brduscha-Riem, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, and H. Pircher. 1995. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *Journal of Experimental Medicine* 182, no. 1:261-6.
3. Ballard, J.D., R.J. Collier, and M.N. Starnbach. 1996. Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 22:12531-4.
4. Bassinet, L., P. Gueirard, B. Maitre, B. Housset, P. Gounon, and N. Guiso. 2000. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68, no. 4:1934-41.
5. Bell, D., J.W. Young, and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Advances in Immunology* 72:255-324.
6. Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1997. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 1:65-70.

<266>

7. Bennett, S.R., F.R. Carbone, T. Toy, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. B cells directly tolerize CD8(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 11:1977-83.
8. Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling [see comments]. *Nature* 393, no. 6684:478-80.
9. Betsou et al. *Infect. Immun.* 1993 Sept., 61(9) 3583-3589.
10. Betsou et al. *Infect. Immun.* 1995 Sept., 63(9) 3309-3315.
11. Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann, and P. Sebo. 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, no. 44:27231-9.
12. Carbonetti, N.H., T.J. Irish, C.H. Chen, C.B. O'Connell, G.A. Hadley, U. McNamara, R.G. Tuskan, and G.K. Lewis. 1999. Intracellular delivery of a cytolytic T-lymphocyte epitope peptide by pertussis toxin to major histocompatibility complex class I without involvement of the cytosolic class I antigen processing pathway. *Infection & Immunity* 67, no. 2:602-7.
13. Casares, S., K. Inaba, T.D. Brumeanu, R.M. Steinman, and C.A. Bona. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 9:1481-6.

<267>

14. Condon, C., S.C. Watkins, C.M. Celluzzi, K. Thompson, and L.D. Falo, Jr. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Medicine* 2, no. 10:1122-8.
15. Confer, D.L., and J.W. Eaton. 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217, no. 4563:948-50.
16. Coote, J.G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 8, no. 2:137-61.
17. Crowley, M., K. Inaba, and R.M. Steinman. 1990. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *Journal of Experimental Medicine* 172, no. 1:383-6.
18. De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 184, no. 4:1413-24.
19. C. Fayolle, P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann, and C. Leclerc, (1996) In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8(+) T-cells epitopes, *J. Immunol.* 156. 4697-4706
20. Fayolle, C., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *Journal of Immunology* 162, no. 7:4157-62.
21. Friedman, R.L., R.L. Fiederlein, L. Glasser, and J.N. Galgiani. 1987. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified

- adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infection & Immunity* 55, no. 1:135-40.
22. Fuchs, E.J., and P. Matzinger. 1992. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258, no. 5085:1156-9.
 23. Gray, M., G. Szabo, A.S. Otero, L. Gray, and E. Hewlett. 1998. Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *Journal of Biological Chemistry* 273, no. 29:18260-7.
 24. Gross, M.K., D.C. Au, A.L. Smith, and D.R. Storm. 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, no. 11:4898-902.
 25. Gueirard, P., A. Druilhe, M. Pretolani, and N. Guiso. 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infection & Immunity* 66, no. 4:1718-25.
 26. Guermonprez, P., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *Journal of Immunology* 162, no. 4:1910-6.
 27. P. Guermonprez, C. Fayolle, C. Leclerc, G. Karimova, A. Ullmann, and D. Ladant. (2000) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8⁺ T-cell epitopes into antigen presenting cells. in *Methods in Enzymology, Chimeric Genes and Proteins*, 326, 527-542. J. Abelson, S. Emr, and J. Thorner (Eds) Academic Press Inc.

28. Guery, J.C., F. Ria, and L. Adorini. 1996. Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *Journal of Experimental Medicine* 183, no. 3:751-7.
29. Guery, J.C., F. Ria, F. Galbiati, S. Smioldo, and L. Adorini. 1997. The mode of protein antigen administration determines preferential presentation of peptide-class II complexes by lymph node dendritic or B cells. *International Immunology* 9, no. 1:9-15.
30. Guiso, N., M. Rocancourt, M. Szatanik, and J.M. Alonso. 1989. *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. *Microbial Pathogenesis* 7, no. 5:373-80.
31. Guiso, N., M. Szatanik, and M. Rocancourt. 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microbial Pathogenesis* 11, no. 6:423-31.
32. Harvill, E.T., P.A. Cotter, M.H. Yuk, and J.F. Miller. 1999. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infection & Immunity* 67, no. 3:1493-500.
33. N. Heveker and D. Ladant.(1997) Characterization of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin. Implications for the mechanism of toxin entry into target cells, *Eur. J. Biochem.*, 243, 643-649.
34. Hewlett, E., and J. Wolff. 1976. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. *Journal of Bacteriology* 127, no. 2:890-8.
35. Jeyaseelan, S., S.L. Hsuan, M.S. Kannan, B. Walcheck, J.F. Wang, M.E. Kehrli, E.T. Lally, G.C. Sieck, and S.K. Maheswaran. 2000.

- Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for Pasteurella haemolytica leukotoxin in bovine leukocytes. *Infection & Immunity* 68, no. 1:72-9.
36. Karimova, G., C. Fayolle, S. Gmira, A. Uilmann, C. Leclerc, and D. Ladant. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 21:12532-7.
 37. Karttunen, J., S. Sanderson, and N. Shastri. 1992. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, no. 13:6020-4.
 38. Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, no. 3:167-78.
 39. Khelef, N., H. Sakamoto, and N. Guiso. 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microbial Pathogenesis* 12, no. 3:227-35.
 40. Khelef, N., A. Zychlinsky, and N. Guiso. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infection & Immunity* 61, no. 10:4064-71.

<271>

41. Khelef, N., and N. Guiso. 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. FEMS Microbiology Letters 134, no. 1:27-32.
42. Khelef, N., C.M. Bachelet, B.B. Vargaftig, and N. Guiso. 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. Infection & Immunity 62, no. 7:2893-900.
43. Killeen, N., S. Sawada, and D.R. Littman. 1993. Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. EMBO Journal 12, no. 4:1547-53.
44. Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. Nature 350, no. 6317:423-6.
45. Kyburz, D., P. Aichele, D.E. Speiser, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, and H. Pircher. 1993. T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. European Journal of Immunology 23, no. 8:1956-62.
46. Ladant D., Glaser P. and A. Ullmann. 1992. Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* Adenylate cyclase. Journal of Biological Chemistry (4), no. 267: 2244-2250.
47. Ladant D., Calcium and membrane binding properties of bovine neurocalcin delta expressed in *Escherichia coli*, J Biol Chem **270** (1995) 3179-3185.
48. Ladant, D., and A. Ullmann. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. Trends in Microbiology 7, no. 4:172-6.

<272>

49. Njamkepo, E., F. Pinot, D. Francois, N. Guiso, B.S. Polla, and M. Bachelet. 2000. Adaptive responses of human monocytes infected by *bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol* 183, no. 1:91-9.
50. Otero, A.S., X.B. Yi, M.C. Gray, G. Szabo, and E.L. Hewlett. 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 17:9695-9697.
51. Porgador, A., K.R. Irvine, A. Iwasaki, B.H. Barber, N.P. Restifo, and R.N. Germain. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 6:1075-82.
52. Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, and E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *Journal of Immunology* 159, no. 5:2222-31.
53. Reis e Sousa, C., and R.N. Germain. 1999. Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation in vivo: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue. *Journal of Immunology* 162, no. 11:6552-61.1
54. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, no. 6684:474-8.
55. Rogel, A., and E. Hanski. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep

<273>

- erythrocytes. The Journal of Biological Chemistry 267, no. 31:22599-22605.
56. Rose, T., P. Sebo, J. Bellalou, and D. Ladant. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. Journal of Biological Chemistry 270, no. 44:26370-6.
 57. Sakamoto, H., J. Bellalou, P. Sebo, and D. Ladant. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. Journal of Biological Chemistry 267, no. 19:13598-602.
 58. M.F. Saron, C. Fayolle, P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann and C. Leclerc. (1997) Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T-cell epitope from LCMV. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 3314-3319
 59. Schoenberger, S.P., R.E. Toes, E.I. van der Voort, R. Offringa, and C.J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions [see comments]. Nature 393, no. 6684:480-3.
 60. Schuurhuis, D.H., S. Laban, R.E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M.J. Kleijmeer, E.I. van Der Voort, D. Rea, R. Offringa, H.J. Geuze, C.J. Melief, and F. Ossendorp. 2000. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli [In Process Citation]. J Exp Med 192, no. 1:145-50.

<274>

61. Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H., and Ullmann, A. 1991. Gene 104, 19-24.
62. Viola, A., G. Iezzi, and A. Lanzavecchia. 1999. The role of dendritic cells in T cell priming: the importance of being professional. In Dendritic cells. T.L. Lotze and A.W. Thomson, editors. Academic Press, San Diego. 251-253.
63. Vremec, D., and K. Shortman. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. Journal of Immunology 159, no. 2:565-73.
64. Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. Journal of Experimental Medicine 176, no. 1:47-58.
65. Weiss, A.A., E.L. Hewlett, G.A. Myers, and S. Falkow. 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. Journal of Infectious Diseases 150, no. 2:219-22.
66. Weiss, A.A., and M.S. Goodwin. 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. Infection & Immunity 57, no. 12:3757-64.
67. Wolff, J., G.H. Cook, A.R. Goldhammer, and S.A. Berkowitz. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77, no. 7:3841-4.
68. Zhong, G., C.R. Sousa, and R.N. Germain. 1997. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. Journal of Experimental Medicine 186, no. 5:673-82.
69. Zinkernagel, R.M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. Immunological Reviews 156:199-209.
70. WO 93/21324 (INSTITUT PASTEUR). Recombinant mutants for inducing specific immune response.

도면의 간단한 설명

도 1: CyaA의 포화성 결합은 CD11b 발현과 상관관계가 있다

a: 대식 세포(J774A.1), B 세포(LB27.4), 및 T 세포(EL4)의 표면에서의 CyaA 결합은 20분 동안 37℃에서 실시하였다. 재료 및 방법 섹션에 개시한 바와 같이, 표면 결합된 CyaA는 비오틴화된 항-CyaA 폴리클론 항체로 검

출하고, 스트렙타비딘-PE로 확인한 후, 생세포에서 유세포 분석법으로 검출하였다. 결합은 다음과 같이 표현된다: $\Delta\text{MFI} = (\text{CyaA와 항온배양한 세포의 평균 형광 강도치}) - (\text{CyaA를 사용하지 않은 세포의 평균 형광 강도})$.

<108> b, c, d, e: J774A.1, LB27.4 및 EL4 세포 상에서의 β_2 인테그린의 표면 발현. CD11a (b), CD11b (c), CD11c (d), 및 CD18(e) 발현은 PE에 커플링된 특이적 mAb를 사용하여 유세포 분석법으로 결정하였다. 인테그린 발현은 다음과 같이 표현된다: $\Delta\text{MFI} = (\text{특이적 mAb로 염색한 세포의 평균 형광 강도치}) - (\text{아이소타입 대조군 mAb로 염색한 세포의 평균 형광 강도})$.

<109> **도 2: 쥐 세포주에 대한 CyaA 결합은 항-CD11b mAb에 의해 차단된다.**

<110> 특이적 mAb 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 존재 또는 부재 하에 15분 동안 4°C에서 세포를 사전배양한 다음, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CyaA 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 특이적 mAb(사전 배양 과정에서 존재하는 경우)와 함께 4°C에서 20분 동안 항온배양하였다. 재료 및 방법 섹션에 개시한 바와 같이, 표면 결합된 CyaA를 비오틴화된 항-CyaA 폴리클론으로 검출하고, 스트렙타비딘-PE로 확인한 후, 생세포에서 유세포 분석법으로 검출하였다.

<111> a, b: 각종 용량의 CyaA의 결합에 대한 M1/70 항-CD11b mAb의 효과. FSDC 수지상 세포(a) 또는 J774A.1 대식 세포(b)를 단독 배지(○) 또는 M1/70 항-CD11b mAb(●)와 함께 사전배양한 후, M1/70 항-CD11b mAb의 존재 또는 부재 하에 CyaA와 함께 항온배양하였다. mAb 없이 실시된 실험으로부터 얻은 실험점을 $\Delta\text{MFI} = \text{Bmax} \cdot [\text{CyaA}] / (\text{K}_d + [\text{CyaA}])$ 에 대입하여 Bmax를 결정하였다. CyaA의 결합은 CyaA 농도에 대한 Bmax(%)로서 플롯하였다.

<112> c, d: 고정량의 CyaA 결합에 대한 특이적 mAb의 효과. FSDC(c) 또는 J774A.1(d) 세포를 특이적 mAb(항-CD11a, 2D7, 항-CD11b, M1/70 및 5C6, 항-CD11c, HL3, 항-CD18, C17/16, 대조군 A95-1)의 존재 또는 부재 하에 사전배양한 후, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고정된 농도로 CyaA와 항온배양하였다. 특이적 mAb로 처리한 세포 상에서 CyaA 결합에 대해 얻어지는 ΔMFI 값을 mAb 부재하의 CyaA 결합에 대해 얻어진 ΔMFI 로서 정규화하였다.

<113> **도 3: 인간 호중구에 대한 CyaA 결합은 항-CD11b 및 항-CD18 mAbs에 의해 차단된다**

<114> a, b, c: 새로 정제된 호중구의 형광 히스토그램으로서, 새로 정제된 호중구를 배지 단독(a), 44 항-CD11b mAb(b) 또는 아이소타입이 부합되는 대조군 마우스 mAb(c)와 사전 배양한 다음, 비오틴화된 CyaA의 존재(회색) 또는 부재(블랭크)하에 항온배양하고, 스트렙타비딘-PE로 확인하였다. 세포수를 PE 형광의 로그값에 대해 플롯한다.

<115> d: CyaA의 호중구(항-CD11b, 44, M1/70, 항-CD18, TS/18, 대조군 마우스 IgG2a, 대조군 래트 IgG2b, A95-1)에의 결합에 대한 특이적 mAb의 효과. 새로 정제된 호중구를 특이적 mAb의 존재 또는 부재 하에 사전 배양하고, CyaA와 함께 항온배양하였다. 특이적 mAb로 처리한 세포 상에서 CyaA 결합에 대해 얻어지는 ΔMFI 값을 mAb 부재하의 CyaA 결합에 대해 얻어진 ΔMFI 의 비율(%)로서 정규화하였다.

<116> **도 4: 세포내 cAMP 증가 및 CyaA가 매개하는 세포 사멸은 J774A.1 세포의 항-CD11b mAb에 의해 특이적으로 차단된다**

<117> a: 세포내 cAMP 축적에 대한 특이적 mAb의 효과. J774A.1 세포를 특이적 mAb(항-CD11b, M1/70, 항-CD18, C17/16) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 존재 또는 부재 하에 1 시간 동안 4°C에서 사전배양한 다음, CyaA 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 mAb 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (사전 배양 과정에서 제공된 경우)와 함께 37°C에서 20분간 항온배양하였다. 재료 및 방법 섹션에 개시된 바와 같이 세포내 cAMP 함량을 측정하였다.

<118> b: CyaA 매개된 세포 사멸에 대한 특이적 mAb의 효과. J774A.1 세포를 특이적 mAb(항-CD11a, 2D7 항-CD11b, M1/70, 항-CD11c, HL3, 항-CD18, C71/16, 대조군, 2.4G2) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 존재하에 또는 단독 배지와 함께 1 시간 동안 4°C에서 사전배양 하였다. 그 다음 CyaA 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 특이적 mAb 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (사전 배양 과정에서 제공된 경우)와 함께 37°C에서 2 시간 항온배양하였다. Cytotox 96TM 분석을 사용하여 LDH 방출로 세포 용해를 측정하였다.

<119> **도 5: CHO 세포는 CyaA에 결합하여 CD11c가 아니라 CD11b로 형질감염시 CyaA에 대해 감수성이 된다**

<120> a, b: CHO 형질전환체의 표면에서의 CyaA 결합. 인간 CD11b/CD18(●), 인간 CD11c/CD18 (○)로 형질감염되거나 또는 모조 형질감염된(◇) CHO 세포를 37°C(a) 또는 4°C(b)에서 20분간 각종 용량의 CyaA와 항온배양하였다. 재료 및 방법 섹션에 개시한 바와 같이, 표면 결합된 CyaA를 비오틴화된 항-CyaA 폴리클론 항체로 검출하고, 스

트랩타비딘-PE로 확인한 후, 생세포에서 유세포 분석법으로 검출하였다. 결합은 다음과 같이 표현된다: $\Delta MFI =$ (CyaA와 항온배양한 세포의 평균 형광 강도치) - (CyaA가 없는 세포의 평균 형광 강도).

- <121> c: CHO 형질감염체에서의 세포내 cAMP 측정. 인간 CD11b/CD18(●), 인간 CD11c/CD18(○)로 형질감염되거나 또는 모조 감염된(◇) CHO 세포를 37°C에서 20분간 CyaA의 존재 또는 부재 하에 항온배양하였다. 세포내 cAMP 함량은 재료 및 방법 섹션에 개시된 바와 같이 결정하였다.
- <122> d: CHO 형질감염체에서의 세포 용해. 인간 CD11b/CD18, 인간 CD11c/CD18 또는 모조 감염된 CHO 세포를 37°C에서 4시간 동안 5 $\mu\text{g/ml}$ CyaA와 함께 항온배양하였다. Cytotox 96TM 분석을 사용하여 LDH 방출로 세포 용해를 측정하였다.
- <123> **도 6: CyaAOVA를 이용한 정맥내 면역화는 B 세포, CD4 및 CD40-독립적 방식으로 항-OVA CTL 반응을 촉진한다**
- <124> C57BL/6 WT +/+ (a), CD4^{-/-} (b), CD40^{-/-} (c) 또는 IgM^{-/-} (d) 마우스를, OVA로부터 유래한 H-2K^b 제한 SIINFEKL 에피토프를 보유하는 CyaA의 유전자적으로 해독된 형태인 CyaAOVA 50 μg (●, ○), 또는 OVA 에피토프가 없는 해독된 대조군 독소인 CyaAE5 50 μg (▲, △)으로 정맥내 면역화시켰다. 7일 후에 동물을 희생시키고, 조사된 C57BL/6 비장 세포의 존재 하에 pOVA 합성 펩티드 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 함께 5일 동안 시험관내에서 비장 세포를 재자극하였다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 pOVA로 사전에 펄스된(●, ▲) 또는 펄스되지 않은(○, △) H-2K^b EL4 세포에 대한 4시간 크롬⁵¹ 방출 분석으로 CTL 활성을 평가하였다.
- <125> **도 7: 정맥내 면역화 후에 시험관내 또는 동일계 CyaAOVA 제시와 관련된 비장 항원 제시 세포의 동정**
- <126> 비장 세포의 저밀도 분획은 항-OVA CD8⁺ T 세포 하이브리도마에 CyaAOVA를 제공한다(a, b):
- <127> 시험관내 분석(a): 저밀도(LDF, ●) 및 고밀도(HDF, ▲) 분획 또는 항원에 노출된 적이 없는 마우스에서 얻은 비분획화된 총 비장세포(TSC, ■, □)를 H-2K^b 하에 pOVA 펩티드에 특이적인 CD8⁺ T 세포 하이브리도마인 B3Z와 함께 배양하였다. OVA 펩티드를 보유하는 재조합의 해독된 CyaA(CyaAOVA, ●, ▲, ■) 또는 대조군 펩티드(CyaALCMV, □)의 각종 농도에서 18시간 동시 배양한 후에, 상청액에서의 IL-2 방출을 CTLL 증식 분석으로 측정하였다. 결과는 Δcpm 으로 표현되며, 분석 과정에서 CyaA 농도에 대해 플롯한다. $\Delta\text{cpm} = [\text{cpm} + \text{CyaA}] - [\text{cpm} - \text{CyaA}]$.
- <128> 생체의 분석(b): 50 μg 의 CyaAOVA (●, ▲, ■) 또는 CyaALCMV(○)를 이용하여 iv로 미리 면역화시킨(6~12 시간) 마우스로부터 비장 세포를 얻고, LDF 및 HDF로 분획화하였다. TSC(■), LDF(●, ○) 또는 HDF(▲)로부터 회수된 다양한 수의 세포 또는 비분획화된 비장세포(■)를, 재조합 CyaA를 첨가하지 않고 B3Z와 직접 배양하였다. 전술한 바와 같이 18 시간 후에 IL-2 방출을 평가하였다. cpm으로 표시되는 결과는 각 웰에 제공된 APC의 수에 대해 플롯한다.
- <129> 수지상 세포(CD11c⁺)는 CD11b^{int}CD11c⁻ 세포 또는 B 세포(CD45R⁺)보다 CyaAOVA에 대해 더욱 효과적인 APC이다(c,d):
- <130> 시험관내 분석(c): LDF 유래의 CD11c⁺(●) 분류된 세포, TSC 유래의 CD11b^{int}CD11c⁻(○) 및 CD45R⁺(■) 분류된 세포를 각종 농도의 CyaAOVA의 존재 하에 18 시간 동안 B3Z와 함께 배양하였다. IL-2는 전술한 바와 같이 평가하였다.
- <131> 생체의 분석(d): 50 μg 의 CyaAOVA로 미리 면역화시킨(6~12 시간) C57BL/6 마우스로부터 유세포 분석으로 분류한 세포를 APC로서 사용하였다. 저밀도 비장세포로부터 CD11c⁺(●), CD11b^{int}CD11c⁻(○), CD45R⁺(■) 분류된 세포를 웰당 세포수를 다양하게 하여 B3Z와 함께 18 시간 동안 직접 배양하였으며, 이 때 CyaAOVA는 첨가하지 않았다. IL-2를 상기한 바와 같이 평가하였다.
- <132> **CD8 α ⁻ 골수 수지상 세포 서브세트는 CD8 α ⁺ 림프구 수지상 세포 서브세트보다 CyaA에 대한 APC로서 더욱 효과적이다(e, f):**
- <133> 항원에 노출된 적이 없는 마우스(e) 또는 50 μg 의 CyaAOVA로 미리(6~12 시간) iv 면역화시킨 마우스(f)로부터 얻은 CD11c⁺ 저밀도 세포를, 유세포 분석으로 골수 수지상 세포(CD11c⁺CD8 α ⁻, ●) 및 림프구 수지상 세포

(CD11c⁺CD8 α ⁺, ○)에서 분획화하고, B3Z 자극에 대한 시험관내(e) 및 생체외(f) 분석에서 APC로 사용하였다. IL-2는 상기한 바와 같이 평가하였다.

<134> B 세포 유전자 결실은 비장세포에 의한 CyaAOVA 제시에 불리한 영향을 미치지 않는다(g, h):

<135> C57BL/6 WT 마우스(■, ●, ▲) 또는 B 세포 결핍 마우스(□, ○, △)에서 유래한 TSC(■, □), LDF(●, ○) 또는 HDF (▲, △)를, a에서와 같이 B3Z 자극에 대해 시험관내 분석(g, ■, □) 또는 생체외 분석(h, ■, ●, ▲, □, ○, △)에서 APC로서 사용하였다. 마우스는 항원에 노출된 적이 없거나(g) 또는 50 μ g의 CyaAOVA로 미리(1.5 시간) iv 면역화시킨 마우스였다. IL-2는 상기한 바와 같이 평가하였다.

<136> 도 8: 수지상 세포에 의한 CyaAOVA의 제시에는 정맥내 면역화 후에 시험관내 및 생체내 TAP 수송자가 필요하다

<137> 시험관내 분석(a) : 대조군 C57BL6 TAP+/+(▲, ●) 또는 TAP-/- 마우스(△, ○)에서 얻은 TSC (▲, △) 또는 CD11c⁺(●, ○) 분류된 세포를 각종 용량의 CyaAOVA의 존재 또는 부재 하에 B3Z와 함께 배양하였다. IL-2를 도 6a에 개시한 바와 같이 평가하였다. 결과는 항원 농도에 대해 플롯된 cpm으로 표시된다.

<138> 생체외 분석(b): 50 μ g의 CyaAOVA로 미리 iv 면역화시킨 대조군 C57BL6 TAP+/+(▲, ●) 또는 TAP-/- 마우스(△, ○)로부터 얻은 TSC (▲, △) 또는 CD11c⁺(●, ○) 분류된 세포를 B3Z와 함께 18 시간 동안 배양하였다. IL-2를 도 6a에 개시한 바와 같이 평가하였다. 결과는 동시 배양된 세포수에 대해 플롯된 cpm으로 표시된다.

<139> 도 9: CyaAOVA의 세포에의 결합에 있어서 $\alpha_M\beta_2$ 인테그린(CD11b)의 역할

<140> TSC에 대한 CyaAOVA-비오틴 결합은 항-CD11b에 의해 차단된다(a): TSC 현탁액을 10 μ g/ml의 항-CD11b M1/70 mAb 또는 아이소타입 대조군 mAb와 함께 또는 단독으로 4°C에서 항온배양하였다. 그 다음 2 μ g/ml(좌측 패널) 또는 각종 농도(우측 패널)에서 CyaAOVA-비오틴을 4°C에서 30분간 세포에 첨가하였다. 세척 후에, 30분간 스트렙타비딘-PE(Strep-PE)를 사용하여 CyaAOVA-비오틴을 확인하였다. 이어서, 세척 후에 요오드화프로피듐을 함유하는 PBS 중에 세포를 재현탁시켰다. 요오드화프로피듐 배제로 게이트된 생세포의 크기(FSC)를 Strep-PE 형광에 대해 플롯하였다. CyaAOVA-비오틴에 대해 양성인 백혈구(%)를 염색 과정에서 CyaAOVA-비오틴 농도에 대해 플롯하였다.

<141> 저밀도 세포에 대한 CyaAOVA-비오틴 결합은 CD11b의 발현과 상관관계가 있다(b) : LDF를 CD11c, CD8 α 및 CyaOVA비오틴(또는 배지)로 삼중 염색하거나, 또는 CD11c, CD8 α 및 CD11b(또는 대조군 mAb)를 이용한 별도의 실험에서 삼중 염색하였다. 세척 후에, Strep-PE로 30분간 세포를 염색하여 CyaAOVA-비오틴, 항-CD11c-FITC 및 항-CD8 α -APC를 확인하였다. 림프양 DC(CD11c⁺CD8 α ⁺), 골수 DC(CD11c⁺CD8 α ⁻), CD8⁺ T 세포(CD11c⁻CD8 α ⁺) 및 기타 세포(CD11c⁻CD8 α ⁻)에서 게이트(gate)를 실시하였다. 각 게이트에 대해, CyaAOVA-비오틴 염색 또는 CD11b 염색을 세포수에 대해 플롯하여 별도의 히스토그램에 나타내었다. 좌측 히스토그램: LDF 현탁액은 실온에서 30 분 동안 CyaAOVA-비오틴 0(회색으로 채워진 히스토그램), 2.5(얇은 테두리 선의 흰색 히스토그램) 또는 10 μ g/ml(두꺼운 테두리선의 흰색 히스토그램)과 함께 항온배양하였다. 우측 히스토그램: 아이소타입 대조군-PE(회색으로 채워진 히스토그램), CD11b-PE (얇은 테두리선의 흰색 히스토그램).

<142> 도 10: MHC I에 의한 CyaAOVA 제시에 있어서 $\alpha_M\beta_2$ 인테그린(CD11b)의 역할

<143> TSC를 이용한 시험관내 항원 제시 분석(a, b): 항원에 노출된 적이 없는 C57BL/6 마우스 유래의 TSC를 APC로 사용하여 a, b에서 동일한 실험을 실시하였다. B3Z 자극은 CTLL 증식 분석에서 측정된 동시배양 상청액에서의 IL-2 방출로 평가하였다. 결과는 CyaAOVA 또는 pOVA 농도에 대해 cpm으로 플롯한다.

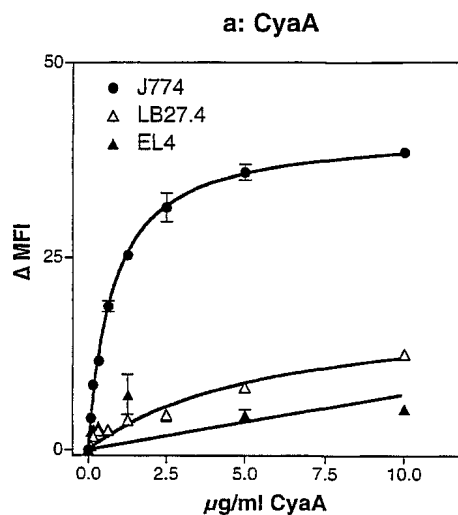
<144> TSC 또는 CD11b⁺와 CD11b⁻ 분획을 이용한 생체외 항원 제시 분석(c, d): 50 μ g의 CyaAOVA(c) 또는 10 μ g의 pOVA(d)로 C57BL/6 마우스를 정맥내 면역화시켰다. TSC(△)로부터 유세포 분석으로 CD11b⁺(●) 및 CD11b⁻(○) 세포를 분류하고 B3Z와 함께 웰당 세포수를 다양하게 하여 배양하였다. 18시간 동시배양한 후에, B3Z 자극을 IL-2 방출로 평가하였다. 결과는 cpm 단위로 표시되며, 각 웰에 제공된 면역화된 동물 유래의 APC 수에 대해 플롯한다.

<145> 도 11: 에피토프를 재조합 CyaA에 이황화 결합을 통해 화학적으로 커플링시키는 방법의 개요

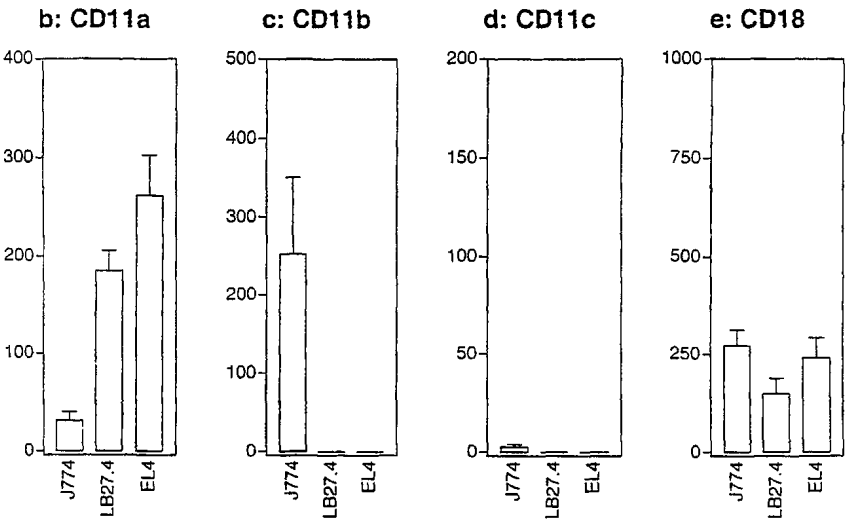
- <146> 도 12: CTL 에피토프의 화학적 커플링용 벡터의 다이어그램
- <147> 도 13: CTLL 증식 분석에서 측정된 B3Z에 의한 IL-2 방출을 도시한 그래프
- <148> C57BI/6 마우스로부터 얻은 3×10^5 비장 세포를 각종 농도의 시클라제의 존재 하에 10^5 B3Z 세포와 18 시간 동안 동시배양하였다. B3Z에 의한 IL2 방출을 CTLL 증식 분석에서 측정하였다.
- <149> 도 14: OVA 펩티드 50 μ M로 펄스된(A) 또는 펄스되지 않은(B) ^{51}Cr -표지된 EL4 표적 세포 상에서 측정된 세포 독성 활성을 도시하는 그래프.
- <150> C57BL/6 마우스에게 각종 CyaA 50 μ g을 정맥내 주사하였다. 7일 후, OVA 펩티드로 비장 세포를 시험관 내에서 자극하였다. 세포독성 활성은 ^{51}Cr -표지된 표적 세포에서 측정하였다.
- <151> 도 14는 OVA-특이적 CTL 반응을 유도하는 본 발명의 단백질성 벡터의 생체내 능력을 도시한다.
- <152> 도 15: CyaA-E5 및 CyaA 단편에 의한 CyaA의 CD11b로의 결합 억제
- <153> CD11b/CD18로 형질감염된 CHO 세포를 상이한 농도의 CyaA-E5(▲), CyaA 1-383(■) 또는 CyaA-373-1706(◆)과 함께 1 시간 동안 얼음 위에서 사전 배양한 다음, 비오틀화된 CyaA-E5 5 μ g/ml와 함께 30분 동안 얼음 위에서 항온배양하였다. 스트렙타비딘-PE를 사용하여 표면 결합된 시클라제를 확인한 후, 생세포 상에서 유세포 분석으로 분석하였다. 결과는 평균 형광 강도(A), 양성 세포 비율(B) 및 억제율(C)로서 표시된다.
- <154> 도 16: pTRAC-373-1706 발현 벡터의 개략도
- <155> 큰 화살표는 β -락타마제의 오픈 리딩 프레임(bla), 파지 람다의 감열성 리프레서 cI^{857} (λcI^{857}), cycC 유전자 및 절두형 'cyaA 유전자를 나타낸다(화살표는 해당 유전자의 번역 방향을 나타낸다). ColE1 기원(ori), Pr 프로 모터(λ Pr) 및 일부 관련 제한 부위가 제시되어 있다. cyaC 및 절두형 'cyaA 유전자 사이의 유전자간 영역은 하부에 자세히 제시되어 있다. cyaC의 신규한 C-말단 연장부(야생형 CyaC의 Arg182에 대한 하류), 정지 코돈(밑줄 친 부분), 개시인자 Met 및 CyaA373-1706(야생형 CyaA의 Ser373에 대한 상류)의 제1 코돈이 도시되어 있다.

도면

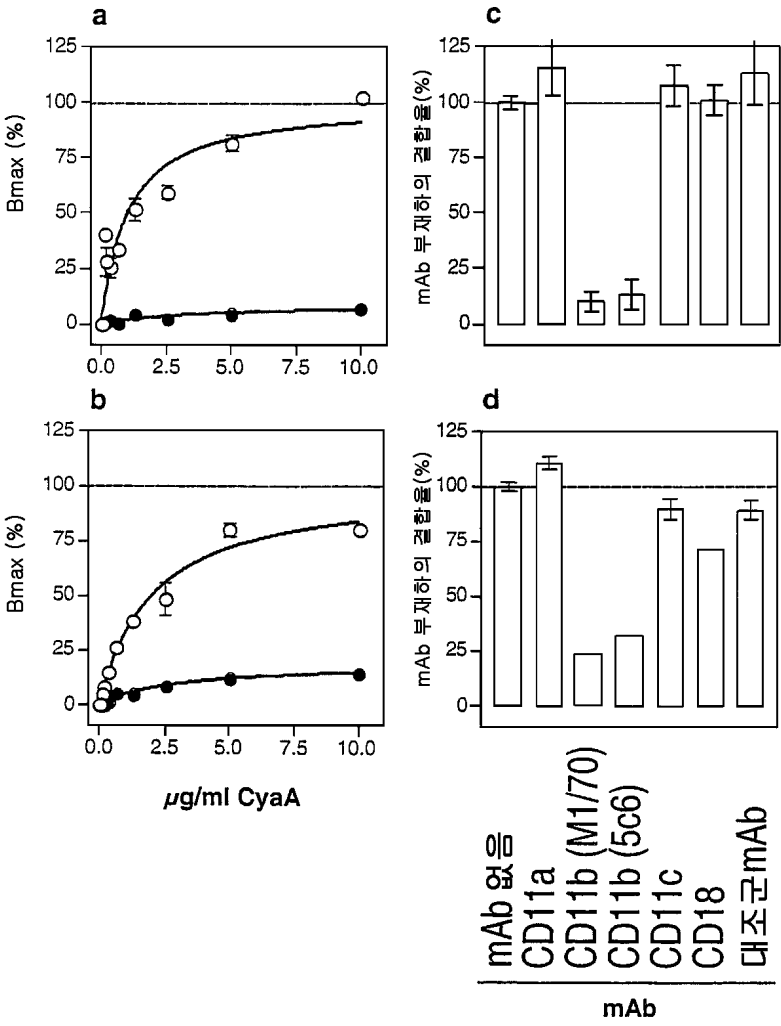
도면1a



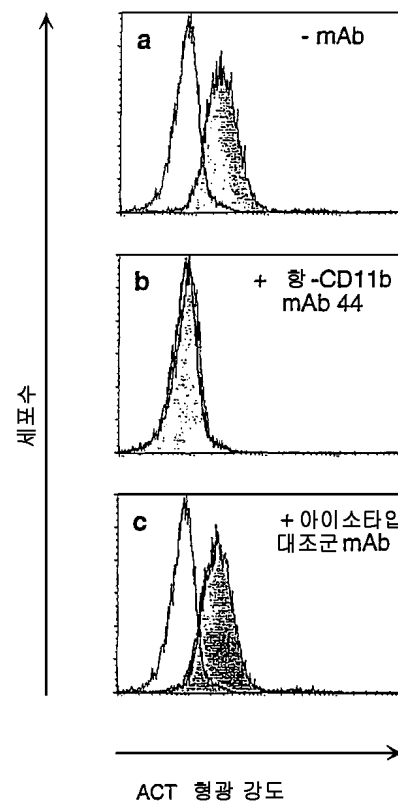
도면1b



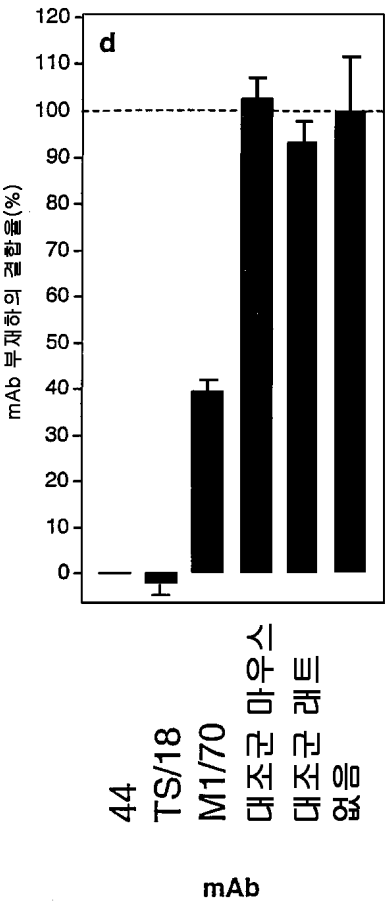
도면2



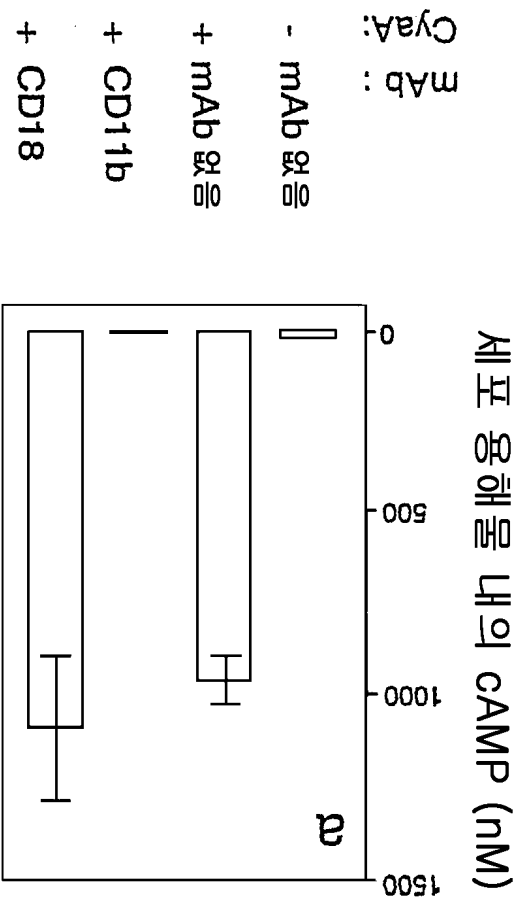
도면3a



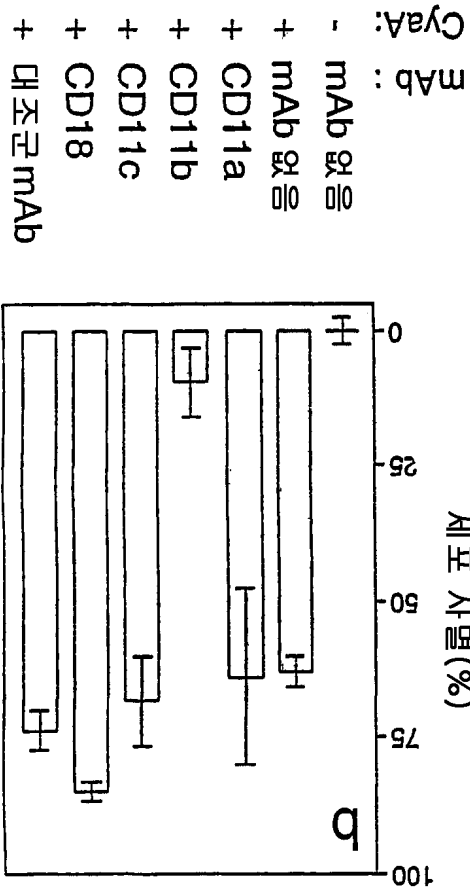
도면3b



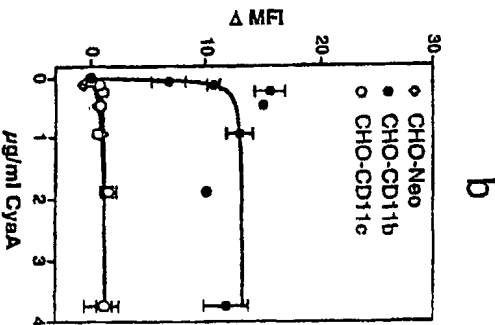
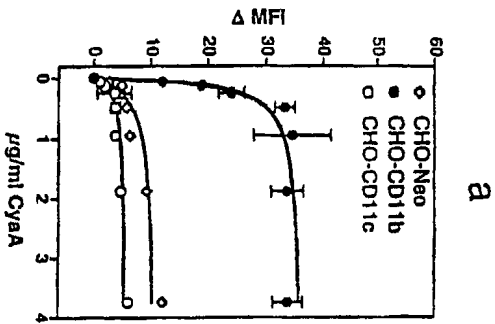
도면4a



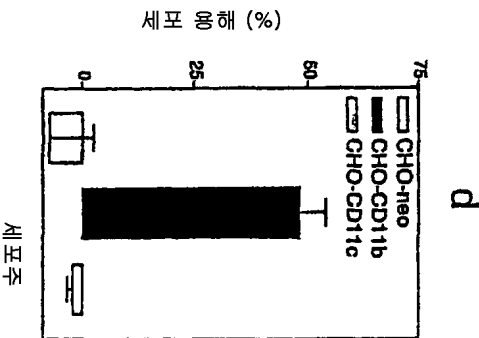
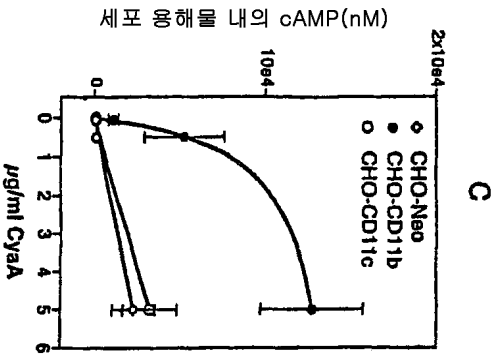
도면4b



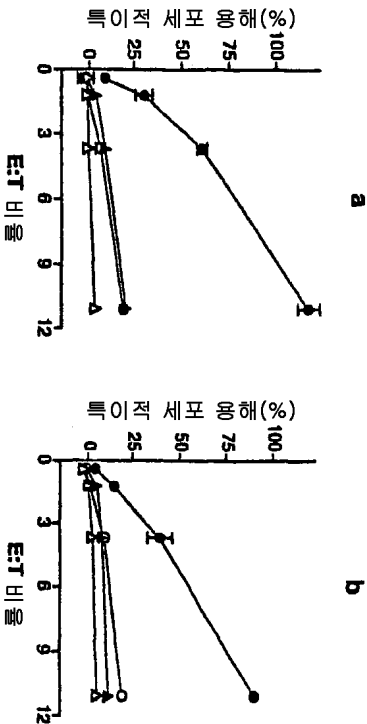
도면5a



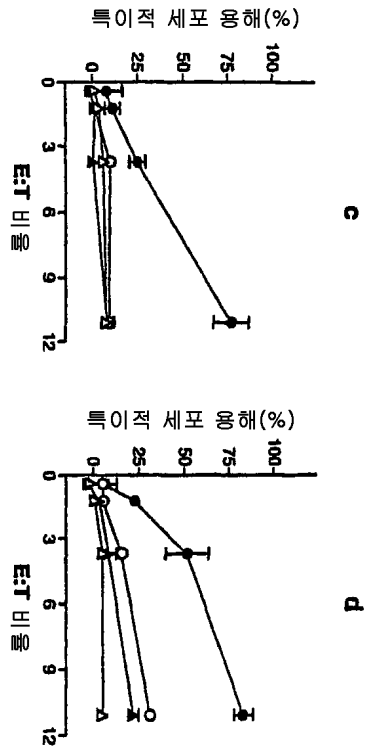
도면5b



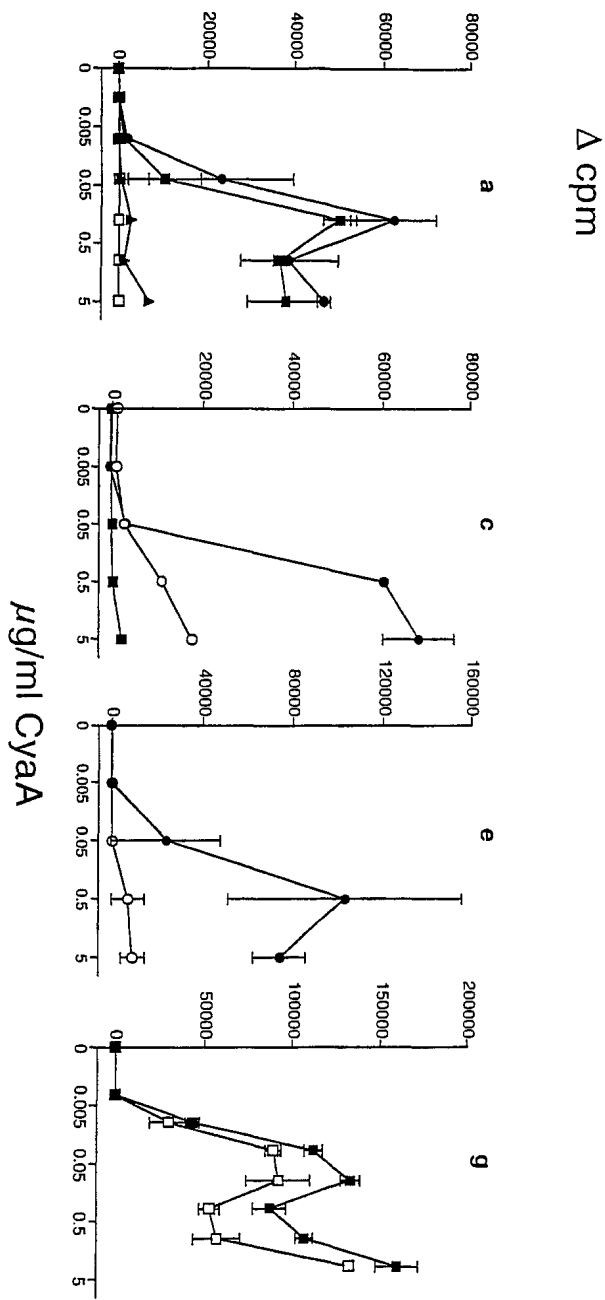
도면6a



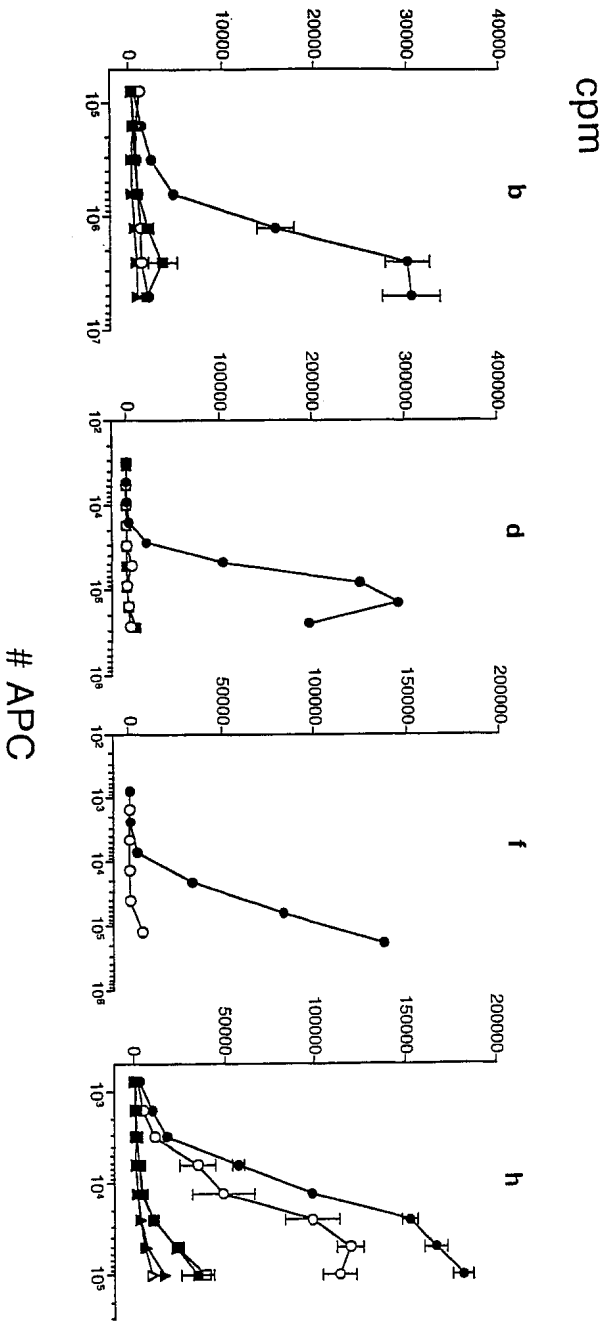
도면6b



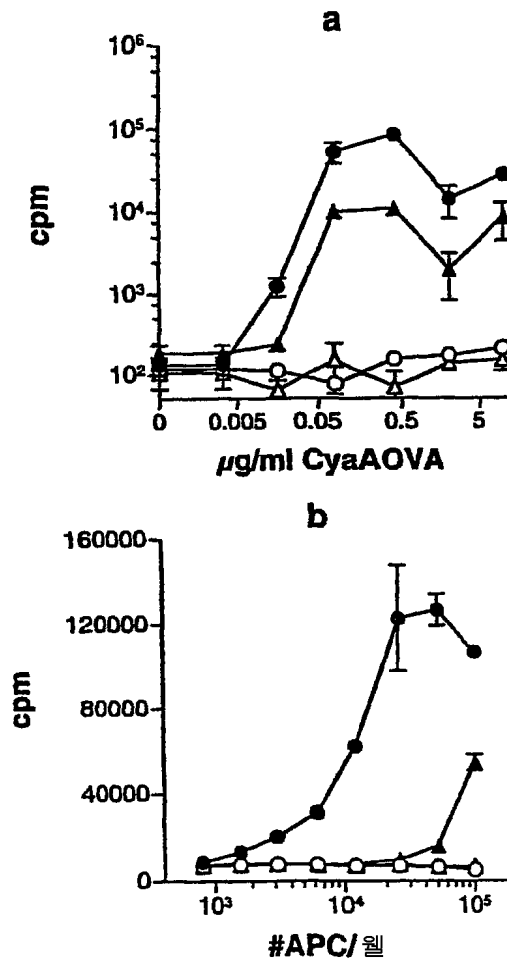
도면7a



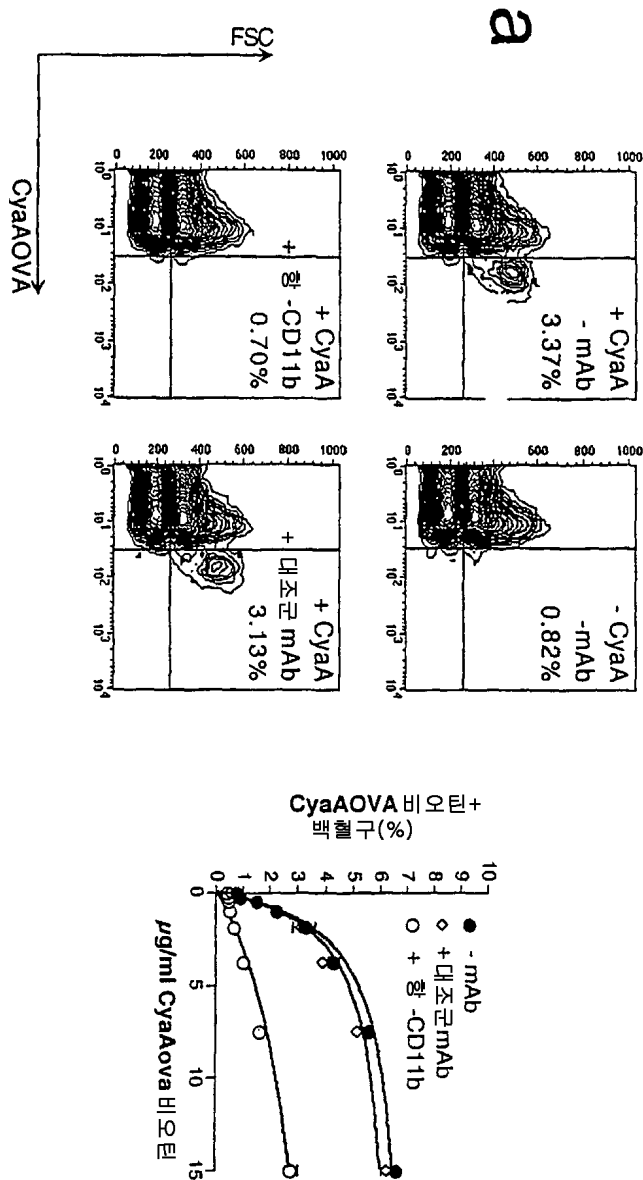
도면7b



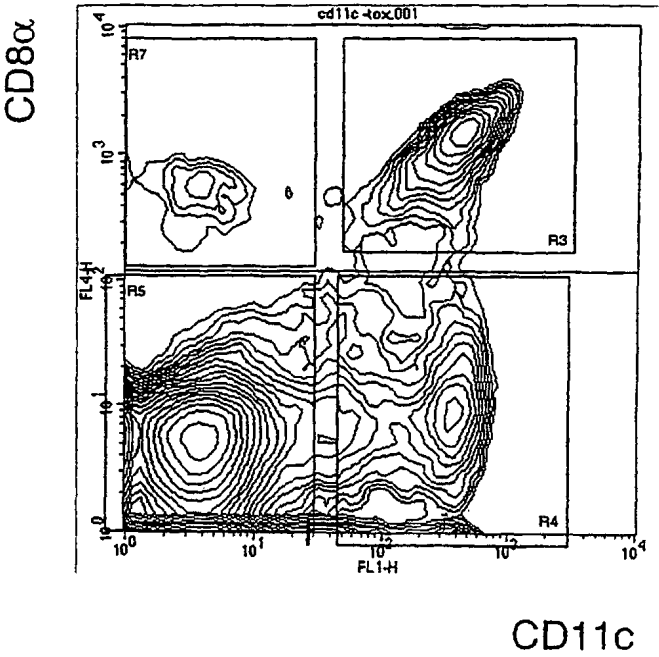
도면8



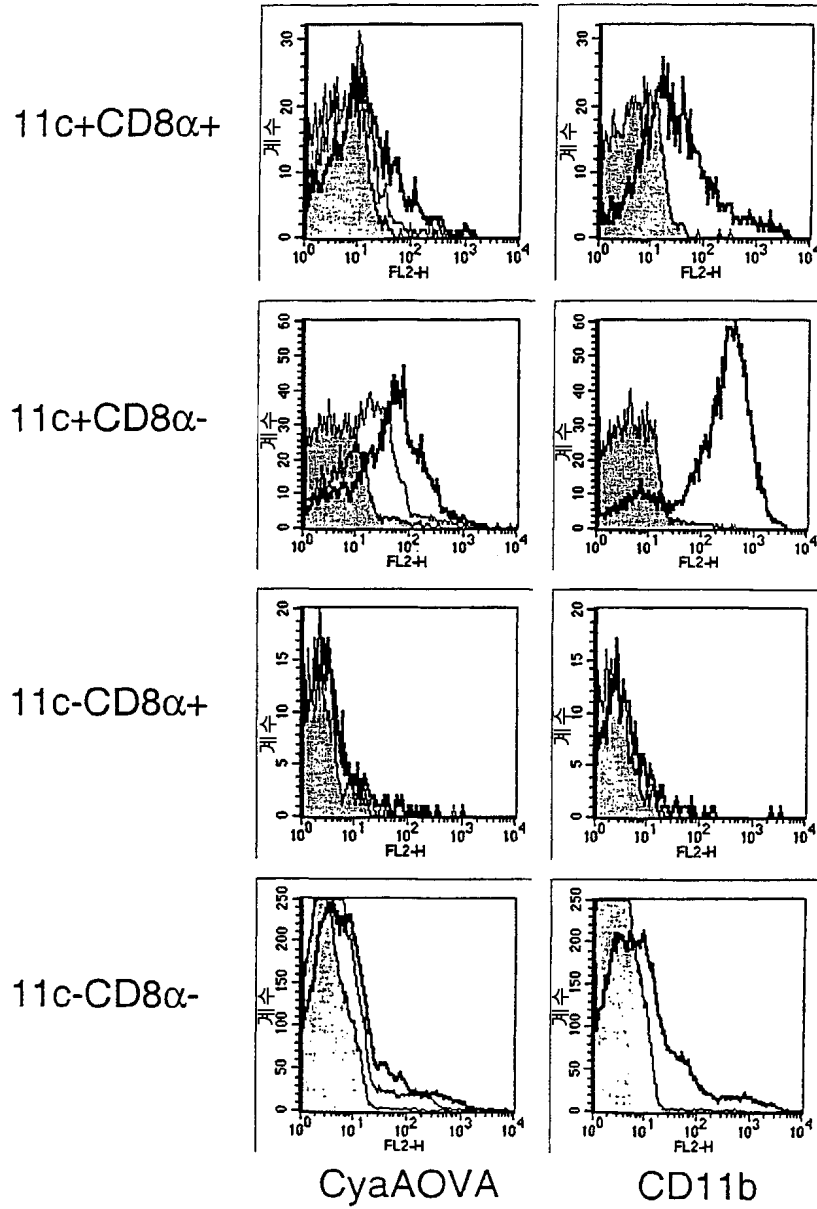
도면9a



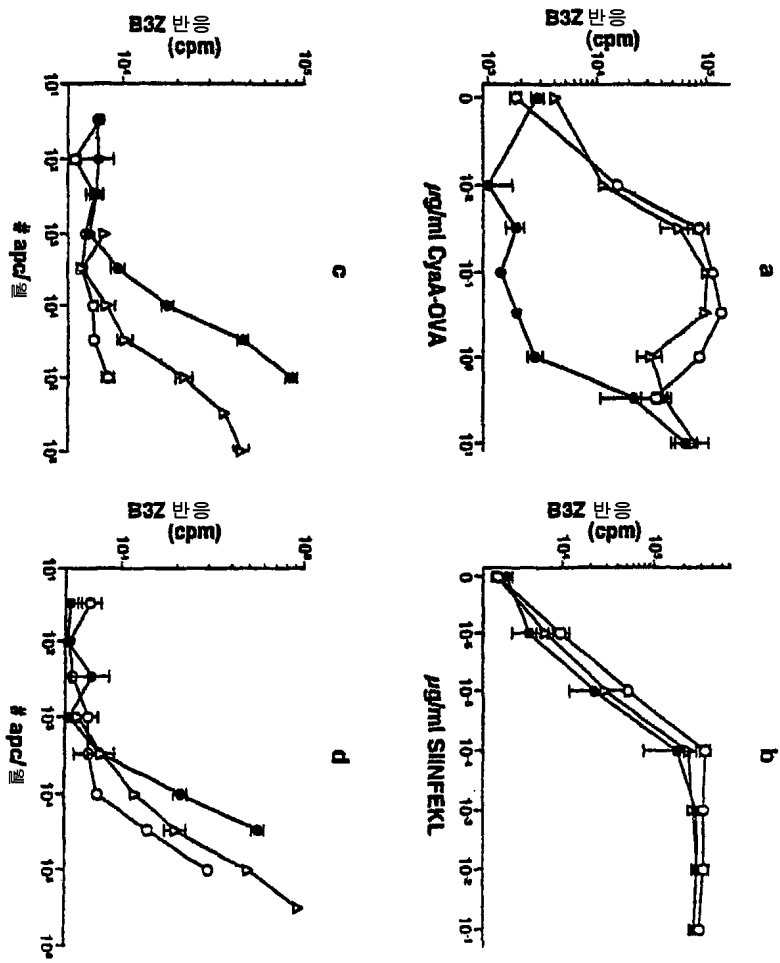
도면9b1



도면9b2



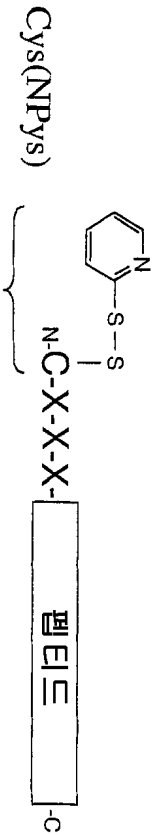
도면10



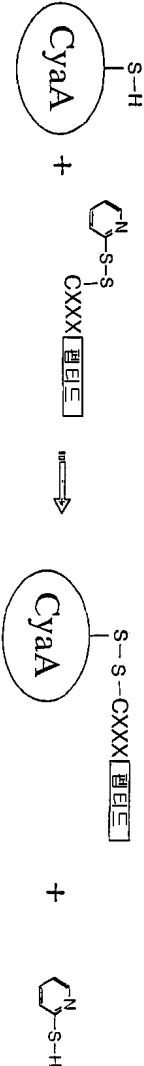
1 - Cyaa(Cys 잔기 없음)에 Cys 삽입



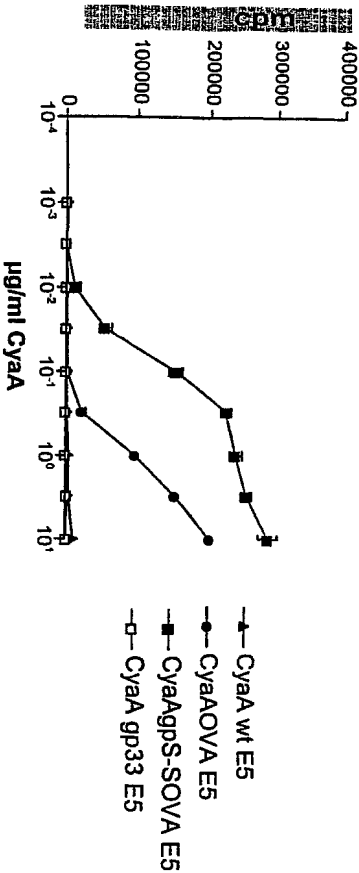
2 - Cys(NPys)-펩티드의 화학적 합성



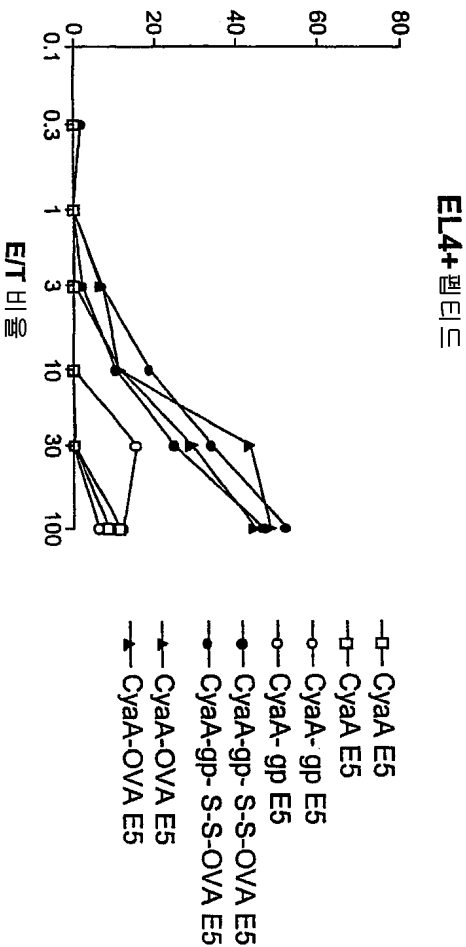
3 - Cyaa-Cys에 대한 Cys(NPys)-펩티드의 가교 결합



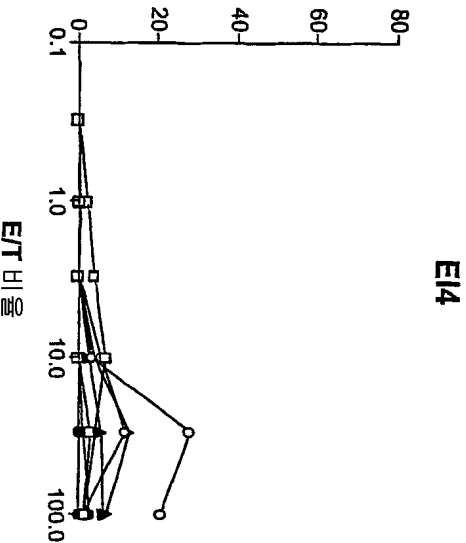
도면13



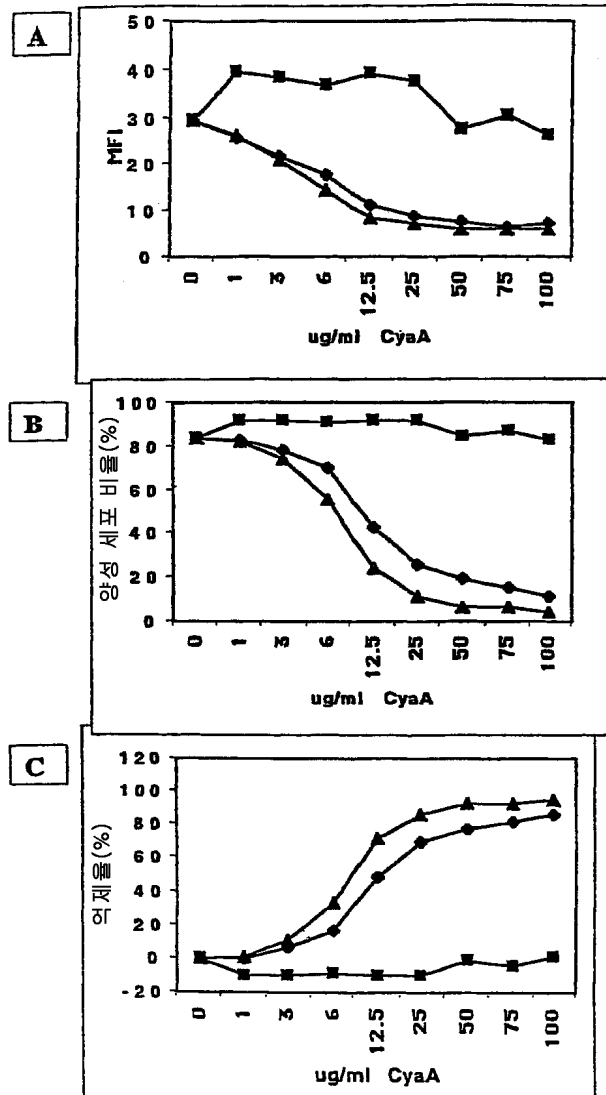
도면14a



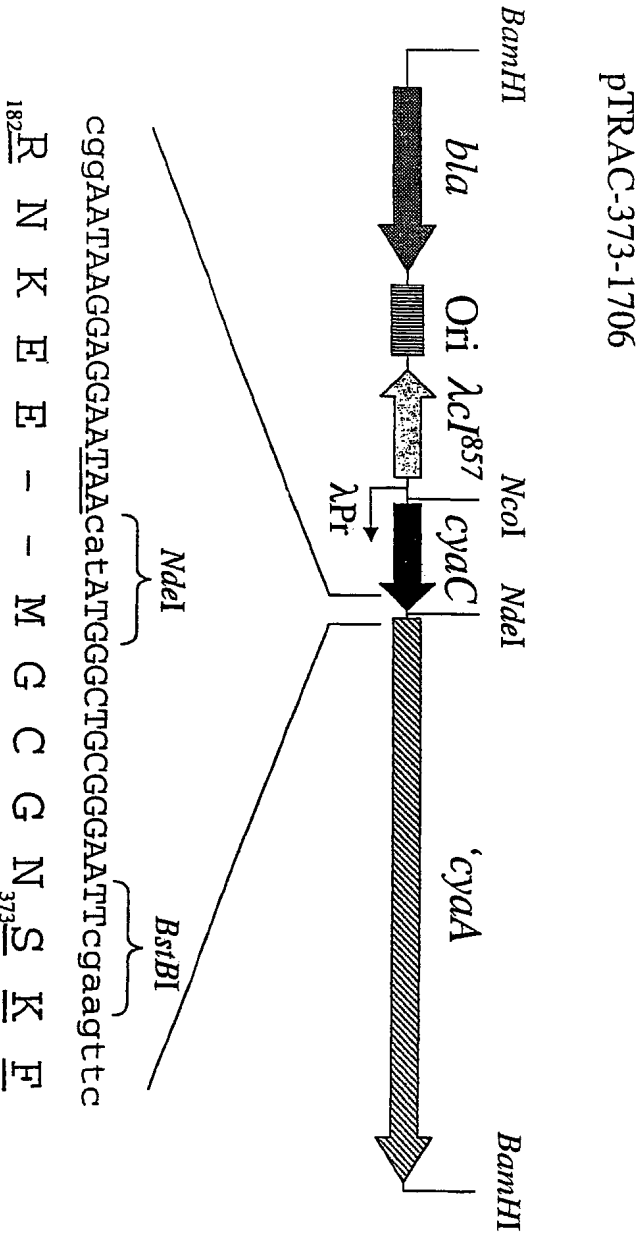
도면14b



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> INSTITUT PASTEUR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- <120> VECTORS FOR MOLECULE DELIVERY TO CD11b EXPRESSING CELLS
- <130> B4669A -AD/DBO
- <140> PCT/EP 01/11315
- <141> 2001-09-14
- <150> EP 00402562.3
- <151> 2000-09-15
- <160> 11
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(14)
 <223> ovalbumin epitope
 <400> 1
 Ala Ser Cys Gly Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Gly Thr
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223> pOVA synthetic peptide
 <400> 2
 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1
 5
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(15)
 <223> CMVgp epitope
 <400> 3
 Pro Ala Ser Ala Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Thr
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(12)
 <223> CEA 571 epitope
 <400> 4
 Cys Gly Gly Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(12)
 <223> Gp100 epitope
 <400> 5
 Cys Gly Gly Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5 10

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(13)
 <223> MelanA epitope
 <400> 6
 Cys Gly Gly Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE

<222> (1)..(12)
 <223> Tyrosinase epitope
 <400> 7
 Cys Gly Gly Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
 1 5 10

<210> 8
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: intergenic region
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(15)
 <223> C-terminus extension of CyaC
 <220>
 <221> CDS
 <222> (22)..(45)
 <223> First codons of CyaA 373-1706
 <400> 8

cgg aat aag gag gaa taacat atg ggc tgc
 ggg aat tcg aag ttc 45
 Arg Asn Lys Glu Glu Met Gly Cys Gly Asn Ser Lys Phe
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: intergenic
 region
 <400> 9
 Arg Asn Lys Glu Glu
 1 5
 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description
 of Artificial Sequence: intergenic
 region
 <400> 10
 Met Gly Cys Gly Asn Ser Lys Phe
 1 5
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(16)
 <223> OVA epitope
 <400> 11
 Arg Ala Ser Cys Gly Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Gly Thr Ala
 1 5 10
 15